

DAVID GERMANO GONÇALVES SCHWARZ

**DISTRIBUIÇÃO DE *Mycobacterium avium* subespécie
paratuberculosis EM ÓRGÃOS DE CAMUNDONGOS C57BL/6
EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S411d
2012

Schwarz, David Germano Gonçalves, 1984-
Distribuição de *Mycobacterium avium* subespécie
paratuberculosis em órgãos de camundongos C57BL/6
experimentalmente infectados / David Germano Gonçalves
Schwarz. – Viçosa, MG, 2012.
xvi, 49f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 40-49.

1. Ruminantes - Doenças. 2. Paratuberculose.
3. *Mycobacterium paratuberculosis*. 4. Camundongos.
5. Biologia molecular. 6. Bactérias patogênicas. 7. Bactérias
gram-positivas. 8. Reação em cadeia de polimerase.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 636.208969294

DAVID GERMANO GONÇALVES SCHWARZ

**DISTRIBUIÇÃO DE *Mycobacterium avium* subespécie
paratuberculosis EM ÓRGÃOS DE CAMUNDONGOS C57BL/6
EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

APROVADA: 27 de Abril de 2012.


Abelardo Silva Júnior
(Coorientador)


Laércio dos Anjos Benjamin
(Coorientador)


Luciano Gomes Fietto


Maria Aparecida Scatamburlo Moreira
(Orientadora)

***Aos meus pais, Adolfo Germano e Maria Edna, por
acreditarem no sonho de um menino que gostava de animais...***

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradecer é o reconhecimento da limitação humana, da necessidade de sermos dependentes de pessoas que cruzam nossas vidas inesperadamente e acabam se tornando essenciais para a conquista de nossos sonhos. Muitas vezes essas pessoas não precisam sequer estarem presentes, seus pensamentos atravessam distâncias e nos acolhem em momentos de dificuldades. Independentemente de qualquer desafio que o destino cruelmente nos imponha, essas pessoas surgem e nos mostram que a vida segue de uma maneira muito especial e nos fazem lembrar que para cada momento de tristeza surgem outros de alegrias. Não podemos viver solitariamente, necessitamos muitas vezes que as mãos dos outros sejam as nossas próprias mãos. A essas pessoas, palavras não são suficientes para expressar minha real gratidão.

A Deus, por me conceder a vida, por demonstrar seu amor em todos os momentos de minha vida. Por me dar forças e por iluminar meus sonhos.

Ao meu pai, Adolfo Germano, e minha amada mãe, Maria Edna, pelo amor incondicional, pelas orações, por concederem oportunidades que nunca tiveram e por serem meus “anjos”, concedidos por Deus, aqui na Terra.

Aos meus irmãos, Johnny e Lidiane, por sempre me apoiarem e me receberem com alegria.

À Professora Maria Aparecida (Cida) por ter me recebido gentilmente na UFV, pela orientação e presença em todos os momentos da execução desta dissertação, pelos preciosos incentivos e conselhos. Pelo dom de aliviar momentos angustiantes, pelo carinho maternal, exemplo profissional e amizade.

Ao Professor Abelardo, pela coorientação, pelos seus preciosos conselhos durante a execução de todo trabalho, principalmente na parte molecular, por

estar sempre disposto a ajudar independentemente do horário ou situação, por ser mais que professor, um verdadeiro amigo!

Ao Professor Laércio, pela coorientação, por estar sempre de “portas abertas” para esclarecer dúvidas e sugerir. Por ceder o Laboratório de Morfofisiologia de Peixes para o processamento das amostras. Pela amizade e sempre gentil atenção.

Ao Professor Yung-Fu Chang, da “College of Veterinary Medicine - Cornell University”, por ceder a cepa MAP66115-98. Pelas sugestões e esclarecimentos.

Ao Juaci V. Malaquias da EMBRAPA CERRADOS, pela valiosa análise estatística, por ficar horas ao telefone explicando todos os pontos a serem analisados, pelas sugestões, profissionalismo e sincera amizade.

À Rosyane, por ter auxiliado na leitura das lâminas histológicas e pela valiosa amizade.

À Pricila Pietralonga, por realizamos nossos experimentos juntos, pela parceria, incentivo em períodos desanimadores, pelo seu exemplo profissional e pela sua imensurável amizade.

À Isabel, pelos ricos conselhos, sugestões, pela paciência em ensinar, pela sua valiosa amizade e sua risada contagiante. Jamais esquecerei!

À Carol (fofa), pelos momentos de descontração, trabalho e amizade.

À Marina, pela ajuda na realização do experimento, pelo compromisso e pela disposição em ajudar.

Aos companheiros de laboratório Fábio, Vitor, Cristian, Maria Alejandra, Bernardo, Pedro e Isis, por compartilharem experiências juntos, pelo trabalho em equipe e pela sincera amizade.

Às pessoas que me auxiliaram na realização e obtenção de resultados, Mariana Fausto (LIMA), Lucas e Paulo (Laboratório de Morfofisiologia de Peixes), Rafaella (LIPOA) e Fabiano.

Aos funcionários do setor de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública do DVT/UFV, especialmente ao Sr. Luiz Carlos, sempre disposto a contribuir para o andamento dos experimentos. Adão e Cláudio, do Laboratório de Histopatologia, que auxiliaram na microtomia.

À Bete, pelo auxílio burocrático, e à Rosinéia (Rosi), pela sua ajuda em todos os momentos do mestrado, por ter me representado na inscrição da prova de língua inglesa, sem ao menos conhecer pessoalmente, pelo seu carinho e sua alegria. Jamais esquecerei!

Ao amigo Nilson Araújo, por compartilhar momentos únicos em minha vida. Pelos passeios, pelos momentos de entretenimento e pelo enorme carinho.

Ao amigo Carlos Thiago, por ser em muitos momentos meu irmão em Viçosa e toda família Mendes de Oliveira, por me acolher de braços abertos com carinho e atenção.

À minha grande amiga Heva Pereira, pelas sábias palavras, pelo seu amor, pela sua energia positiva e por ser um anjo da guarda.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais – FAPEMIG, pela bolsa de mestrado.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Departamento de Veterinária.

MUITO OBRIGADO!

BIOGRAFIA

David Germano Gonçalves Schwarz, filho de Adolfo Germano Schwarz e Maria Edna Vitorina Gonçalves Schwarz, nasceu em Campinas-SP em 16 de maio de 1984. Aos sete meses de idade foi residir em Joinville-SC.

Em março de 2004 ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC, Lages-SC, finalizando-o em dezembro de 2008.

Em março de 2010 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa - UFV, Viçosa-MG, nível de mestrado, sob orientação da Professora Maria Aparecida Scatamburlo Moreira, concluindo-o em abril de 2012.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE QUADROS	x
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 - Importância e epidemiologia	3
2.2 - Patofisiologia	5
2.3 - Diagnóstico	8
2.4 - Modelos experimentais	9
3. OBJETIVOS	13
3.1 - Objetivo geral	13
3.2 - Objetivos específicos	13
4. MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1 - Animais	14
4.2 - Cepa MAP66115-98	15
4.3 - Obtenção do inóculo	15
4.4 - Bioensaio	155
4.5 - Histologia	16
4.6 - Nested - Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	17
4.7 - Análise estatística	19
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5.1 - Infecção de camundongos C57BL/6 pela cepa MAP66115-98	20
5.2 - Avaliação histopatológica	21
5.3 - Detecção de <i>Mycobacterium avium</i> subespécie <i>paratuberculosis</i> por Nested-PCR	24
5.3.1 - Avaliação dos órgãos para probabilidade de positividade	26
5.3.2 - Avaliações dos órgãos por medidas de associação	33
5.4 - Considerações finais	36
6. CONCLUSÕES	39
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Placas de Peyer de camundongos.....	6
Figura 2.	Marcação positiva de macrófagos pela coloração de Ziehl-Neelsen. Camundongos C57BL/6 inoculados por via intraperitoneal, na dose de 3×10^8 UFC/mL.....	23
Figura 3.	Produtos de nested-PCR em gel de agarose 1%, utilizando pares de oligonucleotídeos s204 e s749 para reação externa e s347 e s535 para a reação interna.....	25
Figura 4.	Proporção de órgãos positivos de camundongos C57BL/6 quando inoculados com 3×10^8 UFC/mL de cepa MAP66115-98 por via IP, após 120 dias de inoculação.....	27
Figura 5.	Proporção de órgãos positivos de camundongos C57BL/6 quando inoculados com 3×10^8 UFC/mL de cepa MAP66115-98 por via IP, em relação aos dias pós-inoculação.....	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Resultado da nested-PCR em diferentes órgãos de camundongos.....	25
Tabela 2.	Probabilidade condicional em relação ao tempo pós-inoculação de diferentes órgãos de camundongos C57BL/6 infectados pela via intraperitoneal com a cepa MAP66115-98.....	30
Tabela 3.	Probabilidade e Risco Relativo (RR) de positividade quanto a ação de MAP66115-98 segundo os órgãos positivos de camundongos C57BL/6 infectados pela via intraperitoneal...	33
Tabela 4.	Chances e Razão de Chances (RC) de positividade quanto a ação de MAP66115-98 segundo os órgãos positivos de camundongos C57BL/6 infectados pela via intraperitoneal.....	34
Tabela 5.	Relação entre órgãos que apresentaram Risco Relativo (RR) e Razão de Chances (RC) acima de 1,00, com seus respectivos Intervalo de Confiança (IC) à 95% de significância.....	35

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	Designação dos oligonucleotídeos, sequência e tamanho molecular utilizados na técnica de nested-PCR.....	18
-----------	--	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Art. - artigo

BAAR – bacilos álcool-ácido resistentes

BIOAMOL– laboratório de biologia molecular de micro-organismos

CCB – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

CEUA – comissão de ética no uso de animais

°C – graus Celsius

DC – doença de Crohn

DNA – ácido desoxirribonucléico

DO – densidade óptica

Dr – doutor

DVT – departamento de medicina veterinária

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA – *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*

EUA – Estados Unidos da América

FAP – proteínas ligantes de fibronectinas

FN - Fibronectina

g – grama

g – aceleração da gravidade

h - horas

HE – hematoxilina e eosina

HEYM – *Herrold Egg Yolk Medium*

HPC – cloreto de hexadecilpiridínio

IP – intraperitoneal

IC – intervalo de confiança

IS – seqUência de inserção

Kg – quilograma

L – litro

LDBAC – Laboratório de Doenças Bacterianas

MAC – complexo *Mycobacterium avium*

MAP – *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis*

MG – Minas Gerais

mg - miligramas

mL – mililitros

μL – microlitros
NK – natural killer
NRAMP1 - gene da proteína 1 do macrófago associado à resistência natural
 n° – número
 ηg – nanogramas
 ηm – nanômetros
OADC – ácido oléico, albumina bovina, dextrose e catalase
Odds - chances
pb – pares de bases
PBS – tampão salina fosfato
PCR – Reação da Polimerase em Cadeia
pH – potencial hidrogeniônico
pmol – picomol
RC – razão de chances
RR – razão de risco
SC – Santa Catarina
SP – São Paulo
subesp. – subespécie
TBE – tris borato EDTA
Th1 - linfócitos T helper tipo 1
UFC – unidade formadora de colônia
UFV – Universidade Federal de Viçosa
UV – ultravioleta
VO - via oral
 χ^2 – teste do qui-quadrado
ZN – Ziehl-Neelsen
% - porcentagem

RESUMO

SCHWARZ, David Germano Gonçalves, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2012. **Distribuição de *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* em órgãos de camundongos C57BL/6 experimentalmente infectados.** Orientadora: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira. Coorientadores: Abelardo Silva Júnior e Laércio dos Anjos Benjamin.

Mycobacterium avium subespécie *paratuberculosis* (MAP) é o agente etiológico da paratuberculose, uma enfermidade que causa enterite granulomatosa crônica preferencialmente em ruminantes domésticos e silvestres. É considerada uma doença de impacto na economia, devido às perdas no rebanho e na saúde humana, uma vez que se têm indícios da possível relação de MAP com a doença de Crohn. Embora pesquisas tenham contribuído para avanços no diagnóstico de MAP, há carências de estudos relacionados à compreensão de sua patofisiologia. Desse modo, este estudo propôs avaliar a distribuição de MAP por meios das técnicas de nested-PCR e histologia em órgãos de camundongos C57BL/6 infectados por via intraperitoneal com a cepa MAP66115-98. Em 20 camundongos foram aplicados 250µl de inóculo contendo 3×10^8 UFC/mL e, em oito controles foram aplicados tampão fosfato-salina (PBS). Os animais foram eutanasiados aos 30, 60, 90 e 120 dias pós-inoculação. Em cada período, foram coletados baço, fígado, cólon, íleo e placas de Peyer de cinco camundongos desafiados e dois controles. O material foi dividido para avaliação molecular e histopatológica. Embora não tenham sido verificadas alterações histológicas nas lâminas coradas pela Hematoxilina Eosina, houve marcação positiva para duas placas de Peyer, referentes a 90 e 120 dias pós-inoculação, quando coradas pela técnica de Ziehl-Neelsen. Dentre os órgãos coletados, 64,9% foram positivos pela técnica molecular. Os órgãos que apresentaram maiores valores proporcionais de positividade independentemente do período de avaliação foram o baço (0,85), o cólon (0,75) e o fígado (0,60). Ao levar em consideração o tempo pós-inoculação, o baço apresentou maior proporção de positividade após 60 dias (1,00), permanecendo estável até os 120 dias, enquanto o cólon apresentou maior proporção aos 30 dias (1,00) e reduziu drasticamente aos 90 dias (0,40) da inoculação. O fígado variou entre 0,40 e 0,80 durante os quatro períodos de

avaliação e o Íleo apresentou proporção de positividade igual a 0,80 apenas aos 120 dias de inoculação. Por outro lado, as placas de Peyer não variaram significativamente a partir dos 60 dias (0,40) permanecendo com a menor proporção dentre os órgãos analisados. A avaliação da probabilidade de infecção de um órgão em relação a outro foi obtida pelo Risco Relativo, onde os maiores valores foram verificados na relação entre baço/placas de Peyer (2,00); cólon/placas de Peyer (1,74); baço/íleo (1,54) e baço/fígado (1,40). Os maiores valores de Razão de Chances foram verificados na relação entre baço/placas de Peyer (7,56); baço/íleo (4,64); baço/fígado (3,78) e cólon/íleo (2,45). Contudo, dentre todas as associações estabelecidas, apenas as relações: baço/íleo e baço/placas de Peyer foram estatisticamente significativas à nível de 95%, demonstrando que o baço foi o órgão com maior risco e chances de positividade em relação ao íleo e placas de Peyer. Assim, estes resultados podem contribuir para a melhor compreensão da distribuição de MAP em modelos experimentais durante o curso de uma infecção sistêmica, sendo o primeiro trabalho a correlacionar a capacidade infectiva da cepa MAP66115-98 nos camundongos C57BL/6 com a sua distribuição em diferentes órgãos pós-inoculação usando a via intraperitoneal.

ABSTRACT

SCHWARZ, David Germano Gonçalves, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2012. **Distribution of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in organs of C57BL/6 mice experimentally infected.** Adviser: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira. Co-advisers: Abelardo Silva Júnior and Laércio dos Anjos Benjamin.

Mycobacterium avium subspecies *paratuberculosis* (MAP) is the etiological agent of paratuberculosis, a disease which causes chronic granulomatous enteritis preferably in domestic and wild ruminants. It is characterized by intermittent diarrhea, progressive weight loss and reduced milk production. The major route of transmission is the ingestion of food and water contaminated by feces of infected animals. It is considered a disease of high economic importance, because of losses in livestock and importance in human health, since there is evidence of possible correlation of MAP with Crohn's disease. Although previous researches have contributed to advances in the diagnosis of subclinical MAP in animals, there is a lack of studies concerning the correct understanding of its pathophysiology. Thus, the aim of this study was to investigate the distribution of MAP by means of the histology and nested-PCR techniques in organs of C57BL/6 mice infected with MAP66115-98 strain at a dose of 3×10^8 CFU /mL intraperitoneally (IP). It was applied 250µl of inoculum in 20 mice, and it was applied saline phosphate buffer (PBS) in eight control species. The animals were euthanized at 30, 60, 90 and 120 days post-inoculation, and fragments of spleen, liver, colon, ileum and Peyer's patches of five mice and two control, for each period of time, were performed molecular and histopathological evaluations. Although it was not found histologic lesions in sections stained by Hematoxylin Eosin, there was a positive staining for two Peyer's patches referring to 90 and 120 days after inoculation, stained by Ziehl-Neelsen. Among the collected organs, 64.9% were positive by molecular technique. The spleen (0.85), colon (0.75) and liver (0.60) had the highest proportion of positive regardless of the evaluation period. Taking into consideration the time after inoculation, the spleen had a higher proportion of positive results after 60 days of infection (1.00), remaining stable until 120 days. The colon had a higher proportion at 30 days (1.00) and drastically reduced to 90 days

(0.40). The liver ranged between 0.40 and 0.80 during the four periods of evaluation and the ileum showed positivity ratio equal to 0.80 only at 120 days of infection. Moreover, Peyer's patches did not vary significantly (0.40) from day 60, remaining with the lowest ratio among the organs studied. The assessment of the probability of infection of an organ relative to another was obtained by the Relative Risk, where the highest values were observed in the ratio of spleen/Peyer's patches (2.00), colon/Peyer's patches (1.74), spleen/ileum (1.54) and spleen/liver (1.40). The highest odds ratio values were observed in the spleen/Peyer's patches (7.56), spleen/ileum (4.64), spleen/liver (3.78), and colon/ileum (2.45). However, among all the established associations, only the relations spleen / ileum and spleen / Peyer's patches were statistically significant at the level of 95%, showing that the spleen was the organ with higher risk and chances of positivity in relation to the ileum and Peyer's patches. Thus, these results can contribute to better understanding of the distribution of MAP in experimental models during the course of systemic infection, being this the first study to correlate the infective capacity of the strain MAP66115-98 in C57BL/6 mice with a distribution in different organs after inoculation by intraperitoneal route.

1. INTRODUÇÃO

A paratuberculose, ou doença de Johne, é uma doença causada pelo *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* (MAP) que acomete tanto ruminantes domésticos como selvagens. Caracteriza-se por uma enterite granulomatosa crônica com quadro clínico progressivo de diarreia, caquexia e morte. É considerada uma doença de importância na saúde pública, devido relatos da possível correlação de MAP com a doença de Crohn, e na economia, em decorrência das perdas produtivas no rebanho.

A principal forma de transmissão do agente é a ingestão de alimentos ou água contaminados por fezes de animais acometidos. Embora não seja muito clara a patofisiologia da paratuberculose, o micro-organismo penetra no trato gastrointestinal, invade as células M da placa de Peyer e permanece no interior de macrófagos inibindo a maturação dos fagossomos e a apoptose celular. Nessas condições, MAP se multiplica, resultando na formação de células gigantes e de granuloma tecidual, migrando para linfonodos satélites e mesentéricos, ducto torácico e circulação sistêmica, atingindo outros órgãos além daqueles de predileção.

Para compreender melhor a dinâmica de infecção, diversos estudos têm utilizado modelos experimentais para acompanhar o desenvolvimento da doença. Dentre os modelos utilizados, os murinos apresentam vantagens como baixo custo, facilidade de manejo e menor tempo experimental. As linhagens C57BL/6 e Balb/C são muito utilizadas nessas pesquisas por apresentarem a expressão de um alelo de suscetibilidade à infecção. Além de aspectos relacionados ao animal, a concentração do inóculo, a cepa e a via de inoculação são importantes.

Na infecção natural, os principais órgãos acometidos por MAP são o íleo e os linfonodos mesentéricos. Outros órgãos, como o baço e fígado, apresentam relativa importância quando se tem a evolução da infecção e o comprometimento sistêmico. A utilização de altas doses de inóculo por via oral se assemelha à inoculação experimental por via intraperitoneal, e pode levar à condição de positividade de diferentes órgãos. No entanto, esses órgãos são raramente investigados frente à sua importância condicional.

Considerando a escassez de estudos e a importância econômica e experimental de MAP, este trabalho propôs avaliar a distribuição desta bactéria pela técnica de nested-PCR e análises histopatológicas, em órgãos de camundongos C57BL/6 coletados em diferentes períodos pós-inoculação, de forma a contribuir para o melhor entendimento da relação patógeno *versus* hospedeiro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - Importância e epidemiologia

A paratuberculose ou doença de Johne é uma enfermidade crônica contagiosa do trato gastrointestinal que afeta predominantemente ruminantes domésticos e silvestres, cujo agente etiológico é o *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* (MAP) (CHIODINI et al., 1984; CLARKE, 1997; AYELE et al., 2001; MOTA et al., 2010). A doença é caracterizada por diarreia intermitente, redução da produção de leite, desidratação e emagrecimento progressivo (DRIEMEIER et al., 1999). Além de ser uma bactéria Gram-positiva, MAP tem a capacidade de resistir ao descorante álcool-ácido, devido à composição lipídica de sua parede celular, sendo chamados de Bacilos Álcool-Ácido-Resistentes (BAAR) (TIMMS et al., 2011).

A primeira descrição da doença ocorreu na Alemanha por Johne e Frothingham (1895), quando isolaram BAAR do intestino de um bovino com enterite granulomatosa crônica. Após subseqüentes alterações taxonômicas, estudos genômicos e fenotípicos demonstraram similaridades com o complexo *Mycobacterium avium*, onde Thorel et al., em 1990, propuseram alteração da nomenclatura do agente para *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis*, nome aceito e usado até os dias atuais.

No Brasil, o primeiro relato da doença foi registrado em 1915 por Octávio Dupont em bovinos da raça Flamenga importados da Bélgica para o Rio de Janeiro. Desde então, pensou-se que a doença era exótica e os casos apenas restritos aos animais importados. Contudo, Darcorso Filho et al. (1960) identificaram a doença em bovinos nascidos e criados no Brasil. Registros subseqüentes da doença foram verificados em diferentes estados brasileiros (PORTUGAL et al., 1979; RAMOS et al., 1986; DRIEMEIER et al., 1999; CARVALHO et al., 2009; COSTA et al., 2010), demonstrando que a doença ocorre em rebanhos nacionais. Atualmente, a paratuberculose é difundida em grande parte do mundo, onde em alguns países parecem

aumentar a sua prevalência com o passar dos anos (AYELE et al., 2001; KUMAR et al., 2007, FAVILA-HUMARA et al., 2010; KÜPPER et al. 2012).

Embora os animais infectados eliminem o micro-organismo preferencialmente pelas fezes (SWEENEY et al., 2006; KRALIK et al., 2012) e pelo leite (SINGH e VIHAN et al., 2004; OKURA et al., 2012), a transmissão pode ocorrer também por aerossóis (EISENBERG et al., 2011), demonstrando vias alternativas de transmissão àquelas mais frequentes. Contudo, Doré et al. (2012) reforçam ainda que o contato de animais jovens com fezes de animais adultos infectados é o principal fator de risco na transmissão de MAP.

A importância da transmissão e infecção de MAP em rebanhos de ruminantes está fundamentada, principalmente, pelo caráter subclínico da doença, onde estes animais podem permanecer nessa condição por longos períodos disseminando o agente e diminuindo substancialmente a produção de leite (JOHNSON et al., 2001; LOSINGER, 2005), além de antecipar o descarte do animal. Desse modo, as perdas econômicas podem variar consideravelmente de acordo com o país. No Brasil ainda não se têm dados quantificando as reais perdas produtivas provocadas pela paratuberculose. Nos Estados Unidos da América, Ott et al. (1999) verificaram perdas entre 200 a 250 milhões de dólares por ano nos rebanhos de bovinos leiteiros. Na Austrália, Bush et al. (2006) identificaram em rebanhos de pequenos ruminantes, perdas médias acima de 13 mil dólares fazenda/ano.

Além da importância econômica, nas últimas décadas referiu-se ainda a possibilidade de associação de MAP com a doença de Crohn (DC). A DC é uma inflamação crônica do intestino humano que acomete frequentemente o íleo e o cólon (CROHN et al., 1932), mas pode comprometer qualquer segmento do tubo digestório. Acredita-se que MAP possa ser o principal agente infeccioso relacionado com a DC, devido às similaridades clínicas e histopatológicas encontradas em pacientes com a DC e animais com paratuberculose (ILSI, 2004; ORMAECHEA et al., 2009), além da presença de MAP em pacientes humanos acometidos pela DC (BULL et al., 2003; WAGNER et al., 2011). A associação entre MAP e DC ainda não é clara, mas as comprovações da presença de MAP em leite para consumo humano refletem um potencial a ser avaliado, principalmente quando da ingestão do

leite cru (FAVILA-HUMARA et al., 2010; OKURA et al., 2012). Associado a isso, a ação patogênica de MAP ainda é inconclusiva. Pouco ainda se sabe sobre a real relação que é estabelecida entre o hospedeiro e o micro-organismo (ORMAECHEA et al., 2009). Para que se consiga aprofundar as investigações da relação de MAP na DC, e também da paratuberculose, é necessário buscar maiores informações de seu comportamento em modelos experimentais, bem como aprimorar as técnicas de diagnósticos estabelecidas.

2.2 - Patofisiologia

A patofisiologia da paratuberculose ainda não é muito clara, mas sabe-se que o desenvolvimento da doença em animais naturalmente infectados pode ser dividido em três fases distintas. Segundo Cocito et al. (1994), na fase I têm-se a infecção (forma subclínica) mas não ocorre a excreção considerável de bactérias pelas fezes. A fase II caracteriza-se pela infecção e excreção subclínica de MAP, bem como o número crescente de micro-organismos no intestino. Na fase III da infecção, tem-se a presença de diarreia crônica, o agente localizado intracelularmente e desenvolvimento de sinais clínicos que potencializam a diminuição da captação de nutrientes pelo intestino. Neste, os micro-organismos penetram através da mucosa, principalmente pelas células M, e persistem nos macrófagos subepiteliais. Nesse sentido, observa-se que os macrófagos têm grande importância para o transporte das bactérias do epitélio superficial ao interior das placas de Peyer (MOMOTANI et al., 1988). No interior dos macrófagos ocorre a multiplicação dos micro-organismos e formação de células gigantes, resultando na formação de granulomas. Após, o micro-organismo migra para linfonodos satélites e mesentéricos, ducto torácico e circulação sistêmica (HINES et al., 1995), comprometendo diferentes órgãos e intensificando o processo inflamatório intestinal. O fato de se observar maior quantidade de lesões no íleo pode ser explicado pela quantidade de tecido linfoide presente na região, onde, segundo Momotani (1988), cerca de 2/3 desse tecido está presente no íleo e os outros 1/3 na porção cranial do intestino delgado. Uma

característica interessante nos roedores é a distribuição aleatória das placas de Peyer que ocorre entre o jejuno e íleo (Figura 1) (TIZARD et al., 2002). Embora esse comportamento preferencial seja bem conhecido, Bermudez et al. (2010) comprovaram que em regiões onde se tem pequena quantidade de placas de Peyer, MAP é capaz de penetrar através dos enterócitos e promover a infecção. Segundo os mesmos autores, comumente a infecção das células dendríticas por MAP é ineficiente, contudo, uma vez que o micro-organismo atravessa a barreira epitelial, as células dendríticas passam a ser facilmente fagocíticas. Nelas, MAP pode permanecer por até 10 dias sem se replicar, sendo, portanto, um fator importante para a disseminação sequencial aos linfonodos mesentéricos (BERMUDEZ et al., 2010). A associação de MAP com as células dendríticas pode ser um dos fatores responsáveis pela rápida disseminação do agente aos linfonodos mesentéricos e íleo. Esse comportamento foi observado por Wu et al. (2007), que demonstraram rápida infecção dos linfonodos mesentéricos após uma e duas horas quando a deposição de MAP foi realizada diretamente no intestino via processo cirúrgico.

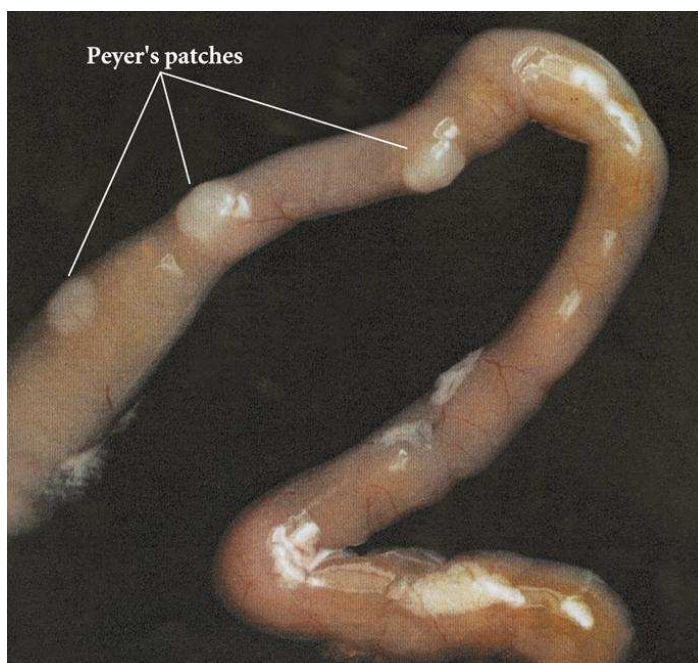


Figura 1 – Placas de Peyer de camundongos.
Fonte: <http://www.ppdictionary.com/bacteria/gnbac/enterocolitica.htm>

A habilidade de MAP penetrar no hospedeiro deve-se principalmente à capacidade de ligação da fibronectina (FN) à matriz extracelular em áreas de dano epitelial (SECOTT et al., 2002). Sabe-se que a ligação e internalização de outras micobactérias ocorrem pela dependência da interação entre a FN e proteínas ligantes de fibronectinas (FAPs). MAP também expressa uma FAP, convencionalmente denominada FAP-P, que intermedeia as ligações FN solúveis (SECOTT et al., 2001). SECOTT et al. (2004) demonstraram por experimentos “in vivo” que a FAP-P é uma adesina de opsonização e possivelmente uma invasina. Ainda, Lee et al. (2009), relatam que a FAP presente em MAP é uma proteína com alta capacidade estimulatória que induz a resposta Th1 pela estimulação da maturação de células dendríticas e produção de interleucina-12. Portanto, a predileção de MAP pelas células M é relacionada, primeiramente, à ligação por um mecanismo FN-dependente que envolve a ligação da FN e FAP-P expresso por MAP e por integrinas presentes na superfície luminal das células M (SECOTT, et al., 2004). Dentre inúmeras integrinas, a $\beta 1$ tem sido identificada como o receptor da célula hospedeira para FN-opsonizadas de micobactérias “in vitro” (BYRD et al., 1993). Ainda, as células M são as únicas dentre outras células do epitélio intestinal que apresentam em alta densidade, a integrina $\beta 1$ na face luminal (CLARK et al., 1998). Desse modo, compreende-se a maior predileção de MAP em interagir com as células M da placa de Peyer do hospedeiro.

Quando bovinos são infectados por MAP, com frequência observam-se lesões que são predominantemente encontradas no terço final do íleo. Nos ovinos essas lesões frequentemente podem se estender para o cólon e jejuno (CLARKE, 1997). Observa-se que o grau de lesão intestinal não se correlaciona com as manifestações clínicas. No entanto, estas manifestações estão substancialmente relacionadas com a carga de micro-organismos presentes nos macrófagos em determinadas áreas do intestino (CLARKE, 1997). Existe a necessidade de determinar a presença do agente nos rebanhos, pois a identificação dos animais com sinais clínicos brandos e, principalmente, os subclínicos, é fundamental para o controle e prevenção de novos casos.

2.3 - Diagnóstico

Na paratuberculose, o diagnóstico sorológico está diretamente relacionado ao estágio da infecção. Segundo Sweeney et al. (1995), nos estágios iniciais, quando se tem baixa eliminação de MAP pelas fezes, a resposta humoral está abaixo do limite de detecção. No momento em que ocorre a progressão da doença, com a apresentação clínica, a resposta humoral aumenta, bem como a liberação de MAP pelas fezes, sendo possível a detecção por testes sorológicos como ELISA. Por esse motivo, o uso de testes sorológicos se torna ineficiente para detectar anticorpos nos estágios iniciais da infecção (HARRIS e BARLETTA, 2001). Mesmo bovinos positivos para MAP na cultura, pode ocorrer cerca de 63 a 83% desses animais não reagirem pela técnica de ELISA (EAMENS et al., 2000). Contudo, estudos em rebanhos bovinos infectados têm demonstrado que animais com sinais clínicos ou positivos para MAP, tanto por cultura como por PCR, também foram positivos para ELISA (COSTANZO et al., 2012).

O diagnóstico chamado “padrão ouro” é o cultivo coprológico do micro-organismo em meio de cultura com adição de micobactina *J* (COLLINS et al., 1993). As características fenotípicas das colônias são, em parte, dependentes do tipo de meio de cultura utilizado. No Herrold gema de ovo, meio comumente utilizado no diagnóstico, as colônias são pequenas, ásperas, esbranquiçadas ou amareladas (COLLINS, 2003). Uma característica interessante de MAP é que, apesar do seu crescimento *in vivo* ser relativamente rápido, *in vitro* o surgimento das colônias é lento, necessitando aproximadamente 8 a 16 semanas de incubação a 37°C (RADOSTITS et al., 2002). MAP é dependente de micobactina *J*, que auxilia na captação de ferro pelo micro-organismo *in vitro*; porém, essa dependência não possibilita uma alternativa patognomônica para o diagnóstico, pois pode ser compartilhada em diferentes graus por outras micobactérias, como *Mycobacterium avium* subesp. *silvaticum* e algumas cepas de *Mycobacterium avium* subesp. *avium* (CLARKE, 1997), necessitando de alternativas moleculares para seu diagnóstico. Genotipicamente, MAP se distingue por apresentar 15 ou 20 cópias da sequência do elemento de inserção (IS), denominado IS900. O uso de

técnicas moleculares como a PCR se torna ferramenta importante para o diagnóstico. Contudo, foi verificado que o IS900 foi semelhantemente isolado de outras micobactérias, tal como *Mycobacterium cookii*. As colônias dessa bactéria cresceram após três semanas de incubação em temperatura de crescimento de 30⁰C, diferindo de MAP que tem temperatura ótima de 37⁰C, além das diferenças morfológicas das colônias (ENGLUND et al., 2002).

Com o sequenciamento do genoma de MAP cepa K-10 foi possível identificar 4.829,781pb, com 69,3% de guanina e citosina (G=C) (LI et al., 2005), possibilitando o surgimento e aprimoramento de diferentes técnicas e genes-alvo. Tem-se utilizado com êxito, diferentes locis, como o locus do gene *F57*, locus 255 (MÖBIUS et al., 2008) e *ISMav2* (STROMMINGER et al., 2001). Assim, a associação de *F57*, locus 255 e *ISMav2* com o IS900 seria uma alternativa para maior especificidade dos resultados. Desse modo, trabalhos que apresentem amostras positivas para IS900 são confirmados pelo sequenciamento do amplicon e/ou pelo isolamento de MAP e/ou pela amplificação de outras sequências gênicas (ENGLUND et al., 2002, CARVALHO et al., 2009). Contudo, recentes avaliações do polimorfismo da sequência IS900 revelaram que devido ao reduzido número de mutações, essa região é altamente conservada e adequada para o uso em diagnósticos moleculares (CARVALHO et al., 2012). Para aumentar a sensibilidade, tem-se utilizado a técnica de nested-PCR com oligonucleotídeos oriundos da IS900 para detectar MAP em amostras de leite (NEBBIA et al., 2006; GAO et al., 2009) e de biopsias intestinais em humanos (BULL et al., 2003; AUTSCHBACH et al., 2005).

2.4 - Modelos experimentais

Os modelos para experimentação animal podem ser variados. Os bovinos são preferencialmente utilizados nos estudos de eficiência de vacinação, intervenções medicamentosas, patofisiologia em longo prazo, resposta imune e avaliação de diagnóstico. Aparentemente, não existem comprovações significativas que confirmem a predisposição à infecção por MAP entre as raças, mas tem-se sugerido que a raça Jersey apresente maior predisposição à infecção natural (HINES et al., 2007). Quando da

infecção experimental, a principal via de inoculação nessa espécie é a oral e, em um estudo realizado por Sweeney et al. (2006) demonstrou-se que a dose mínima de $1,5 \times 10^6$ UFC/dose em dois dias consecutivos possibilitou a detecção da infecção, mas em nível baixo. No geral, doses de 5×10^8 UFC inoculadas em dois dias consecutivos resulta em infecções mais consistentes.

Semelhantemente aos bovinos, caprinos e ovinos também têm sido utilizados em infecções experimentais em estudos preferencialmente relacionados à eficiência de vacinação, patofisiologia e técnicas de diagnóstico. No Brasil, a reprodução experimental da paratuberculose em ovinos foi realizada por Silva (1968), e em caprinos por Poester e Ramos (1994), por meio de inoculação via oral de emulsões de linfonodos mesentéricos e/ou mucosa intestinal de bovinos acometidos pela paratuberculose. As doses para desafio nessas espécies variam entre 3×10^7 UFC até $2,6 \times 10^{11}$ UFC, sendo a via oral a principal via de administração (HINES et al., 2007).

Embora os caprinos e bovinos sejam os principais hospedeiros naturais de MAP, e os melhores modelos para experimentação, o custo para manutenção clínica durante o longo período de infecção torna o uso desses animais frequentemente inviável. Em média, os animais infectados precisam ser mantidos em compartimentos especializados de dois a três anos antes do aparecimento das lesões (HARRIS e BARLETTA, 2001). Por esse motivo, estudos com outros animais têm sido explorados. Vaughan et al. (2005) infectaram coelhos com 3 doses de 5×10^8 UFC em 5mL, por via oral, resultando na infecção intestinal de 25% dos animais, embora não tenha ocorrido o comprometimento de outros órgãos. Os murinos também têm sido amplamente utilizados no estudo da interação de MAP com o hospedeiro, pois apresentam suscetibilidade para infecção e promovem respostas adequadas para o desenvolvimento de reagentes imunológicos (HINES et al., 2007). Em modelos para doenças inflamatórias intestinais em humanos, os murinos também são ferramentas importantes para o estudo de aspectos distintos da doença, que são de difíceis execuções em humanos, como os mecanismos de patofisiologia e efeitos de estratégias terapêuticas (WIRTZ et al., 2007).

Devido ao baixo custo, facilidade de manejo e menor tempo experimental, diferentes linhagens de camundongos têm sido utilizadas em estudos relacionados à infecção por MAP, tais como Beige, Balb/C, C57BL/6 e C3H/HeJ (MUTWIRI et al., 1992; CHIODINI e BUERGELT, 1993; VEAZEY et al., 1995a; ROUPIE et al., 2008; CHEN et al., 2008). Dependendo da linhagem, os camundongos podem diferir na resistência ao MAP. Essa resistência está relacionada a duas formas alélicas do gene *Bcg* ou também chamado gene *NRAMP1* (*gene da proteína 1 do macrófago associado à resistência natural*), que podem interferir no grau de infecção. Esse gene atualmente denominado *Slc11A1* apresenta duas formas alélicas *Slc11A1^s* e *Slc11A1^f* que podem levar à suscetibilidade ou resistência da infecção, respectivamente (HARRIS e BARLETTA, 2001; ROUPIE et al., 2008). A suscetibilidade à infecção está relacionada a uma mutação pontual na sequência 169 do aminoácido, o qual determina uma substituição da glicina por ácido aspártico (HARRIS e BARLETTA, 2001). Tanto o C57BL/6 quanto o Balb/C apresentam o alelo *Slc11A1^s* e são suscetíveis à infecção por MAP.

Estudos utilizando linhagens C57BL/6 e Balb/C demonstraram capacidade de abrigar 10^4 a 10^7 UFC de MAP por grama em tecidos de fígado e baço por seis meses (CHIODINI e BUERGELT, 1993). A linhagem Beige é resultado de uma mutação espontânea do C57BL/6, que levou à redução de enzimas lisossomais e de células natural killer (NK) (GANGADHARAM, 1995). Por apresentarem redução da imunidade, são amplamente utilizados em pesquisas da síndrome da imunodeficiência adquirida em humanos, a fim de determinar a ação do patógeno *versus* hospedeiro no complexo *Mycobacterium avium* (MAC) (GANGADHARAM, 1995), bem como na imunopatologia da paratuberculose (MUTWIRI et al., 1992). Com frequência, a inoculação via IP na dose de 10^5 UFC resulta em lesões focais e presença de BAAR no fígado após quatro semanas da infecção (HARRIS e BARLETTA, 2001). A desvantagem da utilização de camundongos Beige, no estudo da paratuberculose é que esses animais são caros, difíceis de serem encontrados e frequentemente desenvolvem tumores de forma espontânea (COHEN et al., 1995), o que compromete o prosseguimento do estudo experimental. Por esses motivos, tem sido utilizada com frequência a linhagem C57BL/6. Chen et al. (2008) e Park et

al. (2008) têm utilizado essa linhagem para determinar a resposta imune após a aplicação de vacinas.

Chiodini e Buergelt (1993) inoculando $6,2 \times 10^8$ UFC de MAP por via IP em linhagens Balb/C, C57BL/6 e C57B/10 recuperaram por cultivo, concentrações distintas de MAP no fígado e baço. Veazey et al. (1995b) e Tanaka et al. (2000) verificaram granulomas em camundongos quando inoculados com concentrações de 3×10^{11} UFC/animal por via oral (VO) e 5×10^8 UFC/animal IP, respectivamente.

Com a finalidade de avaliar a resposta imune em relação à resistência das apresentações clínicas pela administração de suspensão de células esplênicas de Balb/C infectados por MAP em Beige/Scid, Mutwiri et al. (2002) administraram 10^6 UFC/mL IP em Balb/C desenvolvendo a infecção. Chen et al. (2008) obtiveram resultados relevantes ao avaliar a resposta imune de C57BL/6 após a inoculação de vacinas recombinantes, utilizando dose de 10^9 UFC de MAP para desafiar os camundongos. Para experimentos que buscam avaliar o comportamento de MAP durante infecção, a dose de 3×10^8 UFC/mL desenvolve lesões importantes a partir de 90 dias pós-inoculação (comunicação pessoal, Dr. Yung-Fu Chang, Cornell University. NY).

Além de todos os aspectos relacionados ao animal e ao inóculo, a escolha da cepa é importante na obtenção de resultados. Quando se busca avaliar a relação agente *versus* hospedeiro, é importante o uso de cepas com baixa passagem e relativa virulência (HINES et al., 2007), como por exemplo as cepas Linda e Ben de origem humana (ALLEN et al., 2011) e a cepa MAP66115-98 de origem bovina (CHEN et al., 2008).

3. OBJETIVOS

3.1 - Objetivo geral

Avaliar a distribuição de *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis*, cepa MAP66115-98 em órgãos de camundongos C57BL/6 inoculados por via intraperitoneal.

3.2 - Objetivos específicos

- Avaliar a infecção experimental pela via intraperitoneal em camundongos C57BL/6;
- Identificar alterações histológicas pela coloração com Hematoxilina Eosina e a presença de MAP nos diferentes órgãos pela coloração de Ziehl-Neelsen;
- Detectar MAP em diferentes órgãos pela técnica de nested-PCR; e
- Avaliar a probabilidade e chances de positividade, e as correlações destas entre os órgãos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado nos Laboratórios de Doenças Bacterianas (LDBAC), de Biologia Molecular de Micro-organismos (BIOMOL), de Morfofisiologia de Peixes e de Histopatologia, todos localizados no Departamento de Veterinária (DVT) da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Os camundongos foram obtidos do Biotério da UFV e mantidos no Infectório de Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCB), ambos localizados no DVT.

De acordo com o Art.11 da Resolução nº879/2008 do Conselho Federal de Medicina Veterinária, a pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA – UFV), sob o protocolo de número 92/2011.

4.1 - Animais

Para determinação do número de animais a ser utilizado no experimento, a análise estatística de amostragem foi realizada de acordo com Dell et al. (2002), revelando que o número adequado para análise era de 28,4 com 95% de grau de confiança. Desse modo, foram utilizadas 28 fêmeas de camundongos da linhagem C57BL/6 entre seis a oito semanas de idade, com peso entre 18 a 20g e padrão sanitário convencional (PARK et al., 2008; CHEN et al., 2008). Os animais foram mantidos no infectório por duas semanas antes de iniciar o experimento para adaptação ao novo ambiente. Foram distribuídos aleatoriamente em sete caixas de policarbonato microisoladoras (quatro animais por caixa) de aproximadamente 30x20x23cm, com cama de maravalha autoclavada, alocadas em estante com sistema de ventilação. A duração do experimento foi de cinco meses e, no curso deste, os camundongos tiveram livre acesso à alimentação e água. O alimento foi constituído por ração específica para camundongos, e a água oferecida aos animais apresentava os mesmos padrões de qualidade da água potável destinada ao consumo humano, sendo armazenada em bebedouros de policarbonato do tipo Niple. O

ambiente da sala de experimentação possuía controles de temperatura (26°C), ventilação e fotoperíodo.

As limpezas das caixas foram realizadas uma vez por semana com solução de hipoclorito a 20% e álcool etílico a 70%, além da troca da cama, reposição de água e ração. Previamente a esses procedimentos, os animais foram retirados das caixas, suspendendo-os pela base da cauda e transferidos para outra caixa higienizada, enquanto se procedia a limpeza.

4.2 - Cepa MAP66115-98

Uma cepa de MAP originado de um bovino infectado, designada MAP66115-98, gentilmente doada pelo Dr. Yung-Fu Chang, da Universidade de Cornell (EUA), foi usada para desafiar os camundongos. Esta cepa foi cultivada em caldo Middlebrook 7H9 enriquecido com OADC (ácido oléico, albumina bovina, dextrose e catalase) acrescido de 2 mg/L de micobactina J (Allied Monitor, Inc. Fayette, MO), em temperatura de 37°C durante um período de cinco semanas, onde se observou a turvação do meio inoculado comparado ao meio controle, sem o inóculo.

4.3 - Obtenção do inóculo

Transcorrido o tempo acima, a cultura foi quantificada utilizando o método comparativo de tubos da escala nefelométrica de McFarland (VERNA et al., 2007) correspondente ao tubo de número 1 e confirmada em espectrofotômetro (BIOMATE™3 Spectrophotometer, Thermo Eletron Corporation) pela densidade óptica em comprimento de onda de 600nm ($DO_{600} = 0,185$ a $0,197$). Em seguida, a cultura foi centrifugada por 5 minutos a $14000 \times g$ e o pellet lavado duas vezes em solução tampão fosfato salina (PBS, pH 7,2).

4.4 - Bioensaio

Em cada um dos 20 camundongos foi inoculado 250µL de inóculo contendo MAP66115-98 na concentração de 3×10^8 UFC/mL e, em oito

animais, 250µL de PBS estéril. As aplicações foram realizadas pela via IP no quadrante inferior direito do abdômen. Na quarta, oitava, décima segunda e décima sexta semanas pós-inoculação, cinco animais infectados e dois controles negativos foram selecionados aleatoriamente e eutanasiados. A eutanásia foi realizada pela administração de pentobarbital sódico na dose de 100mg/Kg pela via IP. Imediatamente após a eutanásia, os animais foram colocados em decúbito dorsal e necropsiados. Para cada uma das amostras a serem coletadas, foi respeitada uma mesma sequência de coleta, onde após a abertura da cavidade abdominal, coletou-se assepticamente os órgãos na seguinte ordem: fígado, baço, cólon, íleo e placas de Peyer. Cada fragmento do órgão coletado foi dividido em duas partes, sendo uma armazenada em microtubo a -20°C para análise molecular, e outra fixada em paraformaldeído a 4% para análise histopatológica.

4.5 - Histologia

Os fragmentos dos órgãos destinados à análise histopatológica foram imersos em solução fixadora de paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio pH 7,2 a 0.1M. Após, foram transferidas para álcool 70% por 24 horas. A seguir, as amostras foram colocadas em álcool 95% por quatro horas e, em álcool:resina (2-hidroxietil)-metacrilato (Historesin Embedding Kit, Leica), na proporção de 1:1, por 14 horas. Após esses procedimentos, foram imersas na resina de infiltração por 24h e, posteriormente, transferidas para a resina pura com endurecedor (bibenzolperóxido). Para que ocorresse a polimerização da resina, as amostras foram deixadas em estufa por, no mínimo 24h a 60°C. No momento em que foi observada a adequada polimerização da resina, os blocos de resina foram retirados dos poços e colados em blocos de madeira com Araldite 24h (Brascola, Joinville, SC, Brasil).

Para a microtomia, utilizou-se o micrótomo rotativo Reichert-Jung 2045 (Multicut, Germany), obtendo-se cortes seriados, com 3µm de espessura, onde para cada lâmina histológica previamente limpa e identificada foram ordenados quatro cortes. Entre cada intervalo de corte,

foram desprezados cinco outros, a fim de proporcionar maior abrangência de secções dos órgãos avaliados.

Seguindo os protocolos de colorações do Laboratório de Morfofisiologia de Peixes, foram confeccionadas duas lâminas para cada órgão, uma para a coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) para verificar as lesões e outra para coloração de Ziehl-Neelsen (ZN) para verificar a presença da bactéria. Quando da presença de alterações histopatológicas, as lesões foram classificadas segundo escores proposto por Park et al. (2008), onde: (0) sem alterações, (1) inflamação leve (menos que um pequeno granuloma por campo de 40X), (2) inflamação moderada (um a três granulomas por campo de 40X), e (3) inflamação severa (mais que três granulomas por campo de 40X).

4.6 - Nested-Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para a extração de DNA tecidual, cada fragmento dos órgãos conservados a -20°C foi envolto separadamente em papel alumínio e triturados com um pistilo. A extração foi realizada com o *Kit Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega, Madison, WI, EUA), de acordo com as indicações do fabricante. Após a obtenção do DNA, este foi conservado a -20°C em microtubo devidamente identificado. A confirmação da extração foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1% (Invitrogen, Washington, DC, EUA) em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) corado com *GelRed™* (Biotium Inc., CA) e visualizada pela incidência de luz ultra-violeta (UV).

A técnica de nested-PCR foi realizada utilizando o *Kit Go Taq® Green Master Mix* (Promega), seguindo as instruções do fabricante. Foram utilizadas duas sequências de oligonucleotídeos para a reação externa (s204 e s749) e duas sequências para a reação interna (s347 e s535) (ENGLUD et al., 1999) (Quadro 1). Para a preparação da reação externa foram utilizados 12,5µL de *Mix*, 6,5µL de água ultrapura, 1µL de cada primer (forward e reverse) na concentração de 10pmol e 4µL de DNA extraído na concentração de, aproximadamente, 200ng/µL, totalizando 25µL da reação. Em seguida, as amostras foram colocadas no termociclador (Axygen

Maxygene) e programou-se a reação segundo Englund et al. (1999), com modificações, onde o processo de desnaturação inicial ocorreu a 94°C por três minutos, seguido de subseqüentes ciclos de 94°C por um minuto, 63°C por um minuto, 72°C por um minuto e extensão final de 72°C por cinco minutos. Após o término de 35 ciclos, as amostras foram retiradas do termociclador e armazenadas a -20°C, por 12h.

Para a segunda reação de nested-PCR utilizaram-se 12,5µL de *Mix*, 9,5µL de água ultrapura, 1µL de cada primer (forward e reverse), na concentração de 10ng/µL, e 1µL do produto da primeira reação, totalizando 25µL da reação. O programa no termociclador para a segunda reação foi realizada de maneira semelhante à primeira; no entanto, apenas o procedimento de extensão final foi alterado para 72°C por 4 minutos.

Quadro 1 – Designação dos oligonucleotídeos, sequência e tamanho molecular utilizados na técnica de nested-PCR da sequência de inserção IS900 de *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* em órgãos de camundongos C57BL/6 experimentalmente infectados.

Oligonucleotídeos	Sequência 5' - 3'	Tamanho do amplicon em pb
IS900/s204	TGA TCT GGA CAA TGA CGG TTA CGG A	563
IS900/s749	CGC GGC ACG GCT CTT GTT	
IS900/s347	GCC GCG CTG CTG GAG TTG A	210
IS900/s535	AGC GTC TTT GGC GTC GGT CTT G	

Fonte: Adaptado de Englund et al. (1999).

O resultado foi verificado por eletroforese em gel de agarose a 1% (Invitrogen, Washington, DC, EUA) em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) corado com *GelRedTM* (Biotium Inc., CA) diluído 1:500, utilizando-se radiação UV em transluminador *Eagle Eye II* (Stratagene, La Jolla, CA, EUA).

Para o controle positivo da reação, utilizou-se a cepa de MAP K-10 e água ultrapura para o negativo. No controle negativo do experimento foi utilizado o DNA dos respectivos órgãos dos animais inoculados com PBS. O marcador de peso e tamanho molecular foi o DNA Ladder 100pb (Promega, Madison, USA).

4.7 - Análise estatística

As diferenças nas frequências de positividade obtidas pela técnica de nested-PCR foram analisadas pelo teste do qui-quadrado (χ^2) de Pearson ($p < 0,05$). Para verificar a força de associação existente entre as amostras significativas, foi utilizado o teste “V” de Cramer. Para essas análises, foi utilizado o software SPSS – *Statistical Package for the Social Science* para Windows, versão 19.0 (IBM SPSS Statistics Inc, Chicago, USA).

Para avaliação de medidas de associação entre os órgãos, as proporções de positividade foram submetidas à análise de Risco Relativo, que trata-se de uma razão de probabilidades (NUNES e CARMEY, 2009) e de Razão de Chances ou *Odds ratio*, juntamente com os seus respectivos intervalos de confiança ($p < 0,05$). Para a realização dos cálculos, construção dos gráficos e tabelas, utilizou-se uma planilha de cálculos formatada no software EXCEL 2007.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Infecção de camundongos C57BL/6 pela cepa MAP66115-98

Os animais inoculados apresentaram-se clinicamente saudáveis nos 120 dias de experimentação. Esse comportamento era esperado, devido os murinos não serem os hospedeiros preferenciais de MAP, mesmo utilizando uma linhagem C57BL/6 suscetível. HINES et al. (2007), relataram em seu trabalho que a manifestação clínica da paratuberculose é difícil nessas espécies. A linhagem do camundongo utilizado nesse experimento (C57BL/6) apresenta a expressão de um alelo que resulta na sua suscetibilidade à infecção por MAP, o *Slc11A1^s* (ROUPIE et al., 2008). Além disso, em outros estudos, essa linhagem demonstrou ser imunocompetente e também suscetível a infecção (CHIODINI e BUERGELT, 1993; VEAZEY et al., 1995a; VEAZEY et al., 1995b; PARK et al., 2008; CHEN et al., 2008). Contudo, Chiodini e Buerger (1993) trabalhando com camundongos Balb/C, C57BL/6 e C57B/10 não observaram progressão da infecção em nenhuma dessas linhagens quando inoculados por via IP. De forma semelhante, quando realizada a inoculação por VO em camundongos C57BL/6, Veazey et al. (1995b) não verificaram alterações nos sinais clínicos mesmo após 11 meses de experimentação. Ao utilizar a linhagem Balb/C e a via intragástrica, Hamilton et al. (1991) conseguiram reproduzir os sinais clínicos apenas quatro meses após a inoculação. A utilização de camundongos gnotobióticos com sistema imunoregulatório deprimido pode vir a ser uma alternativa para estudos que busquem correlacionar as manifestações clínicas e a progressão da doença em modelos murinos.

Na necropsia dos camundongos aos 30, 60, 90 e 120 dias pós-inoculação não foram observadas alterações macroscópicas que poderiam estar relacionadas à infecção por MAP. Isto não era esperado, visto que trabalhos utilizando a mesma linhagem de camundongos, a mesma via de inoculação e a mesma cepa de MAP em concentração de 10^9 UFC, reproduziram lesões granulomatosas no baço após quatro semanas de

inoculação e, no fígado após oito semanas de inoculação (PARK et al., 2008; CHEN et al., 2008).

No presente estudo foi utilizada uma concentração menor de inóculo (3×10^8 UFC) e esperava-se que pelo menos aos 90 e 120 dias pós-inoculação, os animais apresentassem alterações macroscópicas como aumento do tamanho do baço e espessamento das paredes intestinais. Essas apresentações macroscópicas foram observadas por Tanaka et al. (1994) em camundongos Balb/C e C3H/HeJ, inoculados pela via IP na dose de 5×10^8 UFC/animal. Contudo, Chiodini e Buergelt (1993) inoculando por via IP $6,2 \times 10^8$ UFC de MAP, verificaram ausência de lesão em camundongos Balb/C, mas presença de lesões esbranquiçadas multifocais no fígado e baço nos camundongos C57BL/6 e C57B/10. Segundo os mesmos autores, essas lesões encontradas nos camundongos C57BL/6 foram diminuindo no decorrer dos 120 dias de experimento. De maneira similar, um estudo com a mesma via de inoculação e linhagem de camundongos, diferindo na cepa (ATCC 19698) e na dose de inóculo (1×10^9 UFC), constataram presença de granulomas no fígado, pulmão e linfonodos mesentéricos aos 15 dias pós-inoculação (VEAZEY et al., 1995a).

Nesse trabalho os animais foram desafiados entre seis e oito semanas de idade. Quando se busca o estudo da paratuberculose em modelos experimentais, a inoculação em animais jovens se torna importante, pois mimetiza as condições de suscetibilidade natural do animal (HINES et al., 2007). No geral, para experimentação em murinos, pesquisadores têm utilizado a faixa etária de seis a oito semanas para experimentação (VEAZEY et al., 1995a; PARK et al., 2008; CHEN et al., 2008; ROUPIE et al., 2012). Portanto, pode-se inferir que existem outros fatores responsáveis pela resistência à infecção de MAP, que ainda não são conhecidos nesses modelos e que poderiam ser responsáveis pela manifestação de lesões macroscópicas.

5.2 - Avaliação histopatológica

A análise dos cortes dos órgãos corados por HE não revelaram alterações estruturais que indicassem lesões teciduais. Esperavam-se

lesões características da paratuberculose, principalmente no baço e no fígado, pois estudos têm demonstrado que esses órgãos são preferencialmente acometidos quando se tem uma infecção disseminada induzida pela inoculação por via IP (PARK et al., 2008; CHEN et al., 2008). Segundo Begg e Whittington (2008), a inoculação IP é a via mais comum usada em animais de laboratório e, nessa via, a avaliação geralmente direciona-se à contagem de bactérias nos órgãos ou à averiguação da presença de lesões histológicas principalmente no baço e no fígado e, em alguns casos, no intestino. A ausência de lesões histológicas e de BAAR também não foram demonstrados por Sweeney et al. (2006), em bovinos infectados pela VO, embora as amostras teciduais fossem positivas pela técnica de PCR. Contudo, Stabel et al. (2009) verificaram lesões na válvula íleo-cecal e início do jejuno, formação de granulomas multifocais com macrófagos epitelióides e células gigantes na lâmina própria e submucosa de bovinos inoculados por via IP. Em um estudo realizado em 1991 por Hamilton et al., somente após oito meses da inoculação intragástrica da cepa de MAP de origem humana (Linda) os camundongos Balb/C apresentaram severa formação de granulomas com presença de macrófagos modificados, células epitelióides e células gigantes contendo grande quantidade de BAAR no intestino, fígado e baço. No presente estudo, o tempo total de experimentação foi de quatro meses e a cepa utilizada foi de origem bovina. Embora tenham-se estudos que constataram lesões histológicas no fígado e no baço de camundongos C57BL/6 infectados por via IP, no período de 16 semanas (CHIODINI e BUERGELT, 1993; VEAZEY et al., 1995a; CHEN et al., 2008; PARK et al., 2008), possivelmente, para a dose de 3×10^8 UFC/mL aplicada nos camundongos deste estudo, o período de experimentação não foi suficiente para que houvesse a apresentação das lesões histológicas nesses órgãos.

Apesar de não terem sido observadas lesões histológicas nos cortes corados por HE, duas lâminas de placas de Peyer, coradas por ZN, apresentaram marcação positiva pela técnica (Figura 2).

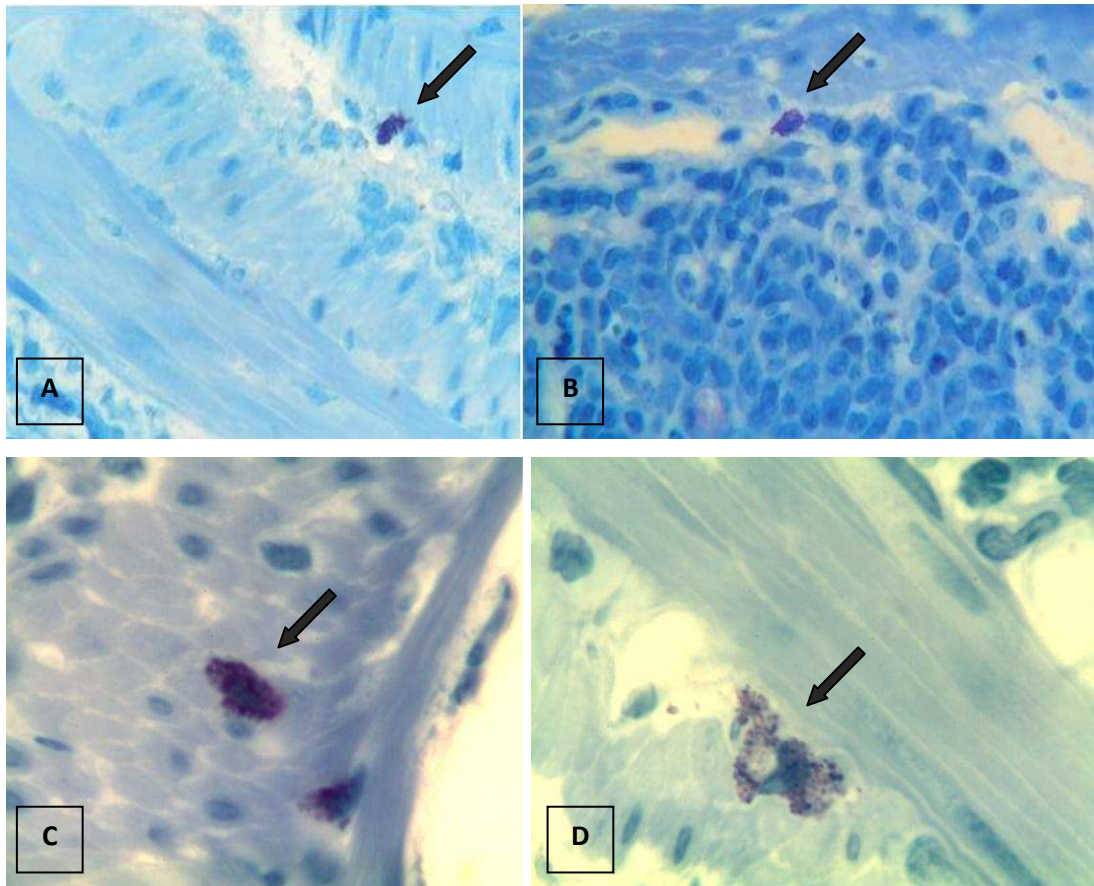


Figura 2 – Marcação positiva de macrófagos de camundongos C57BL/6 inoculados por via intraperitoneal com dose de 3×10^8 UFC/mL de MAP66115-98 utilizando a coloração de Ziehl-Neelsen. Placas de Peyer 90 dias pós-inoculação 400x (A) e 1000x (D); Placa de Peyer 120 dias pós-inoculação 400x (B) e 1000x (C).

Na figura 2, as fotomicrografias demonstram macrófagos corados pela técnica de ZN, onde é visualizado o macrófago corado de azul e estruturas em suas extremidades coradas de róseo que se assemelham à MAP. Essas marcações foram identificadas em duas placas de Peyer de dois animais, uma coletada aos 90 dias e a outra 120 dias pós-inoculação. A marcação observada (corados de róseo), poderia se referir à uma possível invasão inicial de MAP às placas de Peyer. Frequentemente, a identificação de MAP está correlacionada à presença de granulomas nos órgãos lesionados, mas estas estruturas não foram observadas neste trabalho. Deve-se levar em consideração que há maior facilidade de visualização do agente quando há presença de alterações histopatológicas. No entanto, Stabel et al. (2009) não constataram a presença de micro-organismos BAARs em cortes histológicos de órgãos de bovinos infectados com MAP, demonstrando, que em alguns casos pode ser possível apenas a visualização das lesões histológicas, e

não de MAP. Um recente estudo realizado por Allen et al. (2011) não identificou lesões significativas em órgãos de bovinos inoculados por meio de cânula introduzida diretamente no íleo, mas demonstrou abundante BAARs em células gigantes multinucleadas nesse mesmo órgão. Nesse sentido, parece que a marcação do micro-organismo pode ocorrer em órgãos que apresentam lesões ou não, o qual condiz com os nossos achados, revelando que possivelmente MAP tem predileção pelas placas de Peyer, mesmo quando inoculado por via IP. Esses resultados não corroboram com os encontrados por Park et al. (2008) onde, ao desafiar camundongos C57BL/6, pela mesma via, constataram grande concentração de BAARs no fígado e baço, mas não identificaram nos pulmões e linfonodos mesentéricos. Em coelhos inoculados por VO, não foram evidenciadas lesões intestinais pela microscopia, nem foi possível isolar MAP dos tecidos (VAUGHAN et al., 2005).

5.3 - Detecção de *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* por Nested-PCR

Verificou-se a presença de DNA de MAP (IS900) pela amplificação de fragmentos de 210pb em 64,9% das amostras coletadas. O baço apresentou maior número de positivos (27,9%) seguido do cólon (24,6%), fígado (19,7%), íleo (18,0%) e placas de Peyer (9,8%). Dentre os 30, 60, 90 e 120 dias pós-inoculação, pelo menos duas amostras de cada órgão foram positivas em cada um dos períodos (Tabela 1). Na figura 3 são apresentadas as amplificações de IS900 em cinco órgãos aos 120 dias pós-inoculação, pela técnica de nested-PCR.

O maior número de amostras positivas encontradas no baço e fígado era esperado, pois quando se faz a inoculação IP, o baço e fígado, como órgãos linfoides têm grande relevância na resposta a um antígeno. Sabe-se que os camundongos C57BL/6 expressam um gene de suscetibilidade de infecção para MAP, o *Slc11A1^s*. Essa característica permitiu que Roupie et al. (2008) encontrassem predominância de MAP após 30 dias de inoculação em camundongos dessa mesma linhagem ao ser comparada à linhagens que expressam o gene de resistência *Slc11A1^r*, quando infectados por via

intravenosa. Hines et al. (2007) verificaram que quando altas doses de inóculo são administradas por VO, essa via de inoculação se assemelha à via IP, resultando em alta carga do micro-organismo no fígado e baço.

Tabela 1 – Resultado da nested-PCR em diferentes órgãos de camundongos C57BL/6, pós-inoculação da cepa MAP66115-98 por via intraperitoneal.

Período pós-inoculação	Animal	Fígado	Baço	Cólon	Íleo	Placas de Peyer
30 dias	1	+	+	+	-	ND
	2	+	-	+	+	ND
	3	+	+	+	-	ND
	4	+	-	+	+	ND
	5	-	-	+	-	ND
60 dias	6	+	+	+	+	+
	7	+	+	+	-	-
	8	-	+	-	+	+
	9	-	+	+	+	-
	10	-	+	+	-	-
90 dias	11	+	+	+	+	-
	12	+	+	+	+	-
	13	+	+	-	-	-
	14	-	+	-	-	+
	15	+	+	-	-	+
120 dias	16	+	+	+	-	-
	17	-	+	+	+	ND
	18	+	+	-	+	-
	19	-	+	+	+	+
	20	-	+	+	+	+

(+) positivos para MAP pela nested-PCR/ (-) negativos para MAP pela nested-PCR/(ND) amostras não determinadas.

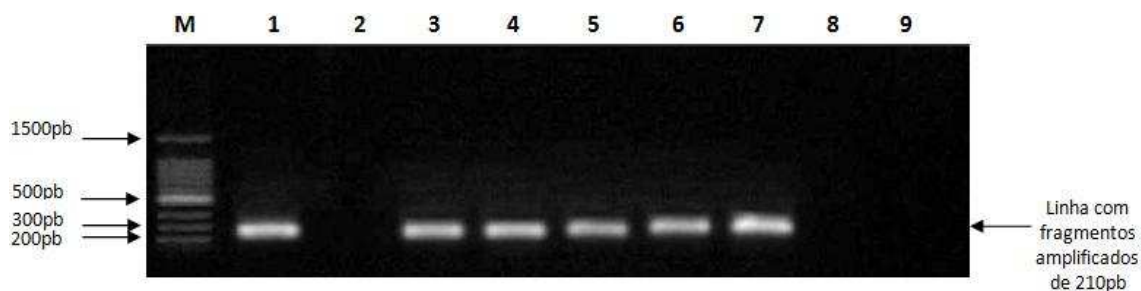


Figura 3 – Produtos de nested-PCR em gel de agarose 1%. M- marcador de tamanho molecular de 100pb: DNA Ladder; 1- controle positivo: K-10; 2- controle negativo: água ultrapura; 3, 4, 5, 6 e 7 – amostras amplificadas de fígado, baço, cólon, íleo e placa de Peyer, respectivamente, após 120 dias de inoculação da cepa MAP66115-98; 8 e 9 – amostras de animais controles (inoculados com tampão fosfato-salina).

Nas placas de Peyer, seis amostras foram positivas (9,8%) e, dentre essas, duas corresponderam às marcações positivas observadas pela técnica de ZN (Figura 2). Os resultados verificados pela técnica de nested-PCR indicam que mesmo não havendo lesões histológicas nos órgãos, a presença de MAP não pode ser descartada. Esse comportamento pode ter ocorrido devido a uma baixa quantidade de MAP distribuídas nos órgãos. Quantidades limitadas de micro-organismo nos tecidos resultam em baixa sensibilidade a diferentes testes, inclusive de PCR convencional (ENGLUND et al., 1999). No presente trabalho, o uso da nested-PCR demonstrou ser adequado para avaliar a positividade de amostras de tecidos, com baixa presença de micro-organismo.

5.3.1 - Avaliação dos órgãos para probabilidade de positividade

Na avaliação da proporção de resultados positivos por grupo de órgão, independentemente do período pós-inoculação, constatou-se variação da frequência, onde o baço apresentou 0,85 de positividade, seguido do cólon (0,75), fígado (0,60), íleo (0,55) e placas de Peyer (0,43) (Figura 4). Para esta análise deve-se mencionar que os limites da proporção compreendem os valores “0” e “1”.

Pela análise do qui-quadrado (χ^2) foi verificado que o fígado, baço e cólon apresentaram significância estatística ($p < 0,05$). Ao contrário, o íleo e placas de Peyer não foram significativos ($p > 0,05$). A positividade encontrada nos três primeiros órgãos não aconteceu por razão do acaso. Houve relevância estatística na verificação da positividade. Isto era esperado para o baço e fígado, que são órgãos que direta ou indiretamente estão envolvidos na resposta à presença de bactéria no sangue, mas não para o cólon, onde sua maior probabilidade de positividade seria esperada numa inoculação por VO.

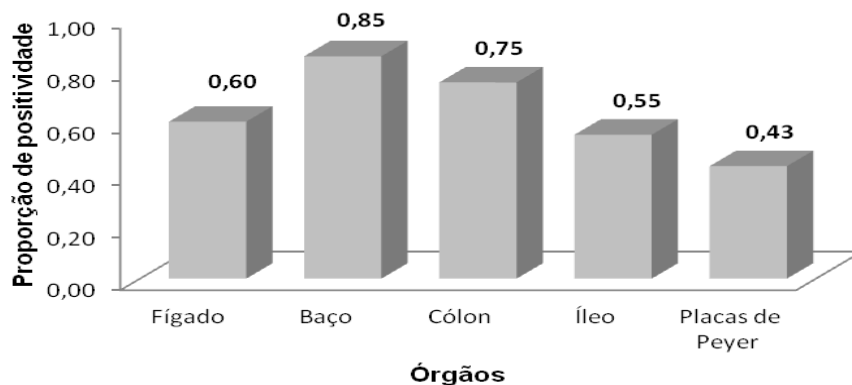


Figura 4 – Proporção de órgãos positivos de camundongos C57BL/6 inoculados com 3×10^8 UFC/mL de cepa MAP66115-98 por via intraperitoneal, após 120 dias de inoculação.

Com base nos resultados desses órgãos que deram significância estatística, foi aplicado o teste “V” de Cramer para verificar a força de associação existente entre as amostras e a positividade desses órgãos. Em relação ao tamanho do efeito, o teste “V” de Cramer foi de 0,684 no baço, 0,571 no cólon e 0,558 no fígado, indicando um tamanho de efeito médio e estatisticamente significativo ($p < 0,05$). Portanto, ao contrário do que se observa na infecção natural (PAVLIK et al., 2000), na infecção IP o intestino não foi o órgão de predileção para detecção de sua presença. Assim, pode-se afirmar que o órgão com maior força de associação foi o baço, seguido do cólon e fígado. A relevância estatística observada principalmente no baço e fígado indica a reprodução de uma distribuição sistêmica, pois quando se inocula um agente infeccioso na cavidade abdominal, o peritônio responde a essa agressão séptica envolvendo sua membrana serosa, as alças intestinais e o líquido peritoneal presente na cavidade (TRAMONTE et al., 2004). Esse líquido peritoneal é drenado por vasos linfáticos presentes na face inferior do diafragma, que por sua vez captam partículas de até $20 \mu\text{m}$, incluindo bactérias, que são levadas até o ducto torácico direito, sequencialmente atingindo a circulação sanguínea. Em outras palavras, o peritônio permite que materiais presentes no seu líquido sejam absorvidos e promovam alterações sistêmicas (CARNEIRO et al., 2002). Recentemente foi comprovada a presença de MAP em linfa de bovinos naturalmente infectados (KHOL et al., 2012), indicando que a via linfática é importante na disseminação do agente. Por esses motivos, pode-se inferir que a

inoculação IP permitiu que MAP atingisse preferencialmente os vasos linfáticos, levando à sua rápida distribuição para outros órgãos além daqueles de predileção quando da infecção natural, como o baço e fígado.

O baço possui uma capacidade fagocítica muito superior ao fígado (MARQUES e PETROIANU 2003). Desse modo, o maior valor proporcional de positividade obtido no baço (0,85) em relação aos outros órgãos deve-se principalmente a sua função depurativa do sangue, que concentra o maior número de bactérias dentro de macrófagos localizados na polpa vermelha. Essa inferência corrobora com Marques e Petroianu (2003) que, ao trabalharem com peritonite em camundongos, identificaram altas concentrações de bactérias no sangue de animais esplenectomizados.

Na figura 5 é apresentada a proporção de positividade de cada órgão nos diferentes períodos pós-inoculação.

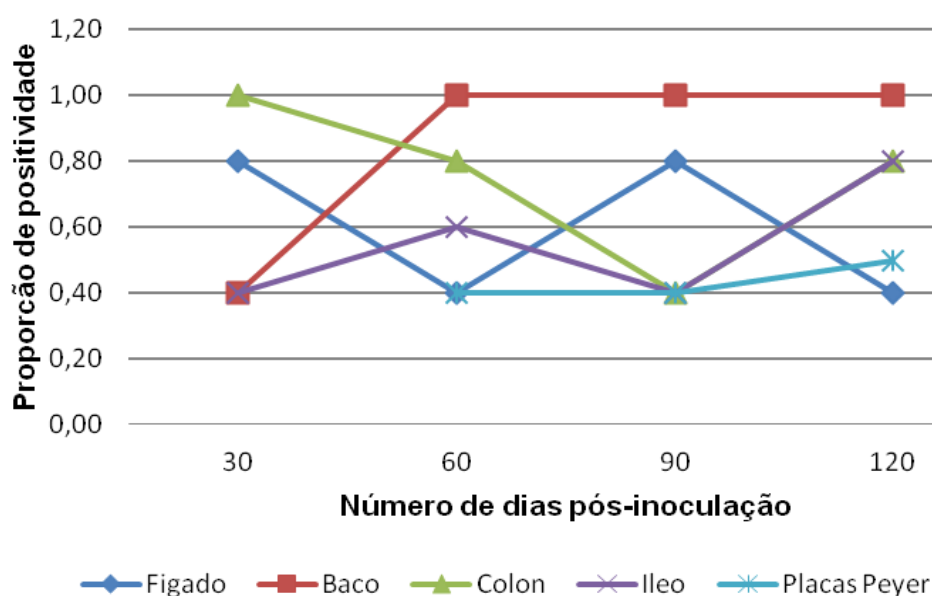


Figura 5 – Proporção de órgãos positivos de camundongos C57BL/6 inoculados com 3×10^8 UFC/mL de cepa MAP66115-98 por via intraperitoneal, em relação aos dias pós-inoculação

Pode-se observar que o fígado variou entre 0,40 e 0,80 durante os períodos do experimento. Em contrapartida, o baço iniciou, aos 30 dias, com proporção de amostras positivas de 0,40 passando para 1,00 de positividade a partir dos 60 dias até os 120 dias. Resultado semelhante foi constatado por Roupie et al. (2008) ao infectarem camundongos C57BL/6 por via

intravenosa. Neste, tanto o baço quanto o fígado apresentaram quantidades significativas de MAP aos 30 dias pós-inoculação, onde o baço permaneceu estável durante os subsequentes 90 dias de experimentação. Ao contrário, no fígado o número de bactérias diminuiu drasticamente ao longo desses 90 dias.

O cólon iniciou com positividade 1,00, mas teve uma queda substancial, passando para 0,40 aos 90 dias e elevando essa proporção para 0,80 aos 120 dias. O maior número proporcional de positivos no cólon não era esperado aos 30 dias pós-inoculação. Ao utilizar a via IP, esperava-se que apenas o baço e o fígado obtivessem maior proporção de positivos durante todos os tempos de avaliação, haja vista serem órgãos diretamente relacionados à depuração sanguínea. Aos 30 dias de infecção, a proporção de positivos no íleo foi de 0,40 e, aos 120 dias, aumentou o dobro do valor do primeiro mês da coleta. Em relação às placas de Peyer, foi observado valor inicial igual a "0" aos 30 dias pós-inoculação, devido às perdas das amostras coletadas referente à esse período. Contudo, mesmo ocorrendo esse viés, houve pouca variação de positividade para esse órgão dos 60 aos 120 dias, permanecendo os menores valores proporcionais dentre os demais órgãos. Foi observado que no segundo e no terceiro mês da coleta essa proporção foi mantida a 0,40, elevando-se sutilmente para 0,50 aos 120 dias.

Os resultados deste trabalho demonstram que, apesar dos órgãos parenquimatosos, baço e fígado, apresentarem valores proporcionalmente elevados comparados ao íleo, em todos os quatro períodos de avaliação não ocorreram ausência de positivo para o cólon e íleo. Esse dado corrobora os resultados encontrados por Pavlik et al. (2000), onde a avaliação de amostras bovinas provenientes de abatedouro não constatou o isolamento de MAP em órgãos exclusivamente parenquimatosos ou linfonodos não mesentéricos. Ainda, Bermudez et al. (2010) demonstraram após 30 dias de inoculação em camundongos C57BL/6, usando a VO, maior quantidade de MAP no intestino comparado ao fígado e baço. Contudo, no nosso trabalho, aos 60 e 120 dias verificou-se um aumento moderado da disseminação em amostras desses dois órgãos, predominando no intestino. Portanto, MAP poderia estar presente no intestino independentemente da via de infecção.

Para verificar a probabilidade de positividade em determinado órgão condicionada ao tempo pós-inoculação, foi utilizada a análise de probabilidade condicional ou Bayesiana, onde o numerador é representado pelo número de positivos por período e o denominador o número total de positivos entre os períodos de avaliação do mesmo órgão. Estas análises revelaram diferenças importantes de probabilidades no decorrer do tempo de análise experimental (Tabela 2).

Tabela 2 – Probabilidade condicional em relação ao tempo pós-inoculação de diferentes órgãos de camundongos C57BL/6 infectados pela via intraperitoneal com a cepa MAP66115-98.

Órgão	Tempo pós-infecção (dias)	Número de amostras	Positivo	Negativo	Probabilidade condicional (%)
Fígado	30	5	4	1	33,3
	60	5	2	3	16,7
	90	5	4	1	33,3
	120	5	2	3	16,7
Baço	30	5	2	3	11,8
	60	5	5	0	29,4
	90	5	5	0	29,4
	120	5	5	0	29,4
Cólon	30	5	5	0	33,3
	60	5	4	1	26,7
	90	5	2	3	13,3
	120	5	4	1	26,7
Íleo	30	5	2	3	18,2
	60	5	3	2	27,3
	90	5	2	3	18,2
	120	5	4	1	36,4
Placas de Peyer	30*	ND	ND	ND	0,0
	60	5	2	3	33,3
	90	5	2	3	33,3
	120	4	2	2	33,3

(*) Cinco amostras não determinadas/ (ND) no tempo 30 dias pós-inoculação.

O fígado, como observado na avaliação proporcional, também apresentou variação na probabilidade condicional durante todos os períodos pós- inoculação do experimento. Na tabela 2, pode-se verificar que sua maior probabilidade de positividade ocorreu aos 30 e 90 dias (33,3%). Em relação ao baço, sua probabilidade de ter sido positivo aos 30 dias é a menor dentre todos os outros órgãos, com apenas 11,8%. Contudo, é

observado que a partir dos 60 dias, essa probabilidade se estabiliza em 29,4% até os 120 dias de experimento. Tendo conhecimento da frequente positividade do baço em infecções sistêmicas, alguns estudos têm direcionado a coleta do baço e fígado de camundongos Balb/C e C57BL/6 para comprovar a efetividade de infecção (ROUPIE et al., 2012).

Para o cólon, a maior probabilidade foi constatada aos 30 dias pós-inoculação (33,3%) e a menor foi aos 90 dias (13,3%). Quando analisado o íleo, este apresentou o maior valor de probabilidade condicional: 36,4%, aos 120 dias pós- inoculação e a mesma probabilidade (18,2 %) aos 30 e 60 dias. No caso das placas de Peyer, a probabilidade de serem positivas a partir dos 60 dias foi praticamente a mesma durante os períodos subsequentes (33,3%). Esses resultados contrapõem os obtidos por Stabel et al. (2009) pois, ao avaliar partes do intestino de bovinos experimentalmente infectados por via IP, constataram que o íleo, válvula íleo-cecal e os linfonodos associados a essas estruturas foram os mais frequentemente positivos pela técnica PCR. De forma semelhante, Sweeney et al. (2006) relataram que MAP foi mais frequentemente encontrado no jejuno, íleo e seus linfonodos correspondentes. No entanto, esses autores não incluíram em suas análises órgãos parenquimatosos, sendo o principal órgão de eleição de infecção natural por MAP o íleo, por apresentar maior associação de tecido linfoide comparado a outros tecidos (MOMOTANI, 1988). No presente trabalho, essa predileção não foi observada usando a via IP. Ao contrario do que comumente é relatado, o íleo e as placas de Peyer, neste trabalho não foram proporcionalmente significativos na detecção de MAP pela técnica de nested-PCR em relação aos outros órgãos. No entanto, aos 120 dias, a probabilidade de encontrar íleo positivo foi maior comparado aos demais órgãos.

De acordo com estudo realizado por Sweeney et al. (2006), as culturas positivas de tecidos extra-intestinais (baço e tonsilas) de bovinos infectados por VO ocorreram nas dosagens mais elevadas do inóculo, $2,5 \times 10^{10}$ UFC, e com três aplicações. Esses resultados e de outros anteriormente relatados, inferem a possibilidade do baço ser o órgão de eleição para comprovar a infecção sistêmica de MAP por experimentação ou mesmo em casos de infecções naturais em que se deseja investigar a

abrangência da infecção. Contudo, segundo os dados aqui apresentados, essa detecção se torna eficiente apenas a partir dos 60 dias pós-inoculação. Para detecção da positividade aos 30 dias, foi demonstrado que o fígado e o cólon obtiveram maiores probabilidades de estarem positivos e, portanto, serem de predileção para a detecção precoce nesses modelos experimentais. Esse comportamento pode ser em parte explicado pela região onde se incidiu a inoculação (quadrante lateral direito), o qual permitiria o maior contato com estes órgãos.

Os resultados desse trabalho demonstraram que há necessidade de investigar a importância de outros órgãos além dos gastrointestinais quando se deseja avaliar a distribuição de MAP, uma vez que se comprovou a possibilidade de positividade experimental desses órgãos. Pavlik et al. (2000) identificaram infecções de órgãos além dos gastrointestinais, em 10% das amostras de tecidos bovinos. Semelhantemente, Sweeney et al. (2006) identificaram cultura positiva para MAP em amostras de ceco, cólon e linfonodos ileocecais de bovinos inoculados com dose elevada do inóculo ($2,5 \times 10^{10}$ UFC/dose com duas aplicações). Esses mesmos autores relatam ainda que doses baixas como de 2×10^5 UFC/dose, não resultaram na detecção de infecção nos tecidos. No presente trabalho, ao utilizar uma única aplicação de 3×10^8 UFC/mL foi possível detectar MAP utilizando a técnica de nested-PCR e obter positividade em diferentes órgãos dos camundongos, mas não foi possível detectar a infecção.

Observou-se que o número de casos positivos foi obtido em todos os períodos do experimento (Tabela 2). No caso do íleo (36,4%) e da placa de Peyer (33,3%), a probabilidade desses órgãos se tornarem positivos foi maior nos 120 dias pós-inoculação. Essa característica está relacionada à capacidade de MAP interagir com os macrófagos e neles, inibir a maturação dos fagossomos, limitando a destruição da bactéria e a apresentação dos antígenos às células T (COUSSENS et al., 2012). MAP também é capaz de prevenir a apoptose espontânea ou induzida, de macrófagos infectados (KABARA et al., 2010). Segundo Coussens et al. (2012), esses mecanismos podem explicar a grande quantidade de MAP presentes no interior de macrófagos que persistem infectados preferencialmente no intestino. Desse

modo, a infecção por MAP permanece crônica e o nível de detecção nos órgãos tende a aumentar com o decorrer do tempo.

5.3.2 - Avaliações dos órgãos por medidas de associação

Na tabela 3, a avaliação de risco do baço, em relação ao fígado, cólon, íleo e placas de Peyer, resultou em 1,4; 1,13; 1,54; e 2,0 vezes mais probabilidade de positividade, respectivamente. O risco de positividade no cólon foi 1,25 maior que no fígado, 1,37 maior que no íleo e 1,74 vezes maior que na placas de Peyer. Para o fígado o maior risco foi identificado apenas comparado à placas de Peyer (1,4 vezes). Ao relacionar a probabilidade do fígado e do íleo serem positivos, foi observado valor igual a 1,09, muito próximo de 1,00 ou seja, a probabilidade desses órgãos é praticamente a mesma.

Tabela 3 – Probabilidade e Risco Relativo (RR) de positividade quanto a ação de MAP66115-98 segundo os órgãos positivos de camundongos C57BL/6 infectados pela via intraperitoneal.

Órgão	Probabilidade de positividade conforme órgão	RR fígado	RR baço	RR cólon	RR íleo	RR placas de Peyer
Fígado	0,60	1,00	0,70	0,80	1,09	1,40
Baço	0,85	1,40	1,00	1,13	1,54	2,00
Cólon	0,75	1,25	0,88	1,00	1,37	1,74
Íleo	0,55	0,91	0,64	0,73	1,00	1,27
Placas de Peyer	0,43	0,71	0,50	0,57	0,78	1,00

Diferentemente do que ocorre nos bovinos, a presença das placas de Peyer em roedores ocorre aleatoriamente entre o jejuno e o íleo (TIZARD et al., 2002). Ao avaliar o íleo e a placas de Peyer, que são órgãos que apresentam maior predileção natural de infecção por MAP, foi observado que dentre todos os órgãos comparados, a maior probabilidade de positividade do íleo ocorreu quando comparado à placa de Peyer (1,27 vezes mais risco). Esse resultado pode ser em parte explicado pela via de infecção, pois ao induzir uma distribuição sistêmica, a probabilidade de positividade das placas de Peyer diminui substancialmente devido sua área

de superfície ser menor comparado ao íleo. Esse fato foi confirmado quando verificou-se que os valores de risco para a infecção de placas de Peyer foram inferiores aos a todos os órgãos correlacionados.

As avaliações de chances (*odds*) de positividade entre os órgãos, estimada pela Razão de Chances (RC) ou *odds ratio*, estão apresentadas na tabela 4. O uso dessa ferramenta no estudo da paratuberculose geralmente está relacionada à busca de fatores de risco associados às práticas de manejo aplicadas aos rebanhos e à presença anterior da doença entre os rebanhos (KOBAYASHI et al., 2007; ANSARI-LARI et al., 2009). No entanto, não se tem relatos de estudos correlacionando a probabilidade de positividade experimental e as chances de determinados órgãos serem positivos de acordo com o tempo pós-inoculação.

Tabela 4 – Chances e Razão de Chances (RC) de positividade quanto a ação de MAP66115-98 segundo os órgãos positivos de camundongos C57BL/6 infectados pela via intraperitoneal

Órgão	Chances de positividade conforme órgão	RC fígado	RC baço	RC cólon	RC íleo	RC placas de Peyer
Fígado	1,50	1,00	0,26	0,50	1,23	2,00
Baço	5,67	3,78	1,00	1,89	4,64	7,56
Cólon	3,00	2,00	0,53	1,00	2,45	4,00
Íleo	1,22	0,81	0,22	0,41	1,00	1,63
Placas de Peyer	0,75	0,50	0,13	0,25	0,61	1,00

O baço (5,67), cólon (3,00) e fígado (1,50) apresentaram as maiores chances de positividade para a cepa MAP66115-98, quando inoculados por via IP.

A análise por RC demonstrou que o baço em relação ao fígado, íleo e placas de Peyer apresentou 3,78; 4,64 e 7,56 vezes mais chances de positividade, respectivamente. O cólon apresentou comportamento semelhante para avaliação de chances quando comparado com esses mesmos órgãos. O cólon em relação ao fígado, íleo e placas de Peyer apresentou 2,00; 2,45 e 4,00 vezes mais chances de ser positivo. Esses resultados foram próximos dos encontrados na RC de um estudo realizado por Autschbach et al. (2005) em pacientes humanos acometidos pela DC,

onde verificou-se associação 2,88 vezes (IC 95%, 1,00 – 8,99) do cólon ser positivo pela técnica de nested-PCR. Por outro lado, o fígado demonstrou maiores chances de infecção quando comparado ao íleo (1,23 vezes mais chances) e à placa de Peyer (2,00 vezes mais chances). Quando avaliado o íleo, este obteve maior chance somente quando comparado exclusivamente à placas de Peyer. Sua chance de positividade foi de 1,63 vezes a chance das placas de Peyer. Desse modo, pode-se ainda inferir que, para cada amostra de placas de Peyer positiva para MAP haveria quase duas amostras de íleo infectadas.

Os resultados de RR e RC com seus respectivos intervalos de confiança (IC) para nível de significância de 5% são apresentados na tabela 5. Ao analisar os valores obtidos de associação dos órgãos, observou-se que os IC, que compreenderam valores acima de 1,00 foram as associações entre: baço/íleo e baço/placas de Peyer. Portanto, essas associações foram consideradas estatisticamente significativas. Não houve diferença entre as demais associações.

Tabela 5 – Relação entre órgãos que apresentaram Risco Relativo (RR) e Razão de Chances (RC) acima de 1,00, e seus respectivos Intervalos de Confiança (IC) com 95% de significância.

Relação entre órgãos	RR	IC (95%)	RC	IC (95%)
Fígado/Íleo	1,09	(0,64 - 1,86)	1,23	(0,35 - 4,30)
Fígado/Placas de Peyer	1,40	(0,72 - 2,73)	2,00	(0,5 - 7,94)
Baço/Fígado	1,40	(0,95 - 2,08)	3,78	(0,87 - 16,45)
Baço/Cólon	1,13	(0,83 - 1,55)	1,89	(0,39 - 9,14)
Baço/Íleo*	1,54	(1,02 - 2,33)	4,64	(1,09 - 19,81)
Baço/Placas de Peyer*	2,00	(1,18 - 3,33)	7,56	(1,63 - 35,01)
Cólon/Fígado	1,25	(0,81 - 1,93)	2,00	(0,52 - 7,65)
Cólon/Íleo	1,37	(0,86 - 2,16)	2,45	(0,65 - 9,26)
Cólon/Placas de Peyer	1,74	(0,98 - 3,12)	4,00	(0,96 - 16,74)
Íleo/Placas de Peyer	1,27	(0,64 - 2,59)	1,63	(0,41 - 6,44)

(*) estatisticamente significativos

Esperava-se que o baço apresentasse maior força de associação em relação aos demais órgãos. Contudo, o cólon e o fígado, que também obtiveram altos valores proporcionais de positividade, não apresentaram o mesmo comportamento. Em parte, esse resultado se deve ao número de amostras relativamente baixo utilizadas para obtenção do IC. No entanto, respeitando os delineamentos bioéticos, onde se estabelece o número reduzido de animais para experimentação, obtivemos resultados importantes entre as associações baço/íleo e baço/placas de Peyre, demonstrando que mesmo com número reduzido de amostras, essas relações foram significativas.

Embora as outras associações de órgãos não demonstraram serem significativas ao IC de 95%, os resultados obtidos são importantes pois estabelecem um indicativo do comportamento da probabilidade e das chances de positividade para as amostras deste trabalho. Possivelmente, um aumento sutil no número de amostras poderiam tornar essas associações significativas.

Portanto, em estudos que se desejam utilizar a via IP para infecção, possivelmente a coleta de fragmentos do íleo e placas de Peyer não sejam adequadas para confirmar a positividade de MAP. Entretanto, o baço por apresentar maiores risco e chances de positividade, demonstrou ser um órgão importante para avaliação da efetividade de inoculação por via IP.

5.4 - Considerações finais

Desde a primeira detecção da paratuberculose em 1895, evoluíram as pesquisas relacionadas à detecção do agente etiológico e o controle da doença nos rebanhos mundiais, consideravelmente. No entanto, estudos referentes à compreensão de sua patofisiologia ainda são incipientes, devido a falta de uma espécie animal padrão como modelo experimental, e inúmeros fenômenos desencadeados durante a infecção ainda não estarem bem claros.

Esta pesquisa propôs avaliar a distribuição de MAP em diferentes órgãos por meio da inoculação de uma cepa virulenta pela via intraperitoneal

em camundongos C57BL/6 que expressam gene de suscetibilidade para a infecção por MAP.

Neste estudo, a ausência de sinais clínicos e de lesões histológicas nos órgãos analisados (fígado, baço, cólon, íleo e placas de Peyer) nos diferentes períodos de coleta não foi atribuída exclusivamente à ausência de MAP. A positividade encontrada nesses órgãos, pela técnica de nested-PCR, demonstrou DNA de MAP ao longo dos 120 dias de experimento. Foi verificado ainda, que a infecção IP induziu uma distribuição sistêmica de MAP nos camundongos, resultando em uma alta positividade do baço e do fígado. Desse modo, a detecção de DNA de MAP em amostras de baço e fígado demonstrou ser fundamental para avaliar a distribuição do agente no curso da infecção. Dentre todos os órgãos analisados, o baço apresentou superioridade na proporção dos positivos, após 60 dias de inoculação. Ao contrário do que se verifica em uma infecção natural, o íleo e as placas de Peyer tiveram as menores proporções de positividade. Em relação à probabilidade de positividade durante o período experimental, o íleo teve a maior probabilidade apenas aos 120 dias pós-inoculação. O baço apresentou a maior proporção de positivos seguido do cólon. Ao contrário do íleo, esse órgão demonstrou ter alta probabilidade de ser positivo. Esses resultados demonstram que MAP pode modificar seu padrão de positividade entre os órgãos, possivelmente devido a capacidade de permanecerem no interior dos macrófagos, retardando sua apresentação ao sistema imune do hospedeiro e, permitindo uma maior distribuição entre os órgãos.

Ao correlacionar os órgãos em relação ao risco e às chances de positividade, valores estatisticamente significativos foram verificados nas associações baço/íleo e baço/placas de Peyer. É razoável considerar que os resultados de Risco Relativo e de Razão de Chances, obtidos nesse estudo, poderão contribuir para a melhor compreensão da distribuição de MAP em modelos experimentais durante o curso de uma infecção sistêmica.

Estes resultados servirão para melhor compreensão da distribuição de MAP em diferentes tempos pós-inoculação e servirão de suporte para futuras pesquisas que busquem o melhor entendimento da interação do patógeno vs hospedeiro. Este estudo é o primeiro a correlacionar a capacidade infectiva da cepa MAP66115-98 em camundongos C57BL/6 com

a sua distribuição entre diferentes órgãos abdominais após a inoculação intraperitoneal.

6. CONCLUSÕES

✓ Não foram verificadas alterações macroscópicas e microscópicas nos órgãos de camundongos C57BL/6 infectados pela via IP com a cepa MAP66115-98.

✓ Duas placas de Peyer, uma coletada aos 90 dias e outra aos 120 dias pós-inoculação tiveram marcação positiva de macrófagos pela técnica de Ziehl-Neelsen e positividade pela nested-PCR.

✓ Foi possível detectar MAP em 64,9% dos órgãos de camundongos por meio da técnica de nested-PCR.

✓ Independentemente do período de infecção, o baço, cólon e fígado apresentaram superioridade nas proporções de positivities.

✓ Verificaram-se diferenças nas proporções de positividade do baço, fígado, cólon, íleo e placas de Peyer em relação aos tempos analisados pós-inoculação.

✓ O cólon apresentou maior proporção de positividade aos 30 dias pós-inoculação diminuindo aos 90 dias. O baço iniciou com essa proporção aos 30 dias e permaneceu com a maior proporção ao longo do experimento em relação aos demais órgãos.

✓ Íleo e placas de Peyer apresentaram as menores proporções de positividade ao longo do período do experimento.

✓ O fígado e o cólon apresentaram mesma probabilidade de serem positivos aos 30 dias de inoculação, e o íleo tornou-se positivo apenas aos 120 dias.

✓ Os maiores valores de RR foram verificados nas relações entre baço/placas de Peyer, cólon/placas de Peyer, baço/íleo e baço/fígado. Na RC os maiores valores foram encontrados nas relações baço/placas de Peyer, baço/íleo, baço/fígado e cólon/íleo. Contudo, apenas as relações baço/placas de Peyer e baço/íleo apresentaram nível de significância de 5%.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, A.J.; PARK, K.; BARRINGTON, G.M.; LAHMERS, K.K.; ABDELLRAZEQ, G.S.; RIHAN, H.M.; SREEVATSAN, S.; DAVIES, C.; HAMILTON, M.J.; DAVIS, W.C. Experimental infection of a bovine model with human isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.141, p.258-266, 2011.

ANSARI-LARI, M.; HAGHKHAH, M.; BAHRAMY, A.; BAHERAN, A.M.N. Risk factors for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in fars province (Southern Iran) dairy herds. **Tropical Animal Health and Production**, v.41, p.553-557, 2009.

AUTSCHBACH, F.; EISOLD, S.; HINZ, U.; ZINSE, S.; LINNEBACHER, M.; GIESE, T.; LÖFFLER, T.; BÜCHLER, M.W.; SCHMIDT, J. High prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* IS900 DNA in gut tissues from individuals with Crohn's disease. **Inflammatory Bowel Disease**, v.54, p.944-949, 2005.

AYELE, W.Y; MACHACKOVA, M; PAVLIK, I. The transmission and impact of paratuberculosis infection in domestic and wild ruminants. **Veterinary Medicine - Czech**, v.46, p.205-224, 2001.

BEGG, D.J.; WHITTINGTON, R.J. Experimental animal infection models for Johne's disease, an infectious enteropathy caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **The Veterinary Journal**, v.176, n.2, p.129-145, 2008.

BERMUDEZ, L.E.; PETROFSKY, M.; SOMMER, S.; BARLETTA, R.G. Peyer's patch-deficient mice demonstrate that *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* translocates across the mucosal barrier via both M Cells and enterocytes but has inefficient dissemination. **Infection and immunity**, v.78, n.8, p.3570-3577, 2010.

BULL, T.J.; MCMINN, E.J.; SIDI-BOUMEDINE, K.; SKULL, A.; DURKIN, D.; NEILD, P.; RHODES, G.; PICKUP, R.; HERMON-TAYLOR, J. Detection and verification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fresh ileocolonic mucosal biopsy specimens from individuals with and without Crohn's disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.7, p.2915-2923, 2003.

BUSH, R.R.; WINDSOR, P.A.; TORIBIO, J.A. Losses of adult sheep due to ovine Johne's disease in 12 infected flocks over a 3-year period. **Australian Veterinary Journal**, v.84, n.7, p.246-253, 2006.

BYRD, S.R.; GELBER, R.; BERMUDEZ, L.E. Roles of soluble fibronectin and beta 1 integrin receptors in the binding of *Mycobacterium leprae* to nasal epithelial cells. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v.69, p.266-271, 1993.

CARNEIRO, B.G.M.C.; PETROIANU, A.; RODRIGUES, F.H.O.C.; ROCHA, R.F. Estudo Comparativo entre diversos tipos de tratamento para peritonite fecal em rato. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.29, n.1, p.43-48, 2002.

CARVALHO, I.A.; SILVA JR, A.; CAMPOS, V.E.B.; MOREIRA, M.A.S. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* by polymerase chain reaction in bovine milk in Brazil. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.5408-5410, 2009.

CARVALHO, I.A.; SILVA, V.O.; VIDIGAL, P.M.P.; SILVA JUNIOR, A.; MOREIRA, M.A.S. Genetic evaluation of IS900 partial sequence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Brazilian isolates from bovine milk. **Tropical Animal Health and Production**, 2012, DOI 10.1007/s11250-012-0117-1.

CHEN, L.H.; KATHAPERUMAL, K.; HUANG, C.J.; MCDONOUGH, S.P.; STEHMAN, S.; AKEY, B.; HUNTLEY, J.; BANNANTINE, J.P.; CHANG, C.F.; CHANG, Y.F. Immune responses in mice to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* following vaccination with a novel 74F recombinant polyprotein. **Vaccine**, v.26, p.1253-1262, 2008.

CHIODINI, R.; VAN KRUININGEN, H.; MERKAL, R. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. **Cornell Veterinarian**, v.74, p. 218-262, 1984.

CHIODINI, R.J.; BUERGELT, C.D. Susceptibility of Balb/c, C57/B6 and C57/B10 mice to infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. **Journal of Comparative Pathology**, v.109, p 309-319, 1993.

CLARK, M.A.; HISRT, B.H.; JEPSON, M.A. M-cell surface beta1 integrin expression and invasion-mediated targeting of *Yersinia pseudotuberculosis* to mouse Peyer's patch M cells. **Infection and Immunity**, v.66, p.1237-1243, 1998.

CLARKE, C.J. The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. **Journal of Comparative Pathology**, v.116. p.217-261, 1997.

COCITO, C.; GILOT, P.; COENE, M.; KESEL, M.; POUPART, P.; VANNUFFEL, P. Paratuberculosis. **Clinical microbiology reviews**, v.7, p.328-345, 1994.

COHEN, Y.; PERRONNE, C.; LAZARD, T.; TRUFFOT-PERNOT, C.; GROSSET, J.; VILDE, J.; POCIDALO, J. Use of normal C57BL/6 mice with established *Mycobacterium avium* infections as an alternative model for evaluation of antibiotic activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.39, n.3, p.735-738, 1995.

COLLINS, D.M.; STEPHENS, D.M.; DE LISLE, G.W. Comparison of polymerase chain reaction tests and faecal culture for detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine faeces. **Veterinary Microbiology**, v.36, p.289-299, 1993.

COLLINS, M.T. Update on paratuberculosis: 1. Epidemiology of Johne's disease and the biology of *Mycobacterium paratuberculosis*. **Irish Veterinary Journal**, v.56, n.11, p.565-574, 2003.

COSTA, J.C.M.; PIERI, F.A.; SOUZA, C.F.; ESPESCHIT, I.F.; FELIPPE, A.G.; SANTOS, G.M.; TOBIAS, F.L.; SILVA JÚNIOR, A.; MOREIRA, M.A.S. Levantamento sorológico de *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis* em bovinos leiteiros no estado do Espírito Santo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.6, p.1491-1494, 2010.

COSTANZO, G.; PINEDO, F.A.; MONA, M.L.; VIALE, M.; GIL, A.; ILLIA, M.C.; GIOFFRÉ A.; ARESE, A.; TRAVERÍA G.; ROMANO, M.I. Accuracy assessment and screenin of a dairy herd with paratuberculosis by three different ELISAs. **Veterinary Microbiology**, v.156, p.183-188, 2012.

COUSSENS, P.M.; SIPKOVSKY, S.; MURPHY, B.; ROUSSEY, J.; COLVIN, C.J. Regulatory T cells in cattle and their potential role in bovine paratuberculosis. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.35, n.3, p.233-239, 2012.

CROHN B.B, GINZBURG L, OPPENHEIMER J. Regional ileitis. **Journal of the American Medical Association**, v.99, p.1232-9, 1932.

DACORSO FILHO, P.; CAMPOS, I.O.N.; FARIA, J.F.; LANGENEGGER, J. Doença de Johne (paratuberculose) em bovinos nacionais. **Arquivos do Instituto Biológico Animal**, v.3, p.129-139, 1960.

DELL, R.; HOLLERAN, S.; RAMAKRISHNAN, R. Sample size determination. **ILAR Journal**, v.43, p.207-213, 2002.

DORÉ, E.; PARÉ, J.; CÔTÉ, G.; BUCZINSKI, S.; LABRECQUE, O.; ROY, J.P.; FECTEAU, G. Risk factors associated with transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* to calves within dairy herd: a systematic review. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.26, p.32-45, 2012.

DRIEMEIER, D.; CRUZ, C.E.F.; GOMES, M.J.P.; CORBELLINI, L.G.; LORETTI, A.P.; COLODEL, E.M. Aspectos clínicos e patológicos da paratuberculose em bovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.19, n.3-4, p.109-115, 1999.

EAMENS, G.J.; WHITTINGTON, R.J.; MARSHA, I.B.; TURNERA, M.J.; SAUNDERS, V.; KEMSLEY, P.D.; RAYWARD, D. Comparative sensitivity of various faecal culture methods and ELISA in dairy cattle herds with endemic Johne's disease. **Veterinary Microbiology**, v.77, p.357-367, 2000.

EISENBERG, S.W.F.; KOETS, A.P.; NIELEN, M.; HEEDERIK, D.; MORTIER, R.; DE BUCK, J.; ORSEL, K. Intestinal infection following aerosol challenge of calves with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. **Veterinary Research**, v.42, n. 117, p.1-8, 2011.

ENGLUND, S.; PORDÁNY, A.B.; LSKE, G.B.; JOHANSSON, K.E. Single PCR and nested PCR with a mimic Molecule for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.33, p.163-171, 1999.

ENLUND, S.; BÖLSKE, G.; JOHANSSON, K.E. An IS900-like sequence found in a *Mycobacterium* sp. other than *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **FEMS Microbiology Letters**, v.209, n.2, p.267-271, 2002.

FAVILA-HUMARA, L.C.; CHÁVEZ-GRIS, G.G.; CARRILLO-CASAS, E.M.; HERNÁNDEZ-CASTRO, R. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* detection in individual and bulk tank milk samples from bovine herds and caprine flocks. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.7, n.4, p.351-355, 2010.

GANGADHARAM, P.R.J. Beige mouse model for *Mycobacterium avium* complex disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.39, p.1647-1654, 1995.

GAO, A.L.; ODUMERU, J.; RAYMOND, M.; HENDRICK, S.; DUFFIELD, T.; MUTHARIA, L. Comparison of milk culture, direct and nested polymerase chain reaction (PCR) with fecal culture based on samples from dairy herds infected with *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.73, p.58-64, 2009.

HAMILTON, H.L.; COOLEY, A.J.; ADAMS, J.L.; CZUPRYNSKI, C.J. *Mycobacterium paratuberculosis* monoassociated nude mice as a paratuberculosis model. **Veterinary Pathology**, v.28, p.146-155, 1991.

HARRIS, N.B.; BARLETA, R.G. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. **Clinical microbiology Reviews**, v.14, p. 489-512, 2001.

HINES, M.E., KREEGER, J.M., HERRON, A.J. Mycobacterial infections of animals: pathology and pathogenesis. **Laboratory Animal Science**, v.45, p.334-351, 1995.

HINES, M.E.; STABEL, J.R.; SWEENEY, R.W.; GRIFFIN, F.; TALAAT, A.M.; BAKKER, D.; BENEDICTUS, G.; DAVIS, W.C.; DE LISLE, G.W.; GARDNER, I.A.; JUSTE, R.A.; KAPUR, V.; KOETS, A.; MCNAIR, J.; PRUITT, G.; WHITLOCK, R.H. Experimental challenge models for Johne's disease: a review and proposed international guidelines. **Veterinary Microbiology**, v.122, p.197-222, 2007.

ILSI - International Life Sciences Institute. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) and the food chain. 2004, 35p.

JOHNE, H.A.; FROTHINGHAM, L. Ein eigenthümlicher fall von tuberkulose beim rinde, [A peculiar case of tuberculosis in a cow]. **Deutsche Zeitschrift für Tiermedizin und Vergleichende Pathologie**, v.21, p.438-454, 1895.

JOHNSON, Y.J.; KANEENE, J.B.; GARDINER, J.C.; LLOYD, J.W.; SPRECHER, D.J.; COE, P.H. The effect of subclinical *Mycobacterium paratuberculosis* infection on milk production in Michigan dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.84, n.10, p.2188-2194, 2001.

KABARA, E.A.; KLOSS, C.C.; WILSON, M.R.; SREEVATSAN, S.; JANAGAMA, H.; COUSSENS, P.M. A large-scale study of differential gene expression in macrophages infected with several strains of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. **Brief Funct Genomic Proteomic**, v.9, n.3, p.220-237, 2010.

KHOL, J.L.; PINEDO, P.J.; BUERGELT, C.D.; NEUMANN, L.M.; BAUMGARTNER, W.; RAE, D.O. The collection of lymphatic fluid from the bovine udder and its use for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the cow. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.24, n.1, p.23-31, 2012.

KOBAYASHI, S.; TSUTSUI, T.; YAMAMOTO, T.; NISHIGUCHI, A. Epidemiologic Indicators associated with within-farm spread of Johne's disease in dairy farms in Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**. v.69, n.12, p.1255-1258, 2007.

KRALIK, P.; BERAN, V.; PAVLIK, I. Enumeration of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by quantitative real-time PCR, culture on solid media and optical densitometry. **BMC Research Notes**, v.5, n.114, p.1-5, 2012.

KUMAR. P.; SINGH, S.V.; BHATIYA, A.K.; SEVILLA, I.; SINGH, A.V.; WHITTINGTON, R.J.; JUSTE, R.A.; GUPTA, V.K.; SINGH, P.K.; SOHAL, J.S.; VIHAN, V.S. Juvenile Capri-paratuberculosis (JCP) in India: incidence and characterization by six diagnostic tests. **Small Ruminant Research**, v.73, p.45-53, 2007.

KÜPPER, J.; BRANDT, H.; DONAT, K.; ERHARDT, G. Heritability estimates for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* status of German Holstein cows tested by fecal culture. **Journal of Dairy Science**, v.95, n.5, p.2734-2739, 2012.

LEE, J.S.; SHIN, S.J.; COLLINS, M.T.; JUNG, I.D.; JEONG, Y.L.; LEE, C.M.; SHIN, Y.K.; KIM, D.; PARK, Y.M. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* fibronectin attachment protein activates dendritic cells and induces a Th1 polarization. **Infection and immunity**, v.77, n.7, p.2979-2988, 2009.

LI, L.; BANNANTINE, J.P.; ZHANG, Q.; AMONSIN, A.; MAY, B.J; ALT, D.; BANERJI, N.; KANJILAL, S.; KAPUR, V. The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America (PNAS)**, v.102, n. 35, p.12344-12349, 2005.

LOSINGER, W.C. Economic impact of reduced milk production associated with Johne's disease on dairy operations in the USA. **Journal of Dairy Research**, v.72, p.425-432, 2005.

MARQUES, R.G.; PETROIANU, A. Infecção fulminante pós-esplenectomia. **Arquivos de Gastroenterologia**, v.40, n.1, p.47-54, 2003.

MÖBIUS, A.; HOTZEL, H.; RAßBACH, A.; KÖHLER, H. Comparison of 13 single-round and nested PCR assays targeting IS900, ISMav2, f57 and locus 255 for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **Veterinary Microbiology**, v.126, p.324-333, 2008.

MOMOTANI, E.; WHIPPLEA, L.; THIERMANN, B.; CHEVILLE, N.F. Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches in calves. **Veterinary Pathology**, v.25, p.131-137, 1988.

MOTA, R.A; PEIXOTO, P.V; YAMASAKI, E.M; MEDEIROS, E.S; COSTA, M.M; PEIXOTO, R.M; BRITO, M.F. Ocorrência de paratuberculose em búfalos (*Bubalus bubalis*) em Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.3, p.237-242, 2010.

MUTWIRI, G.K.; BUTLER, D.G.; ROSENDAL, S.; YAGER, J. Experimental infection of severe combined immunodeficient Beige mice with *Mycobacterium paratuberculosis* of bovine origin. **Infection and immunity**, v.60, n.10, p.4074-4079, 1992.

NEBBIA, P.; ROBINO, P.; ZOPPI, S.; DE MENEGHI, D. Detection and excretion pattern of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in milk of asymptomatic sheep and goats by Nested-PCR. **Small Ruminant Research**, v.66, p.116-120, 2006.

NUNES, L.N.; CARMEY, S.A. Por dentro da estatística – Probabilidade, risco ou chance? **Einstein – Educação Continuada em Saúde**, v.7, n.4, p.175-176, 2009.

OKURA, H.; TOFT, N.; NIELSEN, S.S. Occurrence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk at dairy cattle farms: A systematic review and meta-analysis. **Veterinary Microbiology**, v.157, n.3-4, p.253-263, 2012.

ORMAECHEA, J.I.; GISBERT, J.P.; MARÍN-JIMÉNEZ, I. Papel de *Mycobacterium avium paratuberculosis* em la etiopatogenia de la enfermedad de Crohn. **Gastroenterología y Hepatología**, v.32, p.353-363, 2009.

OTT, S.L.; WELLSB, S.J.; WAGNERA, B.A.; Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. **Preventive Veterinary Medicine**, v.40 p.179-192, 1999.

PARK, S.U.; KATHAPERUMAL, K.; MCDONOUGH, S.; AKEY, B.; HUNTLEY, J.; BANNANTINE, J.P.; CHANG, Y.F. Immunization with a DNA vaccine cocktail induces a Th1 response and protects mice against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* challenge. **Vaccine**, v.26, p.4329-4337, 2008.

PAVLIK, I.; MATLOVA, L.; BARTL, J.; SVASTOVA, P.; DVORSKA, L.; WHITLOCK, R. Parallel faecal and organ *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* culture of different productivity types of cattle. **Veterinary Microbiology**, v.77, p.309-324, 2000.

POESTER, F.P.; RAMOS, E.T. Infecção experimental em caprinos com *Mycobacterium paratuberculosis* de origem bovina. **Ciência Rural**, v.24, p.333-337, 1994.

PORTUGAL, M.A.S.C; PIMENTEL, J.N.; SALIBA, A.M.; BALDASSI, L.; SANDOVAL, E.F.D. Ocorrência de paratuberculose no Estado de Santa Catarina. **O Biológico**, v.4, p.19-24, 1979.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. **Clínica Veterinária: Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1737p.

RAMOS, E.T.; POESTER, F.P.; CORREA, B.L.; OLIVEIRA, S.J.; RODRIGUES, N.C.; CANABARRO, C.E. Paratuberculose em bovinos no estado do Rio Grande do Sul. **A Hora Veterinária**, v.6, n.34, p.28-32, 1986.

ROUPIE, V.; ROSSEELS, V.; PIERSOEL, V.; ZINNIEL, D.K.; BARLETTA, R.G.; HUYGEN, K. Genetic resistance of mice to *Mycobacterium paratuberculosis* is influenced by *Slc11a1* at the early but not at the late stage of infection. **Infection and immunity**, v.76, p.2099-2105, 2008.

ROUPIE, V.; VIART, S.; LEROY, B; ROMANO, M; TRINCHERO, N.; GOVAERTS, M.; LETESSON, J.J.; WATTIEZ, R.; HUYGEN, K. Immunogenicity of eight *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* specific antigens in DNA vaccinated and Map infected mice. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.145, p.74-85, 2012.

SECOTT, T.E., LIN, T.L., WU, C.C. Fibronectin attachment protein homologue mediates fibronectin binding by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **Infection and Immunity**, v.69, p.2075-2082, 2001.

SECOTT, T.E.; LIN, T.L.; WU, C.C. Fibronectin attachment protein is necessary for efficient attachment and invasion of epithelial cells by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **Infection and Immunity**, v.70, n.5, p.2670-2675, 2002.

SECOTT, T.E.; LIN, T.L.; WU, C.C. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* fibronectin attachment protein facilitates M-Cell targeting and invasion through a fibronectin bridge with host integrins. **Infection and immunity**, v.72, n.72, p.3724-3732, 2004.

SILVA, N.M. Estudos sobre a paratuberculose. IV. Infecção experimental de ovino com *Mycobacterium paratuberculosis* de origem bovina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.3, p.285-289, 1968.

SINGH, S.V. VIHAN, V.S. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in goat milk. **Small Ruminant Research**, v.54, p.231-235, 2004.

STABEL, J.R.; PALMER, M.V.; HARRIS, B.; PLATTNER, B.; HOSTETTER, J.; ROBBE-AUSTERMAN, S. Pathogenesis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in neonatal calves after oral or intraperitoneal experimental infection. **Veterinary Microbiology**, v.136, p.306-313, 2009.

STROMMINGER, B.; STEVENSON, K.; GERLACH, G.F. Isolation and diagnostic potential of ISMav2, a novel insertion sequence-like element from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **FEMS Microbiology Letters**, v.196, p.31-37, 2001.

SWEENEY, R.W.; UZONNA, J.; WHITLOCK, R.H.; HABECKER, P.L.; CHILTON, P.; SCOTT, P. Tissue predilection sites and effect of dose on *Mycobacterium avium* subs. *paratuberculosis* organism recovery in a short-term bovine experimental oral infection model. **Research in Veterinary Science**, v.80, p.253-259, 2006.

SWEENEY, R.W.; WHITLOCK, R.H.; BUCKLEY, C.L.; SPENCER, P.A. Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.7, p.488-493, 1995.

TANAKA, S.; ITOHARA, S.; SATO, M.; TANIGUCHI, T.; YOKOMIZO, Y.; Reduced formation of granulomata in gamma(delta) T cell knockout BALB/c mice inoculated with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **Veterinary Pathology**, v.37, p.415-421, 2000.

TANAKA, S.; SATO, M.; TANIGUCHI, T.; YOKOMIZO, Y. Histopathological and morphometrical comparison of granulomatous lesions in BALB/c and C3H/HeJ mice inoculated with *Mycobacterium paratuberculosis*. **Journal of Comparative Pathology**, v.110, p.381-388, 1994.

THOREL, M.F; KRICHEVSKY, M; LEVY-FREBAULT, V.V; Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. *nov.*, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. *nov.*, and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. *nov.* **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.40, p.254-260, 1990.

TIMMS, V.J.; GEHRINGER, M.M.; MITCHELL, H. M.; DASKALOPOULOS, G.; NEILAN, B.A. How accurately can we detect *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection? **Journal of Microbiological Methods**, v.85, p.1-8, 2011.

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária – Uma introdução**. 6.ed. São Paulo: Roca, 2002.

TRAMONTE, R.; CARVALHO, R.O.M.; FARIAS, D.C.; SERAFIM, J.D.M.; ORTELLADO, D.K.; D'ACAMPORA, A.J. Alterações da mucosa intestinal em ratos: estudo morfométrico em três diferentes tratamentos após indução experimental de sepse abdominal aguda. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.19, n.2, p.120-125, 2004.

VAUGHAN, J.A.; LENGHAUS, C.; STEWART, D.J.; TIZARD, M.L.; MICHALSKI, W.P. Development of a Johne's disease infection model in laboratory rabbits following oral administration of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. **Veterinary Microbiology**, v.105, p.207-213, 2005.

VEAZEY, R.S.; TAYLOR, H.W.; HOROHOV, D.W.; KRAHENBUHL, J.L.; OLIVER, J.L.; SNIDER, T.G. Histopathology of C57BL/6 mice inoculated orally with *Mycobacterium paratuberculosis*. **Journal of Comparative Pathology**, v.113, p.75-80, 1995b.

VEAZEY, R.S.; HOROHOV, D.W.; KRAHENBUHL, J.L.; TAYLOR, H.W. OLIVER, J.L.; SNIDER, T.G. Comparison of the Resistance of C57/BL6 and C3H/He Mice to Infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. **Veterinary Microbiology**, v.47, p.79-87, 1995a.

VERNA, A.E.; GARCIA-PARIENTE, C.; MUNÓZ, M.; MORENO, O.; GARCÍA-MARIN, J.F.; ROMANO, M.I.; PAOLICCHI, F.; PÉREZ, V. Variation in the immuno-pathological responses of lambs after experimental infection with different strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **Zoonoses Public Health**, v.54, p.243-252, 2007.

WAGNER, J.; SIM, W.; BISHOP, R.F.; CATTO-SMITH, A.G.; CAMERON, D.J.; KIRKWOOD, C.D. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in children with early-onset Crohn's disease: A longitudinal follow-up study. **Inflammatory Bowel Disease**, v.17, p.1825-1826, 2011.

WIRTZ, S.; NEUFERT, C.; WEIGMANN, B.; NEURATH, M.F. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. **Nature Protocols**, v.2, n.3, p.541-546, 2007.

WU, C.; LIVESEY, M.K.; SCHMOLLER, S.; MANNING, E.J.B.; STEINBERG, H.; DAVIS, W.C.; HAMILTON, M.J.; TALAAT, A.M. Invasion and persistence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* during early stages of Johne's disease in calves. **Infection and immunity**, v.75, n.5, p.2110-2119, 2007.