

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**Ciências
ULisboa**

**Deteção e tipificação moleculares de *Mycobacterium avium*
subsp. *paratuberculosis* em amostras de fezes**

ANA JOÃO AZEVEDO DE OLIVEIRA

Mestrado em Microbiologia Aplicada

Dissertação orientada por:
Doutora Ana Botelho
Professora Doutora Mónica Vieira Cunha

2016



**Deteção e tipificação moleculares de *Mycobacterium aium*
subsp. *paratuberculosis* em amostras de fezes**

ANA JOÃO AZEVEDO DE OLIVEIRA

Esta dissertação foi realizada no INIAV, IP sob a orientação direta da Doutora Ana Botelho e co-orientação da Doutora Célia Leão, no âmbito do Mestrado em Microbiologia Aplicada da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

A Professora Doutora Mónica Vieira Cunha foi a orientadora interna designada no âmbito do Mestrado em Microbiologia Aplicada da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

2016

When a child learns to walk and falls down 50 times...
He never thinks to himself, "*maybe this isn't for me*"

Agradecimentos

O meu primeiro agradecimento dirige-se ao Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, IP (INIAV; unidade estratégica de produção e saúde animal, UEISPSA), em particular ao Laboratório de Bacteriologia e Micologia, que me acolheu e que tornou possível a execução deste trabalho.

À minha orientadora externa, Doutora Ana Botelho, por me ter proporcionado todas as condições físicas e materiais para o desenvolvimento deste trabalho, pela prontidão em resolver qualquer tipo de problema durante o tempo em que estive no laboratório e pelas críticas e sugestões de melhoria. Agradeço principalmente o tempo dispendido para a revisão do manuscrito.

À Professora Doutora Mónica Cunha, como orientadora interna, agradeço a disponibilidade mostrada durante todo este ano, destaco acima de tudo, as sugestões de melhoria do manuscrito.

À Dra. Célia Leão, minha co-orientadora externa, agradeço toda a disponibilidade e ajuda na execução do trabalho, as preciosas lições de laboratório, a informação bibliográfica disponibilizada e toda a motivação, paciência e conselhos quando o trabalho parecia ter problemas constantes. Sem esta preciosa ajuda, não teria sido possível terminar a dissertação. Obrigado por partilhares comigo um bocadinho daquilo que sentiste em 5 anos de doutoramento.

À Dra Ana Canto e Dra Maria José Barahona pela prontidão para ajudar a resolver qualquer tipo de problema.

Aos meus pais, Ana e João Oliveira, por nunca deixarem de acreditar em mim, por estarem sempre lá, pelos "puxões de orelhas" e pelo apoio incondicional em todas as decisões, mesmo nas menos certas. Agradeço em especial todo o apoio ao longo deste percurso académico, sem vocês nada disto seria possível. Obrigado por fazerem de mim quem sou hoje!

Por fim, mas não menos importante, agradeço a ti, Carlos Gomes, por teres aturado todos os choros, os desesperos e os "fins do mundo" quando nada corria bem, mas também por celebrares comigo assim que começava a melhorar, agradeço o teu apoio

e por me fazeres acreditar que é possível. Obrigado também por partilhares os teus momentos comigo!

Obrigada a todos!

Resumo

A paratuberculose ou doença de Johne é uma infeção intestinal granulomatosa crónica, contagiosa e por vezes fatal, causada pela micobactéria patogénica, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*), que afeta predominantemente ruminantes, podendo também infetar outros animais selvagens e domésticos. A paratuberculose é uma doença difícil de detetar e controlar devido à ausência de sinais clínicos, ao longo período de incubação do agente e à falta de métodos fiáveis de diagnóstico nas fases iniciais da doença. O isolamento do agente continua a ser o método de referência para o diagnóstico da paratuberculose. No entanto, é um método moroso devido ao crescimento extremamente fastidioso de *Map* em meios de cultura artificiais, podendo levar cerca de 6 meses até se obterem colónias visíveis. É, portanto, cada vez mais importante o desenvolvimento e validação de técnicas mais rápidas de modo a identificar os animais excretadores e controlar a propagação da infeção. Em Portugal, a paratuberculose encontra-se provavelmente sub-diagnosticada, apenas tendo sido reportado um pequeno número de estudos de prevalência.

Com este trabalho, pretendeu-se avaliar a presença de paratuberculose em explorações através do isolamento de *Map* num total de 106 amostras de fezes: fezes de bovinos, oriundas de explorações dos Açores, com sintomatologia suspeita de paratuberculose (n=72); fezes de bovinos, de explorações de Portugal Continental, sem qualquer tipo de sintoma sugestivo de paratuberculose (n=23); e fezes de caprinos, colhidas em explorações de Bragança, suspeitos de paratuberculose (n=11). As colónias suspeitas, isoladas de 28 amostras de fezes de bovinos, foram identificadas como *Map* tendo por base a técnica de PCR em tempo real, usando como alvo o fragmento f57, de cópia única. Nas mesmas amostras de fezes, realizou-se ainda, a deteção direta da sequência de inserção IS900, específica de *Map* e existente em múltiplas cópias no seu genoma, através da técnica molecular de PCR em formato *nested* em tempo real e avaliou-se a correlação dos resultados pelos dois métodos. Das 106 amostras, apenas 6 amostras de fezes de bovino se mostraram negativas pela técnica de PCR direto na amostra.

Dada a morosidade de crescimento destas bactérias no período do estágio, e de modo a ter uma indicação da estrutura populacional dos isolados de *Map* em Portugal, selecionaram-se 53 DNAs de estirpes de *Map* isoladas previamente de amostras de fezes da ilha de S. Miguel, Açores e efetuou-se a tipificação molecular por MIRU-VNTR, utilizando oito *loci*. O estudo do perfil MIRU-VNTR dos isolados, de diferentes freguesias da ilha, revelou que os perfis mais abundantes são o INMV 2 e 3. Os nossos resultados revelam que a maioria dos isolados da ilha pertence à mesma linhagem clonal, o que

sugere a existência de uma fonte ambiental comum e a transmissão indireta do microrganismo aos animais que circulam nessa localização geográfica.

Por último, testou-se um ensaio baseado na análise de SNPs para a tipificação de 11 estirpes *Map* isoladas de bovinos. A análise de 14 SNP específicos de *Map* em 11 isolados da ilha de S. Miguel, Açores, permitiu diferenciar duas variantes genéticas que pertencem à mesma linhagem e possuem um ancestral comum. Quando comparados com a estirpe de referência *M. paratuberculosis* K10 e, de acordo com a árvore de decisão disponível, estas estirpes aparentam ser do tipo C e pertencem a dois grupos filogenéticos distintos dentro do sub-grupo A: a *Clade* 4 e a nova *Clade* 11, descrita anteriormente por Leão e colaboradores [61]. Assim, estes isolados distribuem-se pelos perfis de SNP designados 4 e 11. Esta análise permitiu-nos corroborar a possibilidade de disseminação do microrganismo entre as freguesias.

O nosso estudo é um dos primeiros a relatar o isolamento, identificação e tipificação de *Map* em bovinos portugueses e permite concluir que a paratuberculose está presente nas explorações portuguesas, mesmo em animais assintomáticos, e que a excreção do do microrganismo nas fezes é uma das principais fontes de contaminação. A sua posterior disseminação através de uma fonte ambiental permite perpetuar o ciclo de infeção em outros animais dentro da mesma localização geográfica.

Palavras-chave: Paratuberculose, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, PCR em tempo real, análise de MIRU-VNTR, análise de SNP.

Abstract

Paratuberculosis or Johne's disease is a chronic granulomatous intestinal infection, contagious and fatal, caused by a pathogenic mycobacteria, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*), which predominantly affects ruminants and can also infect other wild and domestic animals. The paratuberculosis is a disease difficult to detect and to control because of the absence of clinical signs, the long period of incubation of the agent and the lack of reliable diagnostic methods at early stages of disease. The isolation of the agent is still the standard method for the diagnosis of paratuberculosis. However, it is a slow method due to the extremely fastidious growth of *Map* in artificial culture media, and may take about 6 months to obtain visible colonies. It is important to develop and validate more rapid techniques to identify the excretory animals and controlling the spread of infection. In Portugal, paratuberculosis is found probably under-diagnosed, only been reported in a few prevalence studies.

This study aims to assess the prevalence of paratuberculosis using the *Map* isolation a total of 106 fecal samples. Feces from cattle originating from the Azores herd with suspected symptoms of paratuberculosis (n=72) and bovine feces, without any kind of symptom (n=23), of Portugal Continental herd and feces from suspected goats, harvested in Bragança herd (n=11). The suspect colonies isolated from 28 samples of cattle feces were identified as *Map* based on the real time PCR using target f57 fragment in single copy. It was so performed, in the same fecal samples, direct detection of the insertion sequence IS900, specific for *Map* that exists in multiple copies in their genome through the molecular technique of PCR nested in real time and evaluated the correlation of results for the two methods. Of the 106 samples, only 6 samples of cattle feces were negative by direct PCR in the sample.

Because of the slow growth these cultures have to get an indication of the population structure of *Map* isolated in Portugal, they selected 53 DNAs from *Map* isolated from samples of the island of S. Miguel, Azores. After molecular identification, he performed the molecular typing by MIRU-VNTR, using eight *loci*. For the study MIRU-VNTR profile of isolates from different Island villages, the most abundant profiles are INMV 2 and 3. Our results suggest that the majority of isolates belong to the same island of the clonal lineage, suggesting the existence of an environmental source and the indirect transmission of the microorganism in the geographical location where these animals roam.

Finally, we tested a run essay based on the analysis of SNPs for typing of 11 strains isolated from cattle *Map*. 14 SNP analysis specific *Map* in 11 isolates of S. Miguel Island,

Azores, allowed to discriminate two genetic variants that belong to the same lineage and have a common ancestor. When compared with the strain *M. paratuberculosis* K10 and according to the decision tree that is available, these strains appear to be type C and belong to two distinct phylogenetic groups within the subgroup A: Clade 4 and the new Clade 11, previously described by Leão and colleagues [61]. Thus, these isolates are distributed by SNP profiles designated 4 and 11. This analysis confirm the possibility of the spread of the microorganism between the villages.

Our study is one of the first to report the isolation, identification and characterization of *Map* in Portuguese cattle and shows that paratuberculosis is present in the Portuguese explorations, even in asymptomatic animals and that the excretion of the microorganism in the stool is one of the main sources of contamination. The subsequent spread throughout an environmental source allows to perpetuate the cycle of infection in other animals within the same geographical location.

Keywords: Paratuberculosis, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, Real time PCR, MIRU-VNTR analysis, SNP analysis.

Conteúdo

Agradecimentos.....	iv
Resumo	vi
Abstract	viii
Índice.....	x
Índice de figuras	xii
Índice de tabelas.....	xiii
Lista de abreviaturas e acrónimos	xiv
1. Introdução.....	15
1.1 O género <i>Mycobacterium</i>	15
1.2 Complexo <i>Mycobacterium avium</i>	15
1.2.1 <i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>paratuberculosis</i>	16
1.2.2 Variabilidade dentro da subespécie <i>Map</i>	18
1.3 Paratuberculose (PTB).....	19
1.3.1 Transmissão	19
1.3.2 Hospedeiros.....	19
1.3.3 Fases da doença e sinais clínicos.....	19
1.3.4 Prevalência	20
1.3.5 Prevalência em Portugal	21
1.4 Métodos de Diagnóstico Laboratorial	21
1.4.1 Histopatologia e exame microscópico direto	21
1.4.2 Testes Serológicos.....	22
1.4.3 Diagnóstico Bacteriológico	22
1.4.4 Técnicas moleculares	23
1.4.5 Ferramentas de tipificação molecular em <i>Map</i>	24
1.5 Objectivo do trabalho	26
2. Materiais e métodos.....	26
2.1 Amostras biológicas.....	26
2.2 Processamento das amostras fecais.....	27
2.3 Extração de DNA de fezes	27
2.4 PCR em formato <i>nested</i> em tempo real para deteção da sequência de inserção IS900.....	28
2.5 Deteção por PCR em tempo real do fragmento f57	28
2.6 Tipificação de <i>Map</i> por MIRU-VNTR	29
2.7 Tipificação de <i>Map</i> por análise de SNP	30

2.7.1 Preparação do DNA genómico.....	30
2.7.2 Detecção de SNPs	30
3. Resultados e discussão	31
3.1 Análise de amostras de fezes por cultura bacteriológica	31
3.2 Resultado de PCR direto nas amostras de fezes	33
3.3 Cultura bacteriológica <i>versus</i> PCR direto na amostra	35
3.4 Tipificação de DNA de estirpes de <i>Map</i> da ilha de S. Miguel por MIRU-VNTR.....	36
3.5 Tipificação de estirpes de <i>Map</i> da ilha de S. Miguel por análise de SNP	40
4. Conclusões finais e perspetivas.....	42
5. Bibliografia.....	44
6. Anexos.....	li

Conteúdo

Figura 1 – Representação gráfica de <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	17
Figura 2 - Mapa de distribuição mundial de PTB para o segundo semestre de 2015 ..	21
Figura 3 – Colonias de <i>Map</i> em meio selectivo HEYM suplementado com Micobactina J.....	32
Figura 4 – Resultado de PCR em formato <i>nested</i> em tempo real IS900.....	35
Figura 5 – Eletroforese em gel de agarose a 2,5% dos produtos de amplificação do PCR para os <i>loci</i> MIRU-10 e MIRU-292.....	37
Figura 6 - Distribuição de perfis INMV por freguesia da ilha de S. Miguel, Açores	38
Figura 7 - Distribuição espacial dos perfis INMV por freguesia da ilha de S. Miguel	39
Figura 8 – Representação esquemática da árvore de decisão descrita por Leão e colaboradores, com a posição dos SNP, as bases esperadas e os perfis SNP correspondentes.	41

Conteúdo

Tabela 1 - Tabela resumo das características das estirpes tipo S e tipo C	18
Tabela 2 - Resultados das amostras de fezes analisadas por cultura bacteriana e por PCR direto na amostra e resultado do PCR em tempo real f57, para confirmação da identificação como <i>Map</i> dos isolados.....	li
Tabela 3 - Resultados da tipificação molecular por MIRU-VNTR de DNAs isolados de estirpes <i>Map</i> isoladas de caprinos e bovinos em explorações Açorianas, com sintomas de paratuberculose.....	lii
Tabela 4 – Perfil SNP de estirpes <i>Map</i> de bovinos, pertencentes ao tipo C, sub-grupo filogenético A	lv
Tabela 5 - Sequência de <i>primers</i> e sondas IS900 e f57.....	lvi
Tabela 6 – Condições das reações de PCR em <i>formato</i> nested em real time IS900 e PCR em tempo real f57, segundo Leão e colaboradores.....	lvi
Tabela 7 - Sequência de <i>primers</i> usados na análise MIRU-VNTR e temperatura de <i>annealing</i> correspondente, de acordo com a base de dados MAC INMV.....	lvii
Tabela 8 - Correspondência entre o número de unidades repetidas em tandem (TR) em cada <i>locus</i> e a dimensão do produto amplificado (pb).....	lvii
Tabela 9 - Sequência de <i>primers</i> usados na identificação de SNPs, segundo Leão e colaboradores.....	lvii
Tabela 10 - Valores de índice de diversidade Simpson por freguesia da ilha de S. Miguel, Açores	37

Lista de abreviaturas e acrónimos

ATCC: *American Type Culture Collection*

bp: Par de bases

Clade: grupo de organismos com um ancestral comum, do mesmo ramo da árvore filogenética.

dNTP: Desoxirribonucleotídeos

ELISA: Ensaio de imunoabsorção enzimática

HEYM: Meio de Herrold com gema de ovo

HPC: Cloreto de Hexadecilpiridínio mono-hidratado

INIAV: Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, IP

INMV: INRA MIRU-VNTR

OIE: Organização Mundial de Saúde Animal

LJ: *Lowenstein-Jensen*

MAC: *Mycobacterium avium complex*

Map: *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*

MgCl₂: Cloreto de magnésio

PCR: Reação de polimerização em cadeia

PFGE: Eletroforese em gel de campo pulsado

PTB: Paratuberculose

RFLP: Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição

SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único

TBE: Tris Borato *EDTA*

TE: Tampão Tris *EDTA*

TR: Repetição em *Tandem*

UFC: *unidade formadora de colonias*

VNTR: Número variável de repetições em *Tandem*

1. Introdução

1.1 O género *Mycobacterium*:

O género *Mycobacterium* pertence à família *Mycobacteriaceae*, integrado na ordem *Actinomycetales*, classe *Actinobacteria*, filo *Actinobacteria*, e domínio Bacteria. Compreende mais de 170 espécies (175 espécies citadas em “*List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*” em Agosto de 2016), sendo algumas agrupadas em complexos. Entre as micobactérias de maior importância em medicina veterinária, é importante referir as micobactérias de dois complexos principais, *M. tuberculosis* e *M. avium*. As micobactérias são encontradas em ambientes como a água e o solo, vegetação e alimentos, mas também em animais de sangue quente e sangue frio. Muitas são parasitas obrigatórios, outras saprófitas ou patogénicas oportunistas [1,2].

Apresentam morfologia de bastonetes (0,2-0,6 µm de largura × 1,0-10 µm de comprimento) retilíneos ou ligeiramente encurvados, são imóveis e não esporulados [2]. Possuem uma parede celular espessa, rica em lípidos e ácidos micólicos. Embora, do ponto de vista citoquímico, as micobactérias sejam classificadas como Gram-positivas, estas são vulgarmente denominadas de “bacilos álcool-ácido resistentes” (BAAR) [3].

São aeróbicas e, dependendo da espécie, a temperatura óptima de crescimento pode variar entre os 25°C e os 45°C. Com base na sua taxa de crescimento em meio de cultura, pode-se classificar como micobactérias de crescimento rápido (até sete dias) ou de crescimento lento (período superior a sete dias) [4]. Geneticamente, são bactérias com um grande conteúdo genómico G+C no seu DNA e uma elevada homologia nas sequências do gene rDNA 16S [5].

1.2 Complexo *Mycobacterium avium*:

O complexo *Mycobacterium avium* (MAC) compreende um número crescente de espécies de micobactérias de crescimento lento, ambientais e associadas a animais, responsáveis por infecções oportunistas em humanos [6]. Este complexo inclui duas espécies: *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium intracellulare*.

Baseado em dados genotípicos, fenotípicos e características de crescimento, bem como testes bioquímicos e fundamentos históricos, a espécie *M. avium* foi subdividida (Turenne e colaboradores, 2008) em quatro sub-espécies: *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *hominissuis*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, e *M. avium* subsp. *silvaticum*.

Todas as quatro subespécies de *Mycobacterium avium* são capazes de infectar uma grande variedade de hospedeiros e possuem um elevado grau de semelhança genética. *Mycobacterium avium* subsp. *avium* é o agente causador da tuberculose aviária, podendo causar doença disseminada em humanos, entre os pacientes imunocomprometidos. *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* é um agente patogénico obrigatório que causa tuberculose em aves selvagens, pombos, veados e cervos. *M. avium* subsp. *hominissuis* causa infeções em porcos e é também um agente oportunista em imunodeprimidos [6].

1.2.1 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*:

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (*Map*) é uma bactéria intracelular facultativa de crescimento lento que infeta o intestino do hospedeiro. Descrita pela primeira vez em 1894 por dois veterinários, Johne e Frothingham como “*pseudotuberculous enteritis*” [7], é o agente responsável pela paratuberculose (PTB) ou doença de Johne em animais, uma infeção granulomatosa crónica, contagiosa, muitas vezes fatal [8]. A doença é caracterizada pelo seu longo período de incubação (de meses a anos) durante o qual a infeção é silenciosa, dependendo a sua manifestação de vários fatores intrínsecos, por exemplo num animal já infetado por outro micorganismo, e extrínsecos, sendo o principal o *stress* causado na exploração.

Microscopicamente, *Map* é uma das micobactérias conhecidas mais pequenas (0.5 × 1,5 µm), com uma morfologia bacilar fina, é normalmente encontrado em aglomerados de células [9]. Um bacilo Gram-positivo com uma parede celular espessa, composta por cerca de 60% de ácidos micólicos, que confere resistência a inúmeros fatores físicos e químicos [10]. A composição da parede celular confere ainda hidrofobicidade e impermeabilidade elevada, assim como resistência a baixos valores de pH e a condições ambientais adversas [11]. Esta característica permitiu aumentar a capacidade de sobrevivência do micorganismo a ambientes adversos, assim como um aumento do seu potencial patogénico. É importante referir a sua resistência térmica. *Map* foi considerado um dos agentes patogénicos mais resistentes ao calor na cadeia alimentar [12].

Como não descoram sob a ação de ácidos fortes nem de álcool são, por isso, designados de “bacilos álcool-ácido resistentes”. Esta propriedade dificulta a caracterização de *Map* através de técnicas de coloração *standard*, é necessário o uso de colorações mais avançadas como *Ziehl-Neelsen* ou auramina-rodamina. É ainda

resistente aos antibióticos eficazes contra *M. tuberculosis*, o agente da tuberculose [13,14].

Ao nível da subespécie, *Map* pode ser diferenciado fenotipicamente pois não produz a micobactina quelante de ferro, essencial à sua replicação, sendo considerado um parasita obrigatório das células de mamíferos, onde o ferro se encontra disponível. Assim para o seu crescimento *in vitro*, este requer a adição de micobactina exógena. O microrganismo infecta preferencialmente macrófagos [14]. Devido à sua taxa de crescimento baixa, um tempo de duplicação de 22-26 horas ou mais, pode necessitar de até seis meses de incubação para desenvolver uma colônia de 1-2 mm, visível a olho nú que, dependendo do meio de cultura, pode ser não pigmentada ou amarela [15].

Map tem um genoma circular com cerca de 69% em teor G+C. Contem ainda várias sequências de inserção, pequenos elementos transponíveis que se encontram em diferentes números de cópias, que são exclusivas do seu genoma, como IS900 (15-20 cópias) [16,17], IS*Mav2* (três cópias) [18] IS*Map02* (seis cópias) [19] e o fragmento f57 do gene MAP0865 (uma cópia) [20, 21].

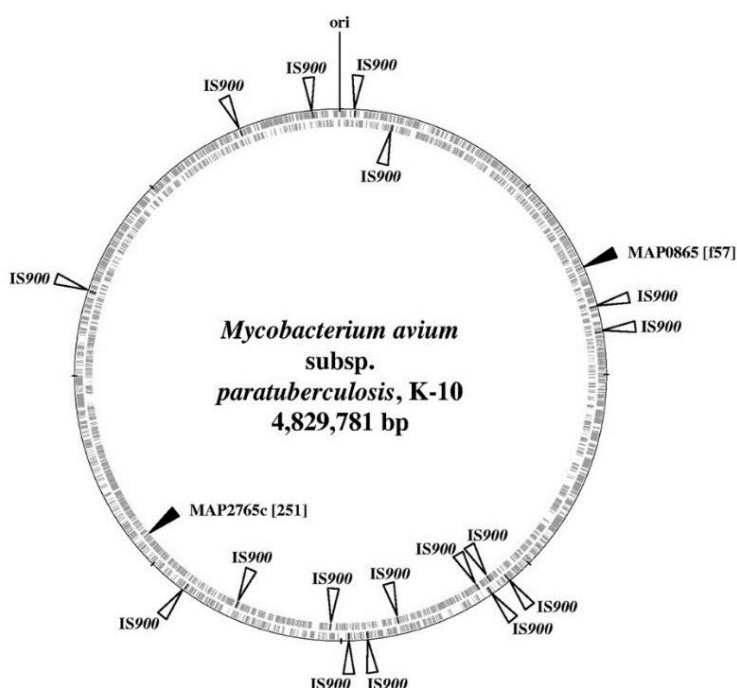


Figura 1 – Representação gráfica de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* e da posição das regiões IS900 (presente em 17 cópias) e MAP0865, onde se localiza o fragmento f57, no genoma de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* K10 [22].

1.2.2 Variabilidade dentro da subespécie *Map*:

As estirpes de *Map* podem ser agrupadas em dois grupos ou tipos principais, de acordo com a sua variabilidade genética, as suas características de crescimento, patogenicidade ou espectro de hospedeiros: o tipo C (tipo II) e o tipo S (tipo I/III). Ser uma estirpe do tipo C é sinónimo de ser do tipo II. Inicialmente as estirpes foram designadas de acordo com as espécies de onde foram isoladas primeiramente, “S” de *sheep* e “C” de *cattle*. No entanto, a designação de “*sheep*” e “*cattle*” não está inteiramente correta, uma vez que de acordo com distintos perfis de genotipagem baseados em PFGE (“*Pulsed-field gel electrophoresis*”), sabe-se que as estirpes do tipo C podem ser isoladas de uma variedade de hospedeiros, incluindo bovinos, humanos e pequenos ruminantes. As estirpes do tipo S podem ser encontradas também em bovinos. Recentemente, um terceiro grupo intermediário, o tipo III, foi descrito como um subtipo do tipo S. Também o tipo B/Bison foi considerado um subtipo do tipo C. A análise de genomas em isolados do tipo B revelaram que isolados de animais da Índia eram geneticamente diferentes de isolados de animais dos EUA, dividindo assim o subtipo Bison em duas sub-linhagens, (tipo USA Bison e tipo Indian Bison) [23, 24,25].

A tabela 1 resume as principais características fenotípicas, de crescimento e hospedeiros preferenciais dos dois tipos de estirpes *Map*.

Tabela 1 – Resumo das características das estirpes tipo S e tipo C (adaptado de Stevenson e colaboradores, 2002 e 2015).

Característica	Estirpe tipo S (<i>Sheep</i>)	Estirpe tipo C (<i>Cattle</i>)
Características de crescimento	Taxa de crescimento muito lenta e difícil de isolar	Taxa de crescimento lenta, mais fácil de isolar.
Tempo de incubação típico para isolamento em meio sólido	16 a 52 semanas	Quatro a seis semanas
Pigmentação	Colônias com e sem pigmentação	Colônias não pigmentadas
Hospedeiros preferenciais	Caprinos e Ovinos	Largo espectro de hospedeiros (ruminantes e não ruminantes). Mais comum em bovinos

Geneticamente, não existem evidências da existência de sequências de inserção que diferenciem as estirpes tipo C do tipo S. Contudo, o número de cópias da sequência IS900 pode variar entre as estirpes do tipo C [25]. A identificação destas sequências de DNA únicas em *Map* permitiu o uso de técnicas adicionais para a identificação deste microrganismo, utilizando a técnica de PCR.

1.3 Paratuberculose (PTB)

1.3.1 Transmissão:

A transmissão do agente etiológico ocorre nos primeiros meses de vida do animal, por via oral-fecal [9, 26]. *Map* consegue sobreviver pois ultrapassa a resposta imunitária e, após a sua entrada nos macrófagos do tecido intestinal, tem capacidade para persistir e replicar-se durante dois a cinco anos sem ser detetado ou eliminado. Acaba depois por dispersar-se no ambiente podendo infetar outros animais [9]. Num estágio mais avançado da doença, pode também transmitir-se verticalmente da mãe para o feto através da via transplacentária pois o microrganismo pode ser encontrado no fluido uterino [27]. Também o sémen pode ser uma fonte de infeção [28]. A principal fonte de infeção em crias é o uso de leite ou colostro de animais infetados ou contaminado com fezes de animais doentes [29]. Assim, a principal via de transmissão direta intra e inter-especie é através do contacto com fezes e consumo de colostro ou leite contaminado com *Map* e, indiretamente, através do consumo de água, sementes, ração, feno ou presas contaminadas com *Map* [9, 14].

1.3.2 Hospedeiros:

Map possui um largo espectro de hospedeiro, infetando o intestino tanto de ruminantes domésticos como selvagens, incluindo cabras, ovelhas, camelos, veados, bisontes, sendo, no entanto, a infeção muito mais comum em bovinos. Apesar dos ruminantes serem o hospedeiro preferencial, estão reportadas infeções em não-ruminantes como coelhos, raposas, cavalos, gatos e cães, primatas e humanos [30, 31, 32, 33].

1.3.3 Fases da doença e sinais clínicos:

De acordo com os sinais clínicos, o número de organismos excretados, bem como a eficácia da deteção do microrganismo em laboratório, a infeção é dividida em quatro estágios:

Numa fase inicial, a infecção ainda é silenciosa pois não são observáveis quaisquer sinais da doença. Nas fezes, são excretadas quantidades mínimas do agente infeccioso. O peso ou a condição corporal do animal quase não se altera e não há um teste de diagnóstico capaz de detectar a infecção nesta fase [9, 34, 35, 36].

Numa segunda fase, a infecção subclínica, continuam sem ser visíveis quaisquer sinais clínicos de doença contudo, alguns animais podem apresentar anticorpos que podem ser detectados. Nesta fase estão presentes elevadas concentrações de *Map* nas células do tecido intestinal do hospedeiro, apesar de a sua excreção ser intermitente. As bactérias podem agora invadir outras áreas do corpo, incluindo o músculo, o úbere e o útero e *Map* começa a ser eliminado no colostro, no leite e através da placenta a um feto [9, 34, 35, 36].

Na terceira fase da doença, a infecção clínica, já é possível observar os sinais clínicos da doença, o animal apresenta perda de peso, diarreia aquosa intermitente, passando a persistente, e não responde a qualquer tipo de terapêutica antimicrobiana. Os resultados são positivos em testes sorológicos e de cultura de fezes. A infecção acaba por se disseminar a outros locais extra-intestinais, como glândulas supra-mamárias, pulmonares, gânglios linfáticos e hepáticos [9, 34, 35, 36].

Na infecção clínica avançada, a quarta fase, os sinais são evidentes, a excreção de *Map* nas fezes é abundante, o emagrecimento e a diarreia são severos e a maioria dos animais é enviada para abate. Caso isso não aconteça os animais doentes acabam por morrer devido à extrema caquexia e desidratação [9, 34, 35, 36].

1.3.4 Prevalência:

A notificação da PTB à OIE (*World Organization for Animal Health*) é obrigatória e, de acordo com a base de dados WAHID (*Worldwide Animal Health Information Database*), no segundo semestre de 2015, a doença foi reportada em 97 países dos 191, incluindo Portugal (Figura 2). Com base em testes serológicos, estima-se que a prevalência a nível mundial esteja entre os 7% e os 40% [37].

A prevalência de PTB em explorações de bovinos nos países europeus varia entre os 7% e os 55% [38]. Contudo, estimar a prevalência é muito complicado, uma vez que a maioria dos animais infetados são assintomáticos e o diagnóstico na fase inicial da doença é difícil. A maioria dos animais acabam por ser abatidos antes do diagnóstico final [39].

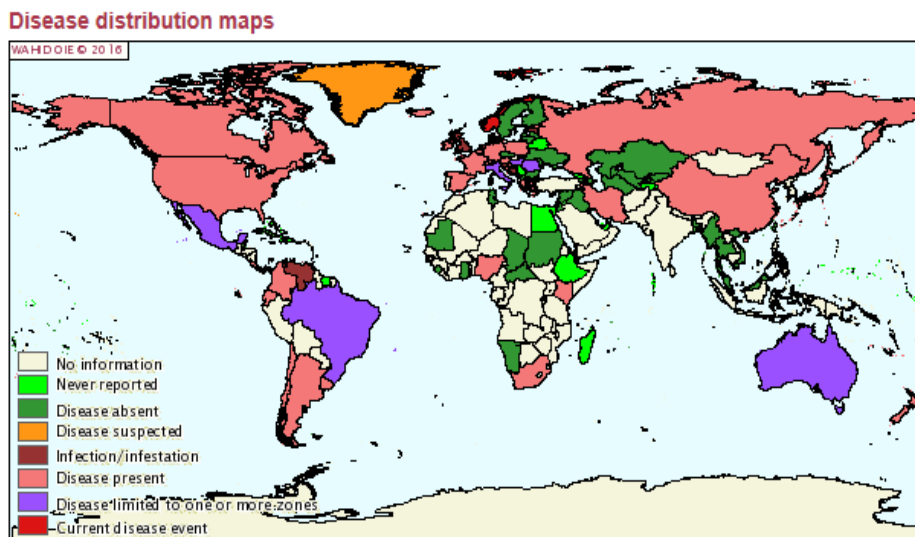


Figura 2 - Mapa de distribuição mundial de PTB para o segundo semestre de 2015, para espécies domésticas e selvagens, reportadas à OIE (acesso em Agosto de 2016). A doença está presente nas zonas indicadas a rosa.

1.3.5 Prevalência em Portugal:

Alguns estudos epidemiológicos têm sido realizados em Portugal. Ferreira e colaboradores (2002) [40] relataram que 4,8-7,0% de bovinos na região do Alentejo, sul de Portugal, eram positivos para serologia e, 13-25% das explorações positivas para a doença. Em 2004, nos concelhos de Sintra, Cascais, Oeiras, Amadora e Lisboa, Mendes e colaboradores detetaram que em 27% das explorações bovinas existiam animais seropositivos [41]. Num estudo mais recente, anticorpos anti-*Map* foram detetados em 2,3% de amostras de leite colhidas de 5294 vacas leiteiras da região norte de Portugal, o que corresponde a 45,9% de explorações infetadas [42]. A prevalência de PTB a nível da exploração é elevada, com valores que rondam os 47% a 67% [43, 44].

1.4 Métodos de Diagnóstico Laboratorial:

Os métodos de diagnóstico para a PTB são baseados em análise histopatológica; testes serológicos; isolamento bacteriológico de amostras clínicas, principalmente tecidos (intestino e nódulos) e fezes, mas também leite; e testes moleculares (PCR).

1.4.1 Histopatologia e exame microscópico direto:

Trata-se de um diagnóstico anatomopatológico, com observação das lesões específicas em amostras de tecido, como o íleo, intestino (visualização de placas) e nódulos linfáticos (normalmente alargados e edematosos) [9, 29, 36]. O exame microscópico

fornece ao veterinário um diagnóstico preliminar e baseia-se na observação microscópica de esfregaços fecais ou colorações de tecidos pela técnica de *Ziehl-Neelsen* [9, 29, 36].

1.4.2 Testes Serológicos:

Podem ser usados testes de fixação de complemento (CF), imunodifusão em gel de agar (AGID) e ensaios imunoenzimáticos (ELISA). Estes ensaios tornam-se muito sensíveis quando a produção de anticorpos é mais elevada, pois a sensibilidade dos testes de detecção de anticorpos aumenta com a progressão da doença [9, 29, 36].

1.4.3 Diagnóstico Bacteriológico:

A cultura de *Map* é o ensaio mais fiável para a detecção de animais infetados e considerada o “*gold standard*”. Pode ser feita a partir de fezes, tecidos ou leite. Atualmente, a cultura bacteriológica possibilita a identificação de animais em fases mais avançadas da doença, identificando apenas uma pequena parte dos animais em fases de infeção mais recentes. A cultura tradicional a partir de fezes permite acompanhar a progressão da doença, com uma especificidade de 100%, dependendo a sua sensibilidade das condições de cultura, fase de infeção e tipo de hospedeiro [9, 29, 36].

A descontaminação das amostras clínicas é fundamental em todos os protocolos de cultura usados, de modo a destruir ou suprimir o crescimento de outros microrganismos de crescimento mais rápido. A incubação deve ser feita em meio selectivo com Micobactina J contendo agentes antimicrobianos, para permitir o crescimento de *Map*. Até ao máximo de 6 meses de incubação, deve ser feito periodicamente o reconhecimento do crescimento das colónias *Map* no meio. As colónias desenvolvidas são identificadas por meios fenotípicos ou genotípicos [6, 29, 36].

Os meios de cultura ideais para a cultura de *Map* são o *Löwenstein-Jensen* e o meio *Herrolds's egg yolk medium* (HEYM). No entanto, o meio *Middlebrook*, que apesar de não ser dos mais adequados, pode otimizar o crescimento de *Map*, quando suplementado com gema de ovo. O diagnóstico da paratuberculose em ovinos é particularmente difícil e os resultados de alguns estudos sugerem que o meio de *Löwenstein-Jensen* é mais efetivo para a obtenção de estirpes ovinas do que para estirpes bovinas [45].

Apesar do diagnóstico bacteriológico através da cultura de fezes ser considerado o “*gold standard*” do diagnóstico da PTB em animais vivos, estudos mais recentes baseiam-se na detecção de sequências de ácidos nucleicos específicas de *Map* para ultrapassar os

problemas associados à cultura, como os longos períodos de incubação, o custo elevado e a possível contaminação da cultura com bactérias de crescimento rápido, outras micobactérias ou fungos [29].

1.4.4 Técnicas moleculares:

Sequenciado o genoma completo de *Map*, verificou-se que cerca de 15%, correspondente a 72,2 kpb, compreende sequências de DNA repetidas como sequências de inserção (IS) e genes *housekeeping* duplicados [46]. Um dos mais importantes avanços no diagnóstico da PTB foi a identificação, em 1989, de uma sequência de inserção repetida de 1,5 kb, única desta subespécie [47]. A caracterização desta sequência de inserção, IS900, permitiu a identificação específica de DNA de *Map* por meio da técnica de PCR. Apesar de ser uma pequena unidade de DNA móvel capaz de se transpor de um *locus* para outro, é considerada uma sequência de inserção atípica pois não possui as clássicas regiões terminais invertidas e é altamente conservada dentro do genoma [48]. A sua natureza multi-cópia torna esta sequência um alvo ideal para a detecção de *Map*, pois permite um nível mais elevado de sensibilidade do que quando o alvo é apenas de cópia única. Por outro lado, o fato de cerca de 66% do fragmento ser constituído por G+C, garante um elevado grau de especificidade desta sequência alvo [49]. Até agora, a sequência IS900 tem sido utilizada como um marcador de referência para a detecção molecular de *Map*. Consequentemente, diferentes ensaios de PCR baseados em IS900, como PCR convencional, nos formatos *semi-nested* e *nested*, e PCR em tempo real foram descritos para a detecção de *Map* em várias amostras biológicas, ou em casos em que não é possível isolar o microrganismo [50]. Estas modificações, ao PCR convencional, permitem não só melhorar a sensibilidade do método, mas também a sua especificidade. A maioria das sondas de PCR utilizadas comercialmente hoje em dia baseiam-se na presença/ausência da sequência IS900 e, embora a especificidade deste PCR seja considerada quase 100%, têm sido encontradas em outras micobactérias que não *Map* elementos designados “IS900-like”. Isto é, sequências de nucleótidos que são cerca de 94% idênticas à sequência de inserção IS900 de *Map* [47]. Em resposta a esta incerteza sobre a especificidade dos sistemas de PCR que usam IS900 como região alvo, várias outras sequências únicas foram identificadas e utilizadas para a diferenciação de *Map* de outras subespécies de *M. avium*, tais como as sequências ISMav2, Hsp X e o fragmento f57. O elemento f57 é uma sequência de 620 pb específica de *Map*, encontrando-se no seu genoma em cópia única e não estando relacionada com qualquer outra sequência conhecida [51]. Localizado no gene MAP0865, este fragmento cobre cerca de 48,7% desta ORF [22]. A

inserção multi-cópia IS900 e o elemento de cópia-única f57 são dos mais importantes alvos genômicos usados nos ensaios de PCR [52].

1.4.5 Ferramentas de tipificação molecular em *Map*:

A tipificação de estirpes é uma ferramenta indispensável para a caracterização e identificação de linhagens clonais de subespécies de *Map* e para a vigilância epidemiológica do agente. Além de análises RFLP (“*Restriction fragment length polymorphism*”) e PFGE (“*Pulsed Field Gel Electrophoresis*”), outros estudos têm permitido identificar diferenças genéticas através da análise de vários *loci* contendo sequências de DNA com um número variável de repetições em tandem (VNTRs), ou unidades repetitivas intercaladas, específicas de micobactérias (MIRUs). Estes padrões são amplamente usados na genotipagem de *Map* [52].

Esta abordagem determina o número de repetições em cada análise, sendo o resultado final depois introduzido em bases de dados internacionais. Os MIRUs são sequências minissatélites repetidas em *tandem*, distribuídas pelo genoma micobacteriano sobretudo nas regiões intergênicas. Distinguem-se de outras sequências de repetição pois não têm uma simetria díade e são pequenas ORFs cujos codões de iniciação e terminação se sobrepõem aos genes que as flanqueiam [53]. Este ensaio baseia-se na amplificação de vários *loci*, cada um com o seu par de *primers* específicos, e na observação dos tamanhos dos respectivos fragmentos amplificados por eletroforese em gel de agarose ou por eletroforese capilar. O tamanho do fragmento vai ser proporcional ao número de repetições desse *locus*. O resultado que se obtém deste ensaio é um código numérico que representa um perfil com o número de cópias repetidas em cada *locus*, o que permite a comparação dos resultados com outros estudos realizados noutros laboratórios.

Com base na análise de quatro *loci* MIRU-VNTR, Bull e colaboradores (2003) distinguiram isolados *Map* de outros membros do complexo MAC pela observação do padrão de bandas obtido aquando da amplificação de MIRU-2 e MIRU-4. [54]

Thibault e colaboradores (2007) exploraram a variabilidade de oito marcadores VNTR na análise de isolados *Map* de diferentes hospedeiros, provenientes de vários países. Sete *loci* MIRU-VNTR foram reportados como novos na literatura (32, 292, 7, 10, 25, 47 e 3) e um (senX3-regX3) já tinha sido relatado anteriormente [55].

Em 2010, Castellanos e colaboradores analisaram a variabilidade genética de uma coleção de isolados usando uma combinação de seis *loci* MIRU-VNTR (MIRU-2, MIRU-3, VNTR-25, VNTR-32, VNTR-292 e VNTR-259) [56].

Em 2015, por análise VNTR, Leão e Colaboradores caracterizaram isolados de *Map*, obtidos em Portugal, com uma combinação de 10 *loci* (VNTR-3, VNTR-7, VNTR-10, VNTR-47, MIRU-2, MIRU-3, VNTR-25, VNTR-32, VNTR-259 e VNTR-292) [57].

O conjunto de *loci* MIRU-VNTR proposto por Thibault e colaboradores (2007) e Castellanos e colaboradores (2010) são dos mais usados para comparar os diferentes perfis dos isolados. Contudo, vários conjuntos de MIRU-VNTR são usados para caracterizar isolados *Map*, o que acaba por dificultar a comparação entre os vários estudos. Talvez devido a este inconveniente, mais recentemente, foi criada uma base de dados *online* de acesso livre, “MAC INMV database” (<http://mac-inmv.tours.inra.fr/>), para a tipificação de subespécies de *M. avium*. Gerada com base em perfis obtidos através da análise de oito MIRU-VNTR (X3, 3, 7, 10, 25, 32, 47 e 292), os genótipos obtidos são classificados em perfis INMV que podem ser comparados globalmente. Até Agosto de 2016 tinham sido descritos e estavam disponíveis na base de dados 143 perfis INMV.

A análise de SNPs (“*Single-nucleotide polymorphism*”) é outra técnica utilizada na tipificação molecular. Um SNP é uma inserção ou eliminação de um único nucleótido ou a substituição de um nucleótido por outro, que ocorre mais frequentemente em regiões não codificantes do genoma. Tal como os MIRUs, os SNPs são uma importante fonte de variabilidade genética, sendo também adequados para diferenciar variantes genéticas e realizar estudos filogenéticos, minimizando custos e recorrendo apenas a equipamento básico de laboratório. Um dos grandes desafios a ultrapassar na tipificação de estirpes de *Map* é o limitado poder discriminatório das técnicas moleculares tradicionais. Os avanços da ciência e a disponibilidade de acesso à sequência de todo o genoma veio facilitar a caracterização de subtipos *Map* num contexto filogenético. Assim, ensaios de SNP têm sido usados para discriminar estirpes de *Map* do tipo I, II e III, mas também entre linhagens de hospedeiros animais e hospedeiros humanos [58].

Em 2007, a análise dos genes *gyrA* e *gyrB* por Castellanos e colaboradores num conjunto de isolados de *Map* dos diferentes tipos, I, II e III, permitiu a deteção de SNP tipo-específicos [59]. Em 2009, Castellanos e colaboradores analisaram sequências IS900 de um painel de isolados *Map*, revelando SNPs tipo-específicos conservados que poderiam ser usados como uma ferramenta de diagnóstico epidemiológico [60]. Em 2015, Leão e colaboradores desenvolveram um ensaio que recorre a uma árvore de decisão baseada na análise de 14 SNPs, com base na reação de PCR e hidrólise por enzima de restrição ou sequenciação do produto amplificado. Através desta análise, os isolados de *Map* podem ser classificados em 14 grupos filogenéticos com um maior

poder discriminatório em relação ao ensaio de MIRU-VNTR ou outros métodos de tipificação [61].

1.5 Objetivos do presente trabalho:

Sendo a PTB uma doença de elevado impacto a nível mundial, devido à sua dificuldade de deteção e controle, é importante o desenvolvimento e a validação de técnicas mais rápidas e sensíveis para a deteção do agente, de modo a identificar os animais excretadores e controlar a propagação da infeção. Com este trabalho pretendeu-se avaliar a presença de *Map* em explorações portuguesas de bovinos e caprinos, utilizando a técnica convencional de cultura bacteriológica e a técnica molecular de PCR, e realizar a tipificação molecular de estirpes *Map* isoladas anteriormente.

Assim, efetuou-se a deteção direta de DNA de *Map* utilizando um sistema de PCR em formato *nested* em tempo real, paralelamente com o isolamento do agente em meio de cultura adequado e identificação das colónias suspeitas por PCR em tempo real. Dado o crescimento fastidioso do agente e, para cumprir os objetivos de trabalho dentro do prazo previsto, recorreu-se a 53 estirpes *Map* existentes na coleção biológica do INIAV para realizar a tipificação molecular por MIRU-VNTR, com um painel de 8 *loci*. Por último, avaliou-se a relação filogenética entre 11 dessas estirpes, através da análise de SNPs específicos presentes no genoma de *Map*, de modo a identificar-se linhas clonais com base nessa relação filogenética.

2. Materiais e métodos

2.1 Amostras biológicas:

Parte das amostras de fezes utilizadas neste estudo foram colhidas em explorações Açorianas de bovinos (n=72) e em explorações de caprinos (n=11) da região geográfica de Bragança. Estas amostras eram de animais suspeitos de PTB, com diarreia acentuada e caquexia. As restantes amostras (n=23) foram colhidas de bovinos de Portugal Continental, enviadas para o laboratório para outros testes de rotina e que não apresentavam qualquer tipo de sintomatologia. As amostras foram enviadas para o INIAV, em frasco coletor adequado e conservadas a -20°C, até serem processadas de acordo com as orientações do manual da OIE [29]. (Tabela 2)

Para a tipificação molecular por MIRU-VNTR, 53 DNAs previamente extraídos de estirpes *Map*, isoladas de caprinos (n=10) e bovinos (n=43), identificadas por PCR em tempo real f57 e pertencentes à coleção do INIAV, foram incluídos neste estudo. As

estirpes foram anteriormente isoladas de amostras de fezes oriundas de S. Miguel, Açores, colhidas de animais com sintomas de paratuberculose, seropositivos na prova ELISA (“*Mycobacterium paratuberculosis* Antibody test kit - IDEXX Paratuberculosis Screening”) e que excretavam o agente *Map* nas fezes, como comprovado por PCR direto nestas amostras. (Tabela 3)

Para a análise de SNPs, usaram-se 11 destas 43 estirpes *Map* isoladas de bovinos, congeladas a -80°C em meio líquido *Middlebrook* 7H9 com 10% de glicerol. (Tabela 4)

2.2 Processamento das amostras fecais:

Com o intuito de se realizar a cultura bacteriológica, seguiu-se o protocolo descrito no manual da OIE [29] com algumas modificações: homogeneizou-se 1 g de fezes com 20 mL de água destilada estéril durante 30 min. Após um repouso de 30 min, retirou-se do sobrenadante duas partes iguais, de 5 mL cada, uma que foi mantida a 4°C para futura extração de DNA e outra que foi alvo de descontaminação com 20 mL de HPC (*Sigma-Aldrich*) a 0,9%. Após 18 h de descontaminação no escuro, à temperatura ambiente, recuperou-se o sedimento para novo tubo, onde depois de lavado com 10 mL de água destilada, foi centrifugado a 2300 rpm durante 30 min. A centrifugação permitiu concentrar um maior número de bactérias num sedimento que depois foi ressuscitado em 500 µL de água destilada estéril. Como a inoculação da amostra deve ser realizada no mesmo meio de cultura com e sem micobactina, para demonstrar a dependência de *Map* por micobactina, 100 µL desta suspensão foram inoculados em meio HEYM Agar e HEYM (*Herrold's Egg Yolk Medium*) suplementado com Micobactina J. Após inoculação, as culturas foram incubadas a 37°C, sendo o seu crescimento observado semanalmente.

2.3 Extração de DNA de fezes:

A extração de DNA foi feita diretamente a partir de 5 mL de suspensão de fezes, retiradas anteriormente durante o processamento da amostra, usando o sistema comercial de extração, *DNA NZY Soil gDNA Isolation Kit (Nzytech)*, de acordo com as recomendações do fabricante. Um passo adicional de disrupção mecânica no *ribolyser FastPrep™ FP120 Bio101* foi realizado, submetendo duas vezes a amostra a uma velocidade de 6,5 ms⁻¹ ciclos durante 45 s. A cada lote de amostras extraídas foi adicionado um controlo negativo de extração (água ultra-pura). A quantificação do DNA foi feita espectralmente no Nanodrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer

(*Thermo Fisher Scientific*[™]) e o DNA diluído a 5 ng/μL, sendo depois conservado a -20°C até a sua utilização.

2.4 PCR em formato *nested* em tempo real para detecção da sequência de inserção IS900:

A detecção e identificação de *Map* foi feita através da amplificação por PCR da sequência de inserção IS900 (Leão e colaboradores [62]) usando como alvo o DNA extraído das amostras de fezes. Este ensaio de PCR consistiu em dois passos de amplificação: um primeiro passo através de um PCR convencional; um segundo passo, através de PCR em tempo real, que utilizou como molde o produto da primeira amplificação. A primeira reação de PCR foi realizada num volume final de 25 μL contendo 200 μM de cada dNTP (*Promega*), 2,0 mM de MgCl₂ (*Invitrogen*), 0,4 μM de cada *primer* (Tabela 5), 1 U de *Taq DNA Polimerase*[™], 1x tampão da enzima *Invitrogen*, e 2,5 μL da solução de DNA. Um controlo positivo usando DNA de *Map* (ATCC 19698^T) e um controlo negativo (água ultra-pura) foram incluídos em cada série de PCR. As reacções de amplificação foram executadas no termociclador Bio-Rad MJ Mini[™], de acordo com o programa de PCR descrito em anexo (Tabela 6).

A segunda reação de PCR foi realizada num volume final de 20 μL contendo 0,4 μM de cada *primer* (Tabela 5), 0,15 μM de sonda *TaqMan* (*Invitrogen*), 1x de *Nzy Speedy qPCR Mix*[™] (*nzytech*), e 5 μL do produto de amplificação da primeira reação. A amplificação foi realizada no termociclador Bio-Rad CFX96[™], de acordo com o programa de PCR descrito em anexo (Tabela 6). Adicionalmente um controlo positivo usando DNA de *Map* (ATCC 19698^T) e um controlo negativo (água ultra-pura) foram incluídos em cada série de PCR. Para análise de dados usou-se o *software* Bio-Rad CFX Manager, versão 3.0.

2.5 Detecção por PCR em tempo real do fragmento f57:

Para confirmação de culturas *Map* isoladas em meio adequado, recorreu-se à detecção do elemento f57 por PCR em tempo real. Este PCR é realizado em culturas suspeitas de *Map* de onde o seu DNA é extraído por fervura. Transferiu-se uma colónia para um microtubo com 100 μL de TE, ressuspendeu-se e levou-se ao vortex. Centrifugou-se depois o tubo a 3500 rpm durante 5 min e ressuspendeu-se novamente o sedimento em 100 μL de TE. Incubou-se em banho de água a 95°C durante 45 min. Após a inativação bacteriana, a cultura foi centrifugada a 3500 rpm durante 1 min e o sobrenadante que contém o DNA transferido para um novo microtubo para ser usado como molde para as reacções de PCR. A quantificação do DNA foi feita por método espectrofotométrico

usando o aparelho Nanodrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer (*Thermo Fisher Scientific*TM), sendo depois as suspensões de DNA genómico diluídas a 5 ng/μL e conservadas a -20°C até a sua utilização.

A reação de PCR foi realizada num volume final de 20 μL contendo 0,4 μM de cada *primer* (Tabela 5), 0,15 μM de Sonda *TaqMan* (*Invitrogen*), 1x de *Nzy Speedy qPCR Mix*TM (*nzytech*), e 5 μL de DNA dos isolados. Executada no termociclador Bio-Rad CFX96TM, a reação tem um passo inicial de 95°C durante 3 min, seguido de 45 ciclos a 95°C durante 10 s, 60°C durante 35 s. Para análise de dados, usou-se o *software* Bio-Rad CFX Manager, versão 3.0. Adicionalmente um controlo positivo com DNA extraído de *Map* (ATCC 19698^T) e um controlo negativo (água ultra-pura) foram incluídos em todos os lotes de PCR [62].

2.6 Tipificação de *Map* por MIRU-VNTR:

Um conjunto de 8 *loci* serviram de base para a caracterização de *Map*, seguindo o método descrito por Thibault e colaboradores [55].

A reação de PCR foi realizada num volume final de 25 μL, contendo 200 μM de cada dNTP (*Promega*), 2,0 mM de MgCl₂ (*Promega*), 1 μM de cada *primer* (Tabela 7), 2,5 U de *GoTaq*TM *DNA polimerase*, 1x do respetivo tampão (*Promega*) e 1μL da solução de DNA. As reacções foram executadas no termociclador Bio-Rad MJ MiniTM, consistindo num passo inicial de 95°C durante 10 min, seguido de 38 ciclos a 98°C durante 10 s, 58-64°C durante 30 s (temperaturas de *annealing* para cada *primer* indicadas em anexo na Tabela 7) e 72°C durante 1 min, terminando com um passo de extensão final a 72°C durante 7 min.

Algumas temperaturas de *annealing* indicadas na literatura foram adaptadas ao termociclador como descrito em informação em anexo, de modo a otimizar o protocolo. Um controlo positivo (DNA extraído de *Map* ATCC 19698^T) e um controlo negativo (água ultra-pura) foram incluídos em todos os ensaios de PCR. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2,5% (m/v) em tampão TBE 1x pré-colorado com *GelRed*TM (*Biotium*), a 90 V durante 2 horas, usando um marcador molecular de 100 pb (*Ladder IV*, *Bioline*) para estimar o tamanho dos produtos de amplificação. Os dados disponíveis na base de dados MAC INMV (<http://mac-inmv.tours.inra.fr/>) foram usados para atribuir, em cada *loci*, de acordo com o tamanho estimado de cada produto de PCR, o número de repetições correspondente (Tabela 8).

2.7 Tipificação de *Map* por análise de SNPs:

2.7.1 Preparação do DNA genómico:

Onze estirpes *Map*, pertencentes à coleção do INIAV, desenvolvidas em meio líquido *Middlebrook* 7H9, suplementado com 10% OADC (“*Oleic, Albumin, Dextrose and Catalase*”) e 2 mg/L de micobactina, e congeladas a -80°C neste mesmo meio com 10% de glicerol, foram usadas para extração e purificação de DNA genómico usando o sistema comercial, *PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen)*, de acordo com as indicações do fabricante, com algumas modificações. Todo o conteúdo congelado foi centrifugado a 13000 rpm durante 5 min, sendo depois o sedimento ressuspensionado no respetivo tampão de digestão e adicionadas esferas de vidro de 0,1 mm e de 0,5 mm à mistura. A disrupção mecânica das células foi feita no *FastPrep™ FP120 Bio101* e, para se otimizar o processo de extração, submeteu-se a amostra duas vezes a uma velocidade de 6.5 ms⁻¹ ciclos durante 45 s. A mistura foi depois arrefecida no congelador durante 10 min e 20 µL de proteinase K adicionados. O restante procedimento foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. O DNA foi eluído em 100 µL de tampão, quantificado no *Nanodrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific™)* e diluído a 5 ng/µL, sendo depois as suspensões de DNA genómico conservadas a -20°C até a sua utilização.

2.7.2 Detecção de SNPs:

A amplificação da região genómica que alberga os SNPs específicos e que permite a diferenciação das linhagens de *Map* foi feita através de PCR convencional, segundo Leão e colaboradores [61]. A reação de PCR foi realizada num volume final de 50 µL, contendo 1x do tampão de reação (*Thermo Scientific*), 200 µM de cada dNTP (*Promega*), 0,5 µM de cada um dos *primers*, (Tabela 9), 0,02 U de *Phusion™ High-Fidelity DNA polimerase*, para DNA rico em GC, e 4 µL da solução de DNA. As reações de amplificação foram realizadas no termociclador *Bio-Rad MJ Mini™* e consistiram num passo inicial de 98°C durante 30 s, seguido de 35 ciclos a 98°C durante 10 s, 64 ou 65°C durante 30 s (temperaturas de *annealing* para cada *primer* indicadas em anexo) e 72°C durante 30 s, terminando com um passo a 72°C durante 10 min.

Dois controlos positivos (DNA extraído a partir das estirpes *Map* ATCC 19698^T e K10) e um controlo negativo (água ultra-pura) foram incluídos em todas as séries de reação, e o produto de PCR foi observado por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (m/v) em tampão TBE 1x, pré-corado com *GelRed™ (Biotium)*, a 90 V durante 1 h e 20 min,

usando um marcador de massas molecular de 100 pb (*Ladder IV, Bioline*). Os produtos amplificados foram purificados pelo sistema comercial, *NZY Gelpure (Nzytech)*, de acordo com as indicações do fabricante, e enviados em microplaca para sequenciação (*GATC Biotech, Alemanha*) numa concentração entre 20 – 80 ng/μL, juntamente com um dos *primers* usado na amplificação a 5 μM. Os SNPs foram nomeados por Leão e colaboradores [61] de acordo com a posição da base polimórfica na sequência do genoma de *Map K10*, e a sua presença, ausência ou alteração no genoma das estirpes em estudo foi analisada com recurso a uma ferramenta de alinhamento local de sequências (*Blast- <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>*). O perfil filogenético de cada isolado foi posteriormente obtido pela combinação dos resultados de todos os SNP analisados de acordo com a árvore de decisão apresentada por Leão e colaboradores [61].

3. Resultados e discussão

3.1 Análise de amostras de fezes por cultura bacteriológica:

Um animal é classificado com *Map* positivo quando a bactéria é isolada de uma matriz biológica adequada, em meio selectivo e/ou se o seu DNA é detetado, diretamente na amostra. De acordo com estes critérios, o método da cultura bacteriológica em meio suplementado com Micobactina J, permitiu o isolamento de *Map* em 28 amostras, todas elas de bovinos, do total de 106 amostras fecais de bovinos (n=95) e de caprinos (n=11) analisadas (Tabela 2). Destas 28 amostras, apenas uma era de um animal sem qualquer tipo de sinal para a doença. Das 95 amostras de bovinos, 32 não apresentaram crescimento bacteriano após 6 meses de incubação e 25 amostras não apresentam crescimento à data da escrita desta dissertação. Contudo, ainda se encontram dentro do tempo previsto de incubação, podendo surgir crescimento bacteriano, 10 amostras apresentaram crescimento de contaminantes impedindo o eventual crescimento de *Map*. No caso das 11 amostras de caprinos inoculadas ainda não se obteve, até ao momento, qualquer cultura positiva. Contudo, todas as amostras de caprinos ainda se encontram dentro do tempo de incubação (até 6 meses) para o desenvolvimento de *Map*, sendo ainda possível que se dê o seu crescimento. As primeiras colónias de *Map* foram visíveis cerca de 2 a 4 meses após a incubação do respetivo meio de cultura inoculado. Em meio HEYM eram muito pequenas, convexas, não mucoides e translúcidas, quase sem coloração. No início, as colónias identificavam-se apenas por um pequeno ponto esbranquiçado (0,25 – 1 mm) no meio de cultura de cor azul. Mas, à medida que o tempo de incubação aumentava, as colónias aumentaram o seu tamanho

(até 2 mm), formando-se uma pequena elevação central, tornando-se opacas ou com uma coloração bege (Figura 3).



Figura 3 – Colonias de *Map* em meio selectivo HEYM suplementado com Micobactina J.

Como seria expectável, para as amostras *Map*-positivas a cultura, os tubos de HEYM Agar inoculados não apresentavam qualquer tipo de crescimento, demonstrando assim a dependência do microrganismo por micobactina exógena.

Devido à baixa taxa de crescimento de *Map*, foi necessário eliminar da nossa amostra os microrganismos contaminantes de crescimento mais rápido. Apesar do processo de descontaminação com HPC ser um dos mais eficientes, esperando-se que, no final do processo de descontaminação, a taxa de contaminação por outros microrganismos seja apenas de 7%, não é totalmente vantajoso. De fato, exige um dia de trabalho e vai reduzir o número de células viáveis de *Map* da amostra, até um fator de 10^3 UFC [63]. Por outro lado, o longo tempo de incubação leva à desidratação do meio sólido com uma possível redução de microrganismos viáveis. A cultura bacteriológica tem um limite de detecção de 100 UFC de *Map* por g de fezes [64], cujo valor pode ser ultrapassado em animais amostrados em fase de infeção clínica. Contudo, numa fase subclínica, apenas 15-25% dos indivíduos são detetados por cultura bacteriológica [65]. Isto significa que se o número de *Map* na amostra de fezes for muito reduzido, porque o

animal está a excretar uma quantidade mínima ou porque este número foi diminuído pelo processo de descontaminação, corre-se o risco de se obter um falso resultado negativo na cultura.

A sensibilidade da cultura bacteriológica em estágios clínicos é cerca de 91% [66] que pode ser reduzida para um intervalo de 45% a 72% [67] em estágios subclínicos. Contudo, a especificidade é sempre elevada (100%) em todas as fases da doença [68]. Uma das vantagens do método cultural é a possibilidade de quantificação de *Map* expresso em UFC por unidade de amostra, o que pode permitir uma classificação dos animais de acordo com o seu nível de excreção, e pode ser uma forma útil de estabelecer um programa de remoção de indivíduos mais afetados da exploração [64, 65]. Por outro lado, tem a desvantagem do alto custo e o elevado tempo de incubação, que pode levar a um elevado risco epidemiológico na exploração devido ao atraso na tomada de decisões. Apesar de se obter um resultado positivo na cultura bacteriológica para as amostras clínicas, e a especificidade elevada dos meios de cultura garantir que se trata de *Map*, a identificação bacteriana geralmente necessita de ser confirmada por métodos moleculares, nomeadamente por PCR, tendo como alvo IS900 e/ou f57. A percentagem de amostras positivas por cultura foi de 26,04%, sendo que apenas 3,5% das amostras eram de animais sem sinais de doença. Os 28 isolados foram todos confirmados como *Map* através de PCR em tempo real f57.

3.2 Resultado de PCR direto nas amostras de fezes:

A percentagem de positivos no PCR direto na amostra foi de 94,3%, o que corresponde a 6 amostras bovinas negativas, do lote animais sem sinais de doença, no total das 106 amostras. Todas as amostras de caprinos foram positivas para a presença de *Map* no método de PCR direto. Os animais positivos a *Map* por cultura também foram positivos por PCR direto. Contudo, até à data, não se obteve isolamento bacteriano de 36 amostras positivas a PCR. Uma das grandes vantagens do PCR é que não necessita de bactérias viáveis na amostra para a sua deteção, mas apenas da presença do seu DNA. Assim, a perda de viabilidade das células devido aos processos de colheita, transporte, conservação e descontaminação das amostras não é um problema neste tipo de metodologia. Por outro lado, uma das grandes desvantagens é a possibilidade de falsos positivos, devido a contaminações durante a execução da técnica, e/ou falsos negativos, devido a possíveis inibições do PCR. Os falsos positivos podem ser controlados com boas práticas de laboratório e utilização de controlos na extração de DNA (controlo negativo de extração) e no PCR (controlo negativo com água ultra-pura). Um dos principais problemas do PCR direto é a presença de inibidores nas amostras

fecais. Diversos inibidores podem estar presentes na amostra biológica como, por exemplo, DNA de outros microrganismos, outro DNA do próprio hospedeiro, polissacarídeos, sais biliares, entre outros, que podem limitar a sensibilidade do método [99]. Uma das formas de contornar a presença destes inibidores seria fazer diluições seriadas da solução de DNA inicial. Contudo, ao diluir-se esta solução, não só estaríamos a diluir a concentração de inibidores, o que poderia aumentar a sensibilidade de amplificação, mas também a concentração de DNA alvo. De fato, se a sequência alvo também for demasiado diluída podemos não ter quantidade suficiente de DNA para atingir o limite de detecção do método. Assim, a forma mais correta de saber se estamos perante um falso negativo seria incluir no método de detecção por PCR em tempo real um controlo interno, por exemplo o gene da β -actina que é constitutivamente expresso no hospedeiro. Partindo do princípio que a amostra de fezes contém células de tecido de mamífero, o PCR em tempo real deveria ter sido realizado com os *primers* e sonda específicos para o gene da β -actina, que existe nestas células, para além dos *primers* e sonda para a sequência IS900, tal como demonstrado por Leão e colaboradores [62]. Assim, caso se dê amplificação da β -actina mas não do DNA alvo de *Map*, confirma-se que não houve inibição do PCR e que estamos perante uma amostra verdadeiramente negativa [69]. No caso de não haver amplificação do gene da β -actina é porque existem inibidores do PCR e não se pode afirmar se a amostra é negativa ou positiva. Uma das limitações do nosso estudo é não podermos afirmar que as amostras negativas são realmente verdadeiros negativos, devido ao fato de não se ter usado controlo interno do PCR.

Após se ter testado o PCR direto na amostra, com e sem diluição do DNA respetivo, chegou-se à conclusão que a diluição era dispensável, visto que um número significativo de amostras (n=22) apresentou o mesmo resultado quando analisado o extrato bruto de DNA e quando diluído a 5 ng/ μ L. Nas amostras de animais sem sintomatologia de paratuberculose e, portanto, supostamente com baixa excreção de *Map* foi aplicado o PCR em formato *nested* em tempo real IS900 a todas as amostras. Por outro lado, devido à suspeição da presença de células *Map* em número elevado nas amostras de fezes de bovinos e caprinos com sintomatologia de paratuberculose, estas foram apenas analisadas por PCR simples em tempo real IS900, sem um primeiro passo de amplificação. Esta decisão foi tomada após se terem testado 10 amostras de animais nestas circunstâncias e se ter obtido, para nove delas, um resultado positivo sem o passo inicial de amplificação por PCR convencional. Isto demonstra que um primeiro passo de amplificação por PCR convencional permite o aumento da concentração de DNA alvo de *Map* e que, para análise das amostras de animais sem qualquer tipo de

suspeita de doença, o PCR em formato *nested* em tempo real IS900 é a metodologia adequada (Figura 4).

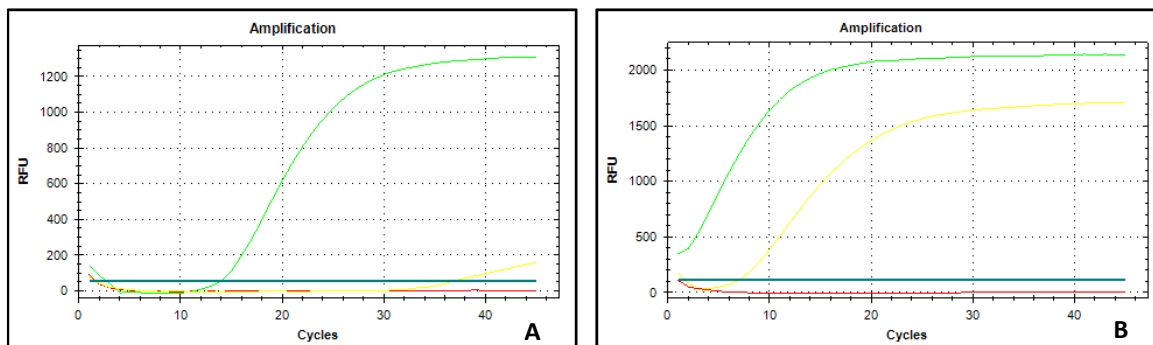


Figura 4 – **A-** resultado da amplificação por PCR simples em tempo real IS900. Verde - controlo positivo (*Map* 19698^T); Vermelho - controlo negativo; Amarelo - amostra de fezes B53. **B-** resultado da amplificação por PCR em formato *nested* em tempo real para a mesma amostra após um primeiro passo de amplificação. Considera-se um resultado positivo qualquer sinal de amplificação entre os 0-38 ciclos.

Tal como Leão e colaboradores [62], também o nosso trabalho permitiu demonstrar que este ensaio de PCR em formato *nested* em tempo real permite melhorar as taxas de deteção de *Map* (Figura 4). Contudo, este ensaio está associado a um risco de aumento de contaminação cruzada das amostras. Assim, é de grande importância ressaltar a necessidade de trabalhar num laboratório de diagnóstico com boas práticas, como material descartável e salas separadas: uma primeira livre de DNA, para preparação da mistura de reação e uma segunda para adição do DNA alvo. Deve-se ainda incluir sempre os devidos controlos, negativo e positivo. No entanto, este PCR torna-se inadequado para quantificar a quantidade de DNA que está presente na amostra, dado que a sequência se encontra em múltiplas cópias e, por outro lado, é impossível saber qual a quantidade de DNA que estamos a adicionar ao segundo passo do PCR, após um primeiro passo de amplificação.

A disponibilidade de ensaios “*ante-mortem*” como este permite uma deteção rápida e conclusiva de *Map* em amostras biológicas de animais vivos, tornando-se uma grande vantagem na melhoria da eficiência dos programas de controlo da PTB e na diminuição dos custos económicos associados.

3.3 Cultura bacteriológica versus PCR direto na amostra:

O teste de McNemar permitiu avaliar a significância da diferença entre os dois métodos de diagnóstico [70]. As diferenças dos resultados de cultura bacteriológica vs PCR direto

na amostra mostraram-se estatisticamente significativas, apresentando um valor de $P < 0,0001$ e, portanto, a hipótese nula de que ambas as metodologias produzem resultados iguais foi rejeitada. A proporção de amostras positivas de cada metodologia foi calculada através do quociente do número de amostras positivas, pela soma de amostras positivas e negativas e multiplicado o resultado por 100. A proporção do PCR direto na amostra foi de 94,3% enquanto a da cultura foi de 26,04%. Como referido anteriormente a diferença na proporção de positivos pode ser devida a vários fatores que influenciam o método bacteriológico, como a recolha, o transporte, o tratamento da amostra ou, devido ao fato da sensibilidade dos métodos variar com a fase da doença ou, devida à diferença entre os limites de deteção dos dois métodos.

3.4 Tipificação de DNA de estirpes de *Map* da ilha de S. Miguel por MIRU-VNTR:

Cinquenta e três DNAs de *Map* (Tabela 3), existentes na coleção do INIAV, previamente extraídos de estirpes de *Map* isoladas de caprinos e bovinos de diferentes freguesias de S. Miguel, Açores, foram tipificados por MIRU-VNTR, recorrendo à deteção do número de repetições em oito *loci* TR (*Tandem Repeat*): X3, 3, 7, 10, 25, 32, 47 e 292. Esta análise começa a ser cada vez mais utilizada em estudos de tipificação de estirpes, pois trata-se de uma abordagem mais rápida, menos dispendiosa e aplicável a estirpes não-cultiváveis. Esta abordagem tem ainda um elevado poder discriminatório e está associada à base de dados MAC INMV, que se encontra *online* e permite fazer uma comparação a nível mundial (<http://mac-inmv.tours.inra.fr/>). Após a análise do tamanho dos fragmentos em gel de agarose, a respetiva correspondência com o número de repetições do *locus* em estudo foi feita através de uma tabela disponível na base de dados MAC INMV (Tabela 8).

Após revelação do gel de agarose, quando havia amplificação de mais do que um fragmento, todos com a mesma intensidade, considerou-se para o estudo o fragmento de maior massa molecular. Contudo, em situações como a revelada acima na figura 5, pista 7, considerou-se o fragmento de maior intensidade e não o de maior massa molecular.

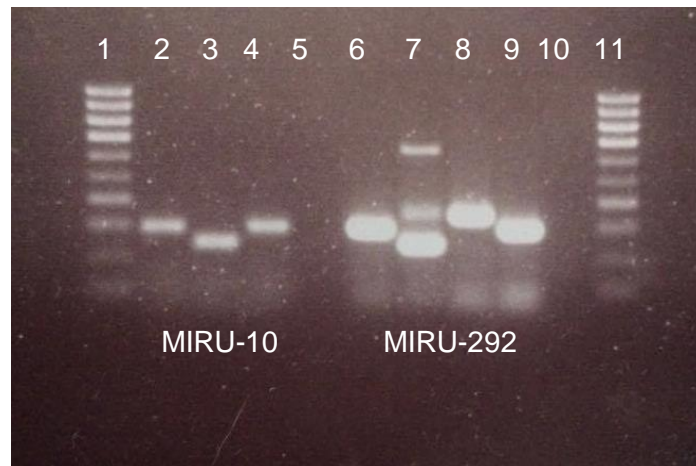


Figura 5 – Eletroforese em gel de agarose a 2,5% dos produtos de amplificação do PCR para os *loci* MIRU-10 e MIRU-292. Pista 1 e 11 - marcador de massas moleculares 100 pb; pista 2, 3 e 4 - amplificação do *locus* MIRU-10 nas estirpes *Map* A25, A26 e estirpe de referência *Map* ATCC 19698^T; pista 6,7,8 e 9 - amplificação do *locus* MIRU-292 nas estirpes *Map* A21, A22, A23 e estirpe de referência *Map* ATCC 19698^T; pista 5 e 10 - controlo negativo.

As 43 estirpes *Map* isoladas de bovinos geraram uma grande diversidade de perfis INMV (9 perfis), enquanto as 10 estirpes *Map* isoladas de caprinos originaram todas o mesmo perfil (INMV 16).

Nas estirpes isoladas de caprinos, obteve-se o mesmo perfil (INMV 16) em todos os DNAs de *Map* tipificados (Tabela 3). Este resultado é plausível, visto tratarem-se de animais que pertenciam à mesma exploração agrícola e, portanto, representavam uma única unidade epidemiológica. Anteriormente, Leão e colaboradores (2015) verificaram que o perfil SNP destes isolados de caprinos também era o mesmo (perfil SNP 3) [61]. Por outro lado, para as estirpes isoladas de bovinos, o padrão é variado e mesmo em amostras colhidas na mesma exploração existe mais do que um perfil. Nestas estirpes *Map*, o perfil predominante foi o perfil INMV 3, que se observou em 15 estirpes da ilha de S. Miguel, seguido do perfil INMV 2, com 13 estirpes (Tabela 3).

De acordo com a predominância e distribuição geográfica por freguesias (Figura 6), verifica-se que os perfis mais abundantes na ilha de S. Miguel são o INMV 3 (34,9%) e o INMV 2 (30,2%), este último mais disperso pelas freguesias da região e também mais frequente na Europa. Nem todos os dados publicados por diversos autores sobre a análise de MIRU-VNTR usam os mesmos *loci* e na mesma ordem, o que complica a análise comparativa dos resultados. Contudo, Thibault e colaboradores (2007) verificaram que 35% e 61% de isolados de *Map* obtidos de bovinos em França e Holanda, respetivamente, apresentam o perfil INMV 2 [55].

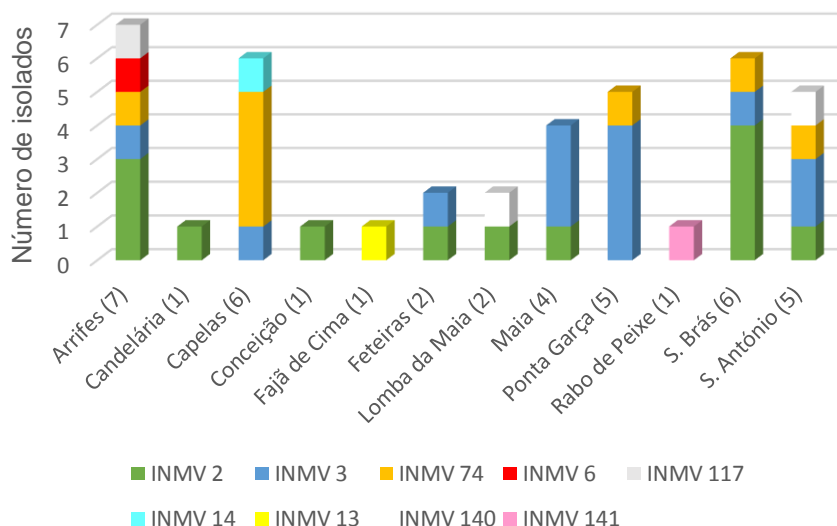


Figura 6 - Distribuição de perfis INMV de 41 estirpes *Map*, por 12 freguesias, da ilha de S. Miguel, Açores.

Em S. Miguel, o perfil INMV 2 encontra-se disperso por oito explorações em oito freguesias, enquanto o INMV 3 por sete, co-existindo os dois em cinco explorações. A multiplicidade de perfis, encontrada nas explorações em que foram analisadas mais amostras, pode ser explicada pelo fato destes bovinos serem criados ao ar livre e não estarem confinados a apenas um espaço, aumentando a probabilidade de disseminação destes perfis epidemiológicos por outros animais. Das 43 estirpes *Map* isoladas de bovinos, na freguesia de Capelas (lado Ocidental da ilha) o perfil mais abundante é o INMV 74 (66,6%) e, o fato de este perfil se ter identificado também na exploração de S. António em uma estirpe deve-se, provavelmente, à proximidade das explorações (Figura 7). Em Arrifes, existem dois perfis únicos (cada um com uma estirpe), que não existem em mais nenhuma das freguesias em estudo, o INMV 6 e o INMV 117, situando-se esta exploração na parte Sul da ilha, mais afastada das outras freguesias. Na zona Oriental da ilha, na Maia, 75% das estirpes *Map* analisadas pertencem ao perfil INMV 3, enquanto em S. Brás, 66,6% das estirpes pertencem ao perfil INMV 2. Mas, devido à proximidade destas duas freguesias, os perfis INMV 2 e 3 são comuns às duas explorações, sendo que em S. Brás existe uma estirpe INMV 3 e na Maia uma INMV 2. Na freguesia de Ponta Garça o perfil mais comum entre as estirpes analisadas é o INMV 3 (80%). Em Rabo de Peixe, Fajã de Cima, Candelária e Conceição, apenas uma estirpe *Map* foi analisada o que impede a análise da diversidade de perfis MIRU-VNTR

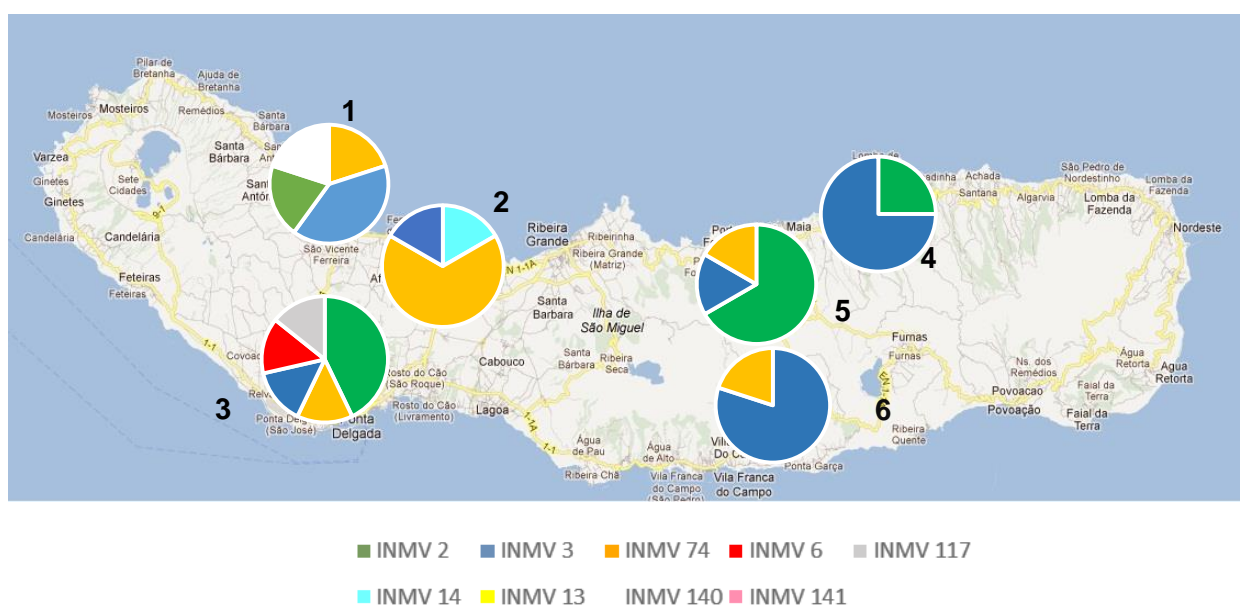


Figura 7 - Distribuição espacial dos perfis INMV por freguesia da ilha de S.Miguel, Açores. 1- S. António; 2- Capelas; 3- Arrifes; 4- Maia; 5- S. Brás; 6- Ponta Garça.

O índice de diversidade de Simpson [71] permitiu avaliar o equilíbrio entre o número de indivíduos e o número de perfis em análise numa determinada freguesia da ilha. Esta análise não foi realizada para as freguesias de Candelária, Conceição, Fajã de Cima e Rabo de Peixe uma vez que apenas uma amostra foi tipificada em cada uma delas.

Tabela 10 – Valores de índice de diversidade Simpson por freguesia da ilha de S. Miguel, Açores.

Freguesia	Simpson
Arrifes	0,2653
Capelas	0,6
Feteiras	0,5
Lomba da Maia	0,5
Maia	0,68
Ponta da Garça	0,68
S. Brás	0,5
S. António	0,28

A genotipagem de 12 isolados de *Map* obtidos de bovinos do Norte de Portugal Continental, por Leão e Colaboradores (2015), é a única informação disponível para comparar dados sobre Portugal. Este foi o primeiro estudo a caracterizar molecularmente isolados de *Map* de bovinos. Para os 12 isolados, foi obtido o mesmo

perfil INMV 2 e, tal como no nosso estudo, este também foi um dos perfis mais abundantes [57]. Assim, os nossos resultados sugerem a hipótese de que a maioria das estirpes *Map* isoladas, tanto da parte Ocidental como Oriental da ilha de S. Miguel, pertencem à mesma linhagem clonal, assim como os isolados de bovinos do Norte de Portugal Continental. O nosso estudo sugere, ainda, que estes dois perfis, INMV 2 e 3, serão os mais abundantes da ilha de S. Miguel, pois potencialmente circularão no ambiente, após a sua excreção nas fezes dos animais. Os resultados obtidos sugerem a existência de uma fonte ambiental e a transmissão indireta do microrganismo, provavelmente através da água, vegetação ou ração animal contaminada por *Map*, na localização geográfica onde estes animais circulam.

3.5 Tipificação de estirpes de *Map* da ilha de S. Miguel por análise de SNPs:

Os resultados da sequenciação dos 14 SNPs em estudo, em 11 estirpes *Map* isoladas de diferentes freguesias da ilha de S. Miguel, Açores (Tabela 4), e também tipificados por MIRU-VNTR neste estudo, foram comparados com a estirpe de referência *M. paratuberculosis* K10. Leão e colaboradores criaram uma árvore de decisão com o menor número de SNPs necessários (neste caso 14) para agrupar os isolados em 14 grupos filogenéticos. A base que está na posição do genoma correspondente ao SNP vai definir o caminho a seguir nesta árvore. A tabela 9 (em anexo) indica os 14 SNPs definidos por Leão e colaboradores em 2015, nomeados de acordo com a sua posição na sequência do genoma de *Map* K10 [61].

O DNA destas 11 estirpes foram, anteriormente, analisadas no nosso estudo por MIRU-VNTR e geraram 6 perfis distintos (Tabela 4). Contudo, quando tipificadas por análise SNP foram classificadas em apenas dois perfis SNP diferentes, sendo que um deles corresponde ao novo perfil SNP descrito por Leão e colaboradores (*Clade* 11) [61]. Apenas duas estirpes foram identificadas como pertencendo a este novo perfil SNP, pertencendo todas as outras nove ao perfil SNP 4. Assim, de acordo com esta árvore de decisão (Figura 8), as nossas estirpes analisadas são todos do tipo C e pertencem a dois grupos filogenéticos dentro do sub-grupo A: nove pertencem à *Clade* 4 e apenas duas estirpes pertencem à *Clade* 11, apresentando um ancestral comum.

De todas as estirpes *Map* analisadas, apenas duas (A7 e A33) tinham em comum o fato de pertencerem à mesma freguesia da ilha (Arrifes), sendo identificados no mesmo grupo filogenético (*Clade* 4). Assim, os nossos resultados permitiram diferenciar apenas dois grupos filogenéticos diferentes entre as 11 estirpes *Map* de diferentes freguesias, o que demonstra mais uma vez a capacidade de disseminação deste microrganismo.

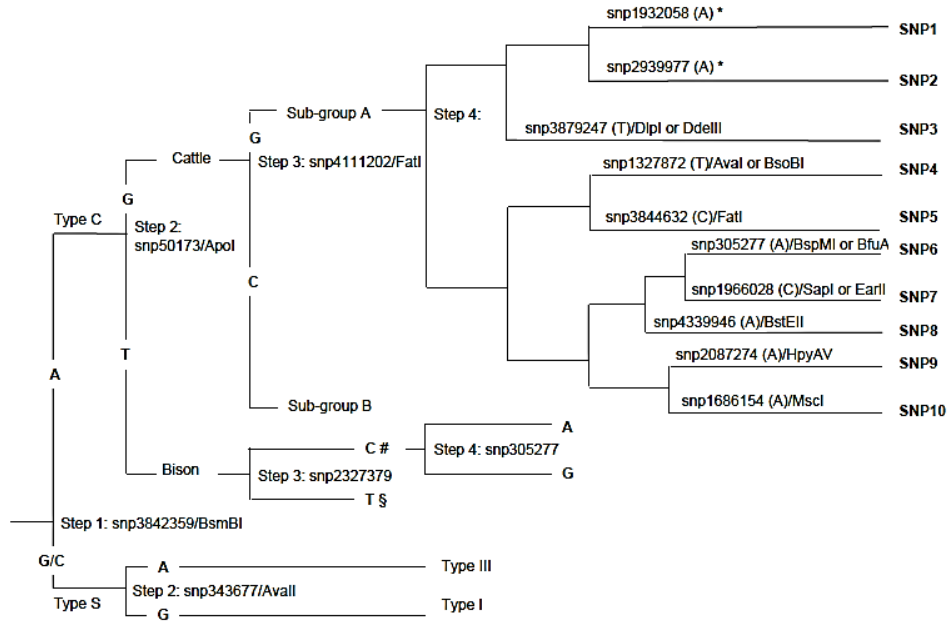


Figura 8 – Representação esquemática da árvore de decisão descrita por Leão e colaboradores [61], com os passos sequenciais numerados, a posição dos SNP, as bases esperadas e os perfis SNP correspondentes. As letras indicam a base esperada na posição do SNP.

Uma das facilidades desta metodologia é, tal como a tipificação por MIRU-VNTR, ser aplicável a baixas concentrações de DNA genómico e ser baseada apenas em PCR convencional, mas requer a posterior análise por restrição enzimática ou por sequenciação dos fragmentos amplificados. Segundo Leão e colaboradores [61], esta análise tem vantagem em relação ao método de tipificação por MIRU-VNTR, visto que permite discriminar qual o tipo de estirpe *Map*, tipo C ou tipo S, e qual o subtipo. No caso de ser uma estirpe do tipo C, pode ainda dar-nos informação acerca do sub-grupo, e dentro do sub-grupo A qual a *Clade* a que pertence.

No nosso estudo, as 11 estirpes analisadas por ambas as metodologias MIRU-VNTR e SNPs, foram agrupados em seis perfis de INMV, enquanto pela análise de SNP só foram agrupados em dois grupos filogenéticos (Tabela 4). Logo, a técnica de MIRU-VNTR mostrou-se mais discriminatória. De acordo com o índice discriminatório de Hunter e Gaston [61], o poder discriminatório do ensaio de SNP foi de 0,3273 para as 11 estirpes analisadas, enquanto o poder discriminatório do ensaio MIRU-VNTR foi de 0,8545 para as mesmas estirpes.

Além de permitir avaliar as relações filogenéticas entre os indivíduos, este ensaio SNP é simples e globalmente reprodutível em larga escala. Uma das desvantagens é que este tipo de metodologia não é assim tão acessível devido ao custo da sequenciação.

Por outro lado, é necessário haver atualização contínua dos genomas completos disponíveis *online*, a fim de melhor caracterizar novos grupos filogenéticos e perfis SNP pois, tal como aconteceu com Leão e colaboradores, novos perfis SNP podem ser descobertos a cada novo estudo.

4. Conclusões finais e perspectivas

O grande objectivo deste estudo foi comprovar a presença de paratuberculose em várias explorações de gado bovino e caprino, através do isolamento de *Map* em fezes, aplicando para isso tanto uma técnica de cultura bacteriológica como uma técnica molecular de detecção direta nesta matriz. Paralelamente, alargou-se o estudo epidemiológico por tipificação MIRU-VNTR e SNP a estirpes *Map*, anteriormente isoladas, permitindo a caracterização da população de *Map* que circula na ilha de S. Miguel, Açores e a sua distribuição espacial.

A percentagem de positivos no PCR direto para detetar *Map* nas amostras de fezes, foi de 94,3% enquanto a percentagem de positivos na cultura foi de 26,04%. A cultura bacteriológica permitiu o isolamento de *Map* em 28 amostras de bovinos de um total de 106 amostras de fezes. Deste modo, os nossos resultados permitem-nos afirmar que a paratuberculose é uma doença que existe nas explorações analisadas, mas que é subvalorizada, pois o impacto económico causado aos produtores e ao país ainda não está estimado. Contudo, estima-se que mais de 50% das explorações na Europa e mais de 47% das explorações Portuguesas estão infetadas com *Map* [38, 44].

A PTB tem um enorme impacto na saúde animal e estudos indicam que pode apresentar um potencial zoonótico, apesar da relação causal entre *Map* e a doença de Crohn ainda não estar totalmente comprovada. O entendimento da epidemiologia desta doença deve ser um ponto crucial da investigação científica, a fim de controlar a sua ocorrência em animais domésticos e a sua disseminação na vida selvagem. Outro ponto que podemos evidenciar no nosso trabalho é a contribuição para um melhor e mais rápido diagnóstico de *Map* em animais vivos, através da complementação da cultura bacteriológica com a metodologia de PCR direto da amostra. A grande vantagem desta metodologia é a rapidez com que o resultado pode ser dado ao produtor para que este haja em conformidade com o resultado.

A genotipagem por MIRU-VNTR de estirpes *Map*, isoladas anteriormente de fezes de bovinos e caprinos, revelou a presença da mesma linhagem clonal em diferentes freguesias da ilha de S. Miguel, Açores, provavelmente devido à transmissão direta e indireta deste microrganismo ao longo da ilha. Apesar da existência de nove perfis INMV

diferentes, o nosso estudo mostrou que os mais comuns na ilha são o perfil INMV 2 e INMV 3. Nestas situações, consideramos que a sensibilização dos produtores e da população para o impacto da doença é um passo que deve ser dado para a implementação da prevenção e medidas de controlo da paratuberculose. É ainda de extrema importância referir a enorme utilidade da base de dados usada neste estudo (MAC-INMV) assim como a sua constante atualização com novos perfis, essencial aos estudos epidemiológicos.

Por último, a análise de SNPs de 11 estirpes *Map* de diferentes freguesias, permitiu-nos perceber que isolados de diferentes regiões podem pertencer ao mesmo grupo filogenético, corroborando a possibilidade de uma fonte ambiental e, mais uma prova da capacidade de disseminação deste microrganismo. Os nossos dados mostraram que todas as estirpes *Map* analisadas eram do tipo C, mas pertenciam a dois grupos filogenéticos diferentes do sub-grupo A. Uma futura perspetiva será a atualização contínua deste ensaio de SNPs, que permitirá uma melhor caracterização de novos grupos filogenéticos. E, tal como acontece com a tipificação por MIRU-VNTR, para uniformizar os estudos filogenéticos em *Map* e permitir a comparação de resultados com outros autores, era importante criar uma base de dados para a tipificação de *Map* por SNP. Assim, os genótipos obtidos seriam classificados por grupos filogenéticos que mais facilmente poderiam ser comparados globalmente.

5. Bibliografia

1. Saviola B, Bishai W. (2006). The Genus *Mycobacterium* – Medical. Prokaryotes. vol. 3, pp 919–933.
2. Madigan M, Martinko J, Dunlap P, Clark D. (2009). Brock Biology of Microorganisms. 12th ed. Pearson Education Inc.
3. Liu J., C. E. Barry C. E., G. S. Besra e H. Nikaido (1996). Mycolic Acid Structure Determines the Fluidity of the Mycobacterial Cell Wall, The Journal of Biological Chemistry, vol. 271, pp 29545–29551.
4. Thorel, M. F., et al. (1990). 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.* Int J Syst Bacteriol 40(3): 254-260.
5. Tortoli, E. (2003). Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. Clin Microbiol Rev 16(2): 319-354.
6. Turenne, C. Y., et al. (2008). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. avium* subsp. *avium* are independently evolved pathogenic clones of a much broader group of *M. avium* organisms. J Bacteriol 190(7): 2479-2487.
7. Manning EJB, Collins MT. (2010). History of paratuberculosis. In Behr MA, Collins DM (eds) Paratuberculosis: Organism, Disease, Control. CAB International, Cambridge, MA, pp 1-9.
8. Whittington, R. J., et al. (2011). Culture phenotypes of genomically and geographically diverse *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from different hosts. J Clin Microbiol 49(5): 1822-1830.
9. Salem, M., et al. (2013). *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: an insidious problem for the ruminant industry. Trop Anim Health Prod 45(2): 351-366.
10. Hett, E. C. and E. J. Rubin (2008). Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective. Microbiol Mol Biol Rev 72(1): 126-156, table of contents.
11. Stevenson, K., et al. (2010) Comparative Differences between Strains of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*. em Behr MA, Collins DM. Paratuberculose: Organism, Disease, Control. London, UK; 2011: 126-133.

12. Grant, I. R., et al. (2002). Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in bulk raw and commercially pasteurized cows' milk from approved dairy processing establishments in the United Kingdom. *Appl Environ Microbiol* 68(5): 2428-2435.
13. Ronai, Z., et al. (2015). Molecular identification of *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* by duplex high-resolution melt analysis and subspecies-specific real-time PCR. *J Clin Microbiol* 53(5): 1582-1587.
14. Lombard, J. E. (2011). Epidemiology and economics of paratuberculosis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 27(3): 525-535.
15. Bannantine, J. P., et al. (2003). Genomic homogeneity between *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* belies their divergent growth rates. *BMC Microbiol* 3: 10.
16. Collins, D. M., et al. (1989). Identification of a repetitive DNA sequence specific to *Mycobacterium paratuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett* 51(1): 175-178.
17. Li, L., et al. (2005). The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(35): 12344-12349.
18. Strommenger, B., et al. (2001). Isolation and diagnostic potential of ISMav2, a novel insertion sequence-like element from *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett* 196(1): 31-37.
19. Stabel, J. R. and J. P. Bannantine (2005). Development of a nested PCR method targeting a unique multicopy element, ISMap02, for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fecal samples. *J Clin Microbiol* 43(9): 4744-4750.
20. Coetsier, C., et al. (2000). Duplex PCR for differential identification of *Mycobacterium bovis*, *M. avium*, and *M. avium* subsp. *paratuberculosis* in formalin- fixed paraffin-embedded tissues from cattle. *J Clin Microbiol* 38(8): 3048-3054.
21. Tasara, T. and R. Stephan (2005). Development of an f57 sequence-based real-time PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *Appl Environ Microbiol* 71(10): 5957-5968.
22. Imirzalioglu, C., et al. (2011). Highly specific and quick detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in feces and gut tissue of cattle and humans by multiple real-time PCR assays. *J Clin Microbiol* 49(5): 1843-1852.

23. Stevenson, K., et al. (2002). Molecular characterization of pigmented and nonpigmented isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. J Clin Microbiol 40(5): 1798-1804.
24. Stevenson, K., et al. (2010) Comparative Differences between Strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Behr MA, Collins DM. Paratuberculose: Organism, Disease, Control. London, UK; 2011: 126-133.
25. Stevenson, K., et al. (2015). Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and the influence of strain type on infection and pathogenesis: a review. Vet Res 46: 64.
26. Manning EJB, Collins MT. (2010). Epidemiology of paratuberculosis. In Behr MA, Collins DM (eds) Paratuberculosis: Organism, Disease, Control. CAB International, Cambridge, MA, pp 22-28.
27. Lambeth, C., et al. (2004). Intrauterine and transmammary transmission of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in sheep. Aust Vet J 82(8): 504-508.
28. Munster, P., et al. (2013). A longitudinal study to characterize the distribution patterns of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in semen, blood and faeces of a naturally infected bull by IS900 semi-nested and quantitative real-time PCR. Transbound Emerg Dis 60(2): 175-187.
29. OIE (2014). Paratuberculosis (Johne's Disease). In OIE Terrestrial Manual (World Organisation for Animal Health), Chapter 2.1.11.
30. Beard, P. M., et al. (2001). Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland. J Clin Microbiol 39(4): 1517-1521.
31. Glanemann, B., et al. (2008). Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*-specific DNA by PCR in intestinal biopsies of dogs." J Vet Intern Med 22(5): 1090-1094.
32. Stief, B., et al. (2012). Paratuberculosis in a miniature donkey (*Equus asinus* f. *asinus*). Berl Munch Tierarztl Wochenschr 125(1-2): 38-44.
33. Carta, T., et al. (2013). Wildlife and paratuberculosis: a review. Res Vet Sci 94(2): 191-197.
34. Whitlock, R. H. and C. Buergelt (1996). Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). Vet Clin North Am Food Anim Pract 12(2): 345-356.

35. Fecteau M-E, Whitlock RH. (2010). Paratuberculosis in cattle. In Behr MA, Collins DM: Paratuberculosis: Organism, Disease, Control. CAB International, Cambridge, MA, pp144-156.
36. Leão C, Inácio J, Botelho A. (2013). Highlights on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a fastidious yet insidious microorganism. Port Soc Microbiol Mag 2nd year, n. 3.
37. Timms V.J., Gehringer M.M., Mitchell H.M., Daskalopoulos G. & Neilan B.A. (2011). Review. How accurately can we detect *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection? J. Microbiol. Methods 85:1-8.
38. Kennedy, D., (2011). International efforts at paratuberculosis control. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, 27: 647–54.
39. Manning EJB, Collins MT. (2010). Epidemiology of paratuberculosis. In Behr MA, Collins DM: Paratuberculosis: Organism, Disease, Control. CAB International, Cambridge, MA, pp 22-28.
40. Ferreira A, Mariano I, Caetano MC, Nuncio P, Carrilho E, Sousa C, Lopes S, Almeida V, Penha-Gonçalves A. (2002). Epidemiological study of paratuberculosis in ruminants in Alentejo, Portugal. In: Juste RA (Ed), Proc. VII Int Coll PTBC. Bilbao.
41. Mendes S, Boinas F, Albuquerque T, Fernandes L, Afonso A, Amado A. (2004). Epidemiological studies on paratuberculosis in small ruminants in Portugal. Epidémiol et santé anim. 45:61-71.
42. Correia-Gomes C, Mendonça D, Niza-Ribeiro J. (2010). Risk associations to milk ELISA result for paratuberculosis in dairy cows in northern Portugal using a multilevel regression model. Revue Méd Vét 161:295-301.
43. Coelho AC, Pinto ML, Silva S, Coelho AM, Rodrigues J, Juste RA. (2007). Seroprevalence of ovine paratuberculosis infection in the Northeast of Portugal. Small Ruminant Res 71:298-303.
44. Quintas H, Coelho AC, Valentim R, Vila AG, Prendes SM, Maurício R, Mendonça A. (2012). Serological survey of Map infection in goats in the Northeast of Portugal. Proceedings of the XXVII World Buiatrics Congress, Lisbon, Portugal, pp. 315.
45. Coelho, A. C., et al. (2010). Comparative evaluation of PCR in Ziehl-Neelsen stained smears and PCR in tissues for diagnosis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Indian J Exp Biol 48(9): 948-950.

46. Li, L., et al. (2005). The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A 102(35): 12344-12349.
47. Eglund S. (2002): Molecular biology techniques as a tool for detection and characterization of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Doctoral dissertation departement of Veterinary Microbiology, SLU. Acta Univ. Agri. Sci. Vet., 123:1401-6257.
48. Green, E. P., et al. (1989). Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. Nucleic Acids Res 17(22): 9063-9073.
49. Englund S., Bolske G. and Johansson K.E. (2002): An IS900 like sequence found in a *Mycobacterium* species other than *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. FEMS Microbiol. Lett., 209:267-271.
50. Herthnek D., Englund S., Willemsen P.T. and Bolske G. (2006): Sensitive detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine semen by real time PCR. J. Appl. Microbiol., 100:1095-1102.
51. Poupart, P., et al. (1993). Preparation of a specific RNA probe for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* and diagnosis of Johne's disease. J Clin Microbiol 31(6): 1601-1605.
52. Bölske G, Herthnek D. (2010). Diagnosis of Paratuberculosis by PCR. In Behr MA, Collins DM (eds) Paratuberculosis: Organism, Disease, Control. CAB International, Cambridge, MA, pp 267-283.
53. Supply, P., et al. (1997). Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon. Mol Microbiol 26(5): 991-1003.
54. Bull, T. J., et al. (2003). Detection and verification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fresh ileocolonic mucosal biopsy specimens from individuals with and without Crohn's disease. J Clin Microbiol 41(7): 2915-2923.
55. Thibault, V. C., et al. (2007). New variable-number tandem-repeat markers for typing *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. avium* strains: comparison with IS900 and IS1245 restriction fragment length polymorphism typing. J Clin Microbiol 45(8): 2404-2410.
56. Castellanos, E., et al. (2010). Molecular characterization of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* Types II and III isolates by a combination of MIRU-VNTR loci. Vet Microbiol 144(1-2): 118-126.

57. Leão C, Amaro A, Santos-Sanches I, Inácio J, Botelho A. (2015). Paratuberculosis asymptomatic cattle as spillovers of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: consequences for disease control. *Rev Port Ciênc Vet* 110: 69-73.
58. Wynne, J. W., et al. (2014). SNP genotyping of animal and human derived isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Microbiol* 172(3-4): 479-485.
59. Castellanos, E., et al. (2007). Polymorphisms in *gyrA* and *gyrB* genes among *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* type I, II, and III isolates. *J Clin Microbiol* 45(10): 3439-3442.
60. Castellanos E, Aranaz A, de Juan L, Álvarez J, Rodríguez S, Romero B, Bezos J, Stevenson K, Mateos A, Domínguez L. (2009). Single nucleotide polymorphisms in the IS900 sequence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* are strain type specific. *J Clin Microbiol* 47:2260–2264.
61. Leão C, Goldstone RJ, Bryant J, McLuckie J, Inácio J, Smith DGE, Stevenson K. 2015. Novel SNP-based assay for genotyping *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. In press (doi: 10.1128/JCM.01958-15).
62. Leão C, Cruz C, Amaro A, Pinto C, Santos-Sanches I, McLuckie J, Watkins C, Stevenson K, Botelho A, Inácio J. (2015). Effectiveness of nested IS900-targeted real time PCR to detect *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in faeces. In Leão C, Molecular tools in the diagnostic and epidemiology of infections caused by members of *Mycobacterium avium* Complex. PhD dissertation.
63. Reddacliff, L. A., et al. (2003). The effect of decontamination protocols on the numbers of sheep strain *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from tissues and faeces. *Vet Microbiol* 95(4): 271-282.
64. Merkal R.S. and Curran B.J. (1974): Growth and metabolic characteristics of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Appl. Microbiol.*, 28:276-279.
65. Whitlock, R. H. and C. Buergelt (1996). Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 12(2): 345-356.
66. Alinovi, C. A., et al. (2009). Real-time PCR, compared to liquid and solid culture media and ELISA, for the detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. *Vet Microbiol* 136(1-2): 177-179.

67. Crossley, B. M., et al. (2005). Fecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by dairy cows. *Vet Microbiol* 107(3-4): 257-263.
68. Ayele, W. Y., et al. (2005). *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* cultured from locally and commercially pasteurized cow's milk in the Czech Republic. *Appl Environ Microbiol* 71(3): 1210-1214.
69. Costa, P., et al. (2013). Enhanced detection of tuberculous mycobacteria in animal tissues using a semi-nested probe-based real-time PCR. *PLoS One* 8(11): e81337.
70. Mc, N. Q. (1947). Note on the sampling error of the difference between correlated proportions or percentages. *Psychometrika* 12(2): 153-157.
71. https://www.alyoung.com/labs/biodiversity_calculator.html
72. Sidoti, F., et al. (2011). Validation and standardization of IS900 and f57 real-time quantitative PCR assays for the specific detection and quantification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Can J Microbiol* 57(5): 347-35

6. Anexos

Tabela 2 – Resultados da cultura bacteriológica e do PCR em formato *nested* em tempo real IS900 direto de amostras de fezes, e resultado do PCR em tempo real f57 para confirmação da identificação como *Map* dos isolados obtidos.

Código da amostra	Localização Geografica	Sintomas	Isolamento cultural	Valores de Cq	
				PCR IS900	PCR f57 dos isolados
B1	Portugal Continental	Sem sintomas	Negativo	Negativo ⁽¹⁾	NA
B2	Portugal Continental	Sem sintomas	Negativo	Negativo ⁽¹⁾	NA
B3	Portugal Continental	Sem sintomas	Negativo	Negativo ⁽¹⁾	NA
B4	Portugal Continental	Sem sintomas	Negativo	Negativo ⁽¹⁾	NA
B5	Portugal Continental	Sem sintomas	Negativo	7,22 ⁽¹⁾	NA
B6	Portugal Continental	Sem sintomas	Negativo	6,28 ⁽¹⁾	NA
B7	Portugal Continental	Sem sintomas	++	7,45 ⁽¹⁾	25,28
B9	Portugal Continental	Sem sintomas	Negativo	7,13 ⁽¹⁾	NA
B10	Portugal Continental	Sem sintomas	Negativo	Negativo ⁽¹⁾	NA
B11	Portugal Continental	Sem sintomas	Negativo	6,99 ⁽¹⁾	NA
B12	Portugal Continental	Sem sintomas	Negativo	35,23 ⁽¹⁾	NA
B13	Portugal Continental	Sem sintomas	Negativo	Negativo ⁽¹⁾	NA
B14	Portugal Continental	Sem sintomas	Negativo	38,92 ⁽¹⁾	NA
B15	Portugal Continental	Sem sintomas	Negativo	36,18 ⁽¹⁾	NA
B16	Portugal Continental	Sem sintomas	Negativo	38 ⁽¹⁾	NA
B17	Portugal Continental	Sem sintomas	Negativo	39,68 ⁽¹⁾	NA
B18	Portugal Continental	Sem sintomas	Negativo	7,05 ⁽¹⁾	NA
B19	Portugal Continental	Sem sintomas	Negativo	7,75 ⁽¹⁾	NA
B20	Portugal Continental	Sem sintomas	Negativo	10,05 ⁽¹⁾	NA
B21	Portugal Continental	Sem sintomas	Negativo	34,03 ⁽¹⁾	NA
B22	Portugal Continental	Sem sintomas	Negativo	7,99 ⁽¹⁾	NA
B23	Portugal Continental	Sem sintomas	Negativo	6,54 ⁽¹⁾	NA
B24	Açores	Diarreia e caquexia	Negativo	5,28	NA
B25	Açores	Diarreia e caquexia	++	31,86	15,16
B27	Açores	Diarreia e caquexia	+	29,07	35,4
B28	Açores	Diarreia e caquexia	Negativo	98,26	NA
B29	Açores	Diarreia e caquexia	Negativo	30,63	NA
B32	Açores	Diarreia e caquexia	Negativo	38,5	NA
B33	Açores	Diarreia e caquexia	Negativo	35,34	NA
B34	Açores	Diarreia e caquexia	+++	7,12	34,8
B35	Açores	Diarreia e caquexia	Negativo	15,24	NA
B36	Açores	Diarreia e caquexia	+++	36,23	32,5
B37	Açores	Diarreia e caquexia	Negativo	36,32	NA
B38	Açores	Diarreia e caquexia	Negativo	29,95	NA
B39	Açores	Diarreia e caquexia	+	25,73	32,8

B40	Açores	Diarreia e caquexia	Negativo	29,71	NA
B41	Açores	Diarreia e caquexia	+	25,57	32,5
B42	Açores	Diarreia e caquexia	++	26,42	33,72
B43	Açores	Diarreia e caquexia	Negativo	32,21	NA
B44	Açores	Diarreia e caquexia	+++	27,27	29,45
B45	Açores	Diarreia e caquexia	+	20,84	26,3
B46	Açores	Diarreia e caquexia	+++	27,27	31,4
B49	Açores	Diarreia e caquexia	Negativo	23,43	NA
B50	Açores	Diarreia e caquexia	+	32,55	38,45
B53	Açores	Diarreia e caquexia	++	31,54	32,04
B55	Açores	Diarreia e caquexia	++	24,19	29,08
B57	Açores	Diarreia e caquexia	++	24,02	25,74
B58	Açores	Diarreia e caquexia	+	33,8	32,55
B67	Açores	Diarreia e caquexia	+	31,54	29,95
B68	Açores	Diarreia e caquexia	+	24,14	35,34
B70	Açores	Diarreia e caquexia	+	31,6	31,02
B73	Açores	Diarreia e caquexia	+	29,39	29,71
B74	Açores	Diarreia e caquexia	+++	28,17	31,6
B75	Açores	Diarreia e caquexia	++	20,33	25,57
B78	Açores	Diarreia e caquexia	+++	32,62	34,5
B80	Açores	Diarreia e caquexia	+++	21,16	32,5
B83	Açores	Diarreia e caquexia	++	32,86	45,5
B87	Açores	Diarreia e caquexia	+	33,18	33,4
B101	Açores	Diarreia e caquexia	++	28,08	30,24
B106	Açores	Diarreia e caquexia	++	20,39	28,4

Legenda: + até 10 colónias; ++ entre 10 e 30 colónias; +++ mais de 30 colónias; ⁽¹⁾ PCR em formato *nested* tempo real IS900; NA= não aplicável

Tabela 3 - Resultados da tipificação molecular por MIRU-VNTR de estirpes *Map* isoladas de caprinos e de bovinos, com sintomas de paratuberculose, de explorações da ilha de S. Miguel, Açores.

Estirpes <i>Map</i>	Freguesia	Número de repetições em cada <i>loci</i>								Perfil INMV
		292	X3	25	47	3	7	10	32	
C2	S. Miguel *	3	2	3	3	2	5	2	8	INMV 16
C3	S. Miguel *	3	2	3	3	2	5	2	8	INMV 16
C4	S. Miguel *	3	2	3	3	2	5	2	8	INMV 16
C4A4	S. Miguel *	3	2	3	3	2	5	2	8	INMV 16
C7	S. Miguel *	3	2	3	3	2	5	2	8	INMV 16
C11	S. Miguel *	3	2	3	3	2	5	2	8	INMV 16
C13	S. Miguel *	3	2	3	3	2	5	2	8	INMV 16
C14	S. Miguel *	3	2	3	3	2	5	2	8	INMV 16
C15	S. Miguel *	3	2	3	3	2	5	2	8	INMV 16

C16	S. Miguel *	3	2	3	3	2	5	2	8	INMV 16
A1	Maia	3	2	3	3	2	2	1	8	INMV 3
A2	Capelas	3	3	3	3	2	2	2	8	INMV 74
A3	S. António	3	2	3	3	2	2	2	8	INMV 2
A4	S. António	3	2	3	3	2	2	2	8	INMV 2
A5	S. António	3	3	3	3	2	2	2	8	INMV 74
A6	S. António	3	2	3	3	2	2	2	8	INMV 2
A7	Arrifes	3	2	3	2	2	2	2	8	INMV 117
A8	Candelária	3	2	3	3	2	2	2	8	INMV 2
A9	Ponta Garça	3	3	3	3	2	2	2	8	INMV 74
A10	Capelas	3	3	3	3	2	2	2	8	INMV 74
A11	S. Brás	3	3	3	3	2	2	2	8	INMV 74
A12	S. Brás	3	2	3	3	2	2	1	8	INMV 3
A13	Lomba da Maia	3	2	3	3	2	2	1	8	INMV 3
A14	S. Brás	3	3	3	3	2	2	1	8	INMV 140
A15	S. António	3	2	3	3	2	2	2	8	INMV 2
A16	S. António	3	2	3	3	2	2	1	8	INMV 3
A18	Feteiras	3	2	3	3	2	2	1	8	INMV 3
A19	Lomba da Maia	3	3	3	3	2	2	1	8	INMV 140
A20	Capelas	3	2	3	3	2	2	1	8	INMV 3
A20.A	S. Miguel *	3	2	3	3	2	2	1	8	INMV 3
A21	Fajã de Cima	2	2	3	3	2	2	2	8	INMV 13
A22	Rabo de Peixe	4	2	3	2	2	2	2	8	INMV 141
A23	S. Brás	3	2	3	3	2	2	2	8	INMV 2
A25	Arrifes	3	2	3	3	2	2	2	8	INMV 2
A26	Mais	3	2	3	3	2	2	1	8	INMV 3
A27	Ponta Garça	3	2	3	3	2	2	1	8	INMV 3
A30	Ponta Garça	3	2	3	3	2	2	1	8	INMV 3
A31	Ponta Garça	3	2	3	3	2	2	1	8	INMV 3
A32	Arrifes	3	2	3	3	2	2	2	8	INMV 2
A33	Arrifes	3	3	3	3	2	2	2	8	INMV 74
A35	Arrifes	3	2	3	3	2	1	2	8	INMV 6
A36	Capelas	3	3	3	3	2	2	2	8	INMV 74
A38	Capelas	4	3	3	3	2	2	2	8	INMV 14
A39	Capelas	3	3	3	3	2	2	2	8	INMV 74
A41	Ponta Garça	3	2	3	3	2	2	1	8	INMV 3
A44	Arrifes	3	2	3	3	2	2	1	8	INMV 3
A46	Maia	3	2	3	3	2	2	1	8	INMV 3
A47	Conceição	3	2	3	3	2	2	2	8	INMV 2
A49	Maia	3	2	3	3	2	2	2	8	INMV 2
A51	Feteiras	3	2	3	3	2	2	2	8	INMV 2
A51.A	S. Miguel *	3	2	3	3	2	2	2	8	INMV 2
A53	Arrifes	3	2	3	3	2	2	2	8	INMV 2

A56	S. Brás	3	2	3	3	2	2	1	8	INMV	3
------------	---------	---	---	---	---	---	---	---	---	------	---

Legenda: * - freguesia desconhecida. A cinzento assinalam-se as estirpes *Map* que foram também tipificadas por SNP

Tabela 4 – Perfil SNP de estirpes *Map* de bovinos da ilha de S. Miguel, Açores, pertencentes ao tipo C, Sub-grupo filogenético A.

Estirpe	Base na posição SNP [61]													Perfil	
	3842359	50173	4111202	3879247	2939977	1932058	1327872	3844632	1966028	305277	4339946	2087274	1686154	SNP	MIRU-VNTR
A5	A	G	G	C	G	G	T	G	A	G	T	C	G	4	74
A7	A	G	G	C	G	G	T	G	A	G	T	C	G	4	117
A16	A	G	G	C	G	G	T	G	A	G	T	C	G	4	3
A22	A	G	G	C	G	G	G	G	A	G	T	C	G	11	141
A23	A	G	G	C	G	G	G	G	A	G	T	C	G	11	2
A25	A	G	G	C	G	G	T	G	A	G	T	C	G	4	2
A27	A	G	G	C	G	G	T	G	A	G	T	C	G	4	3
A31	A	G	G	C	G	G	T	G	A	G	T	C	G	4	3
A33	A	G	G	C	G	G	T	G	A	G	T	C	G	4	74
A38	A	G	G	C	G	G	T	G	A	G	T	C	G	4	14
A44	A	G	G	C	G	G	T	G	A	G	T	C	G	4	3
K10 *	A	G	G	C	G	G	G	G	A	G	T	C	A	10	2
ATTC 19698^T	A	G	G	C	G	G	G	G	G	G	T	C	A	10	2

Legenda: * - Estirpe de referência para o alinhamento e comparação de sequências

Tabela 5 - Sequência de *primers* e sondas IS900 e f57.

PCR		1º passo de amplificação (segundo Leão e colaboradores) [62]	2º passo de amplificação (segundo Sidoti e colaboradores [72])
IS900	Primer <i>Fwd</i>	TGA TCT GGA CAA TGA CGG TTA CGG A	CCGTAAGGCCGACCATT
	Primer <i>Rv</i>	GGC GTT GAG GTC GAT CGC CCA CGT GAC	ACCCGCTGCGAGAGCA
	Sonda	_____	TET-CATGGTTATTAACGACGACGCG CAGC-BHQ1
f57	Primer <i>Fwd</i>	GCA GCT CCA GAT CGT CAT TC	
	Primer <i>Rv</i>	GTC CAG TTC GCT GTC ATC GA	
	Sonda	FAM - AGC ACG CAG GCA TTC CAA GTC C - BHQ1	

Legenda: TET - *Tetrachlorofluorescein*; FAM - *6-carboxyfluorescein*; BHQ - *Black Hole Quenche*

Tabela 6 – Condições das reações de PCR em formato *nested* em tempo real IS900 e PCR em tempo real f57, segundo Leão e colaboradores [62].

	Passo	Temperatura (°C)	Tempo	
1º passo de amplificação (PCR convencional)	Pré-desnaturação	94°C	3min.	40 ciclos
	Desnaturação	94°C	45seg.	
	<i>Annealing</i>	55°C	30seg.	
	Extensão	72°C	1:30 min.	
	Extensão final	72°C	10 min.	
		12°C	∞	
2º passo de amplificação (PCR em tempo)	Pré-desnaturação	95°C	3min.	45 ciclos
	Desnaturação	95°C	10seg.	
	<i>Annealing+</i>	60°C	35seg.	
	Extensão			

Tabela 7 – Sequência dos *primers* usados na análise MIRU-VNTR e temperatura de *annealing* correspondente, de acordo com a base de dados MAC INMV.

Loci MIRU	T°	T° adaptada	Forward	Reverse
292	58°C		CTTGAGCAGCTCGTAAAGCGT	GCTGTATGAGGAAGTCTATTCATGG
X3	58°C	64°C	AACGAGAGGAAGAATAAGCCG	TTACGGAGCAGGAAGGCCAGCGGG
25	58°C		GTCAAGGGATCGGCGAGG	TGGACTTGAGCACGGTCAT
47	64°C		CGTTGCGATTTCTGCGTAGC	GGTGATGGTCGTGGTCATCC
3	60°C	64°C	CATATCTGGCATGGCTCCAG	ATCGTGTTGACCCCAAAGAAT
7	60°C		GACAACGAAACCTACCTCGTC	GTGAGCTGGCGGCCTAAC
10	60°C	64°C	GACGAGCAGCTGTCCGAG	GAGAGCGTGGCCATCGAG
32	55°C		CCACAGGGTTTTTGGTGAAG	GGAAATCCAACAGCAAGGAC

Tabela 8 – Correspondência entre o número de unidades repetidas em tandem (TR) em cada *locus* e a dimensão do produto amplificado (pb) (base de dados MAC INMV).

LOCUS	Unidade de repetição (pb)	Número de unidades TR											
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
TR 292	53	141	194	247	300	353	406	459	512	565	618	671	724
TR X3	53	90	143	196	249	302	355	408	461	514	567	620	673
TR 25	58	176	234	292	350	408	466	524	582	640	698	756	814
TR 47	35	112	147	182	217	252	287	322	357	392	427	462	497
TR 3	27	154	181	208	235	262	289	316	343	370	397	424	451
TR 7	22	159	181	203	225	247	269	291	313	335	357	379	401
TR 10	55	193	248	303	358	413	468	523	578	633	688	743	798
TR 32	18	154	172	190	208	226	244	262	280	298	316	334	352

Tabela 9 - Sequencia dos *primers* usados na identificação de SNPs, segundo Leão e colaboradores [61].

Primer	SNP	T° annealing	Forward	Reverse
MAP	3842359	63°C	CACCTGGCCAAGTACTACCA	GCGATGTCATGATGCTGCTG
Bison	50173	64°C	GGACGATTACTCGGTTCCAG	ACCCGTGTTCCGGCTACCT
SNP4	4111202	65°C	GTCAGAAACATCCCGCCTTC	GTATTGAGTGAGGCAAGCGG
SNP5	3879247	64°C	GTTGATCGACAGCGAGTGC	GTGGTGTCCGAGGTGAACTT
SNP6	2939977	64°C	TATCTCCAAGGACGCATTCC	CTGCCATGTCCGTCTTAAT
SNP7	1932058	64°C	GGCTTGAAACTCCAAGTCTG	CGTCGTACATCCTCGTGGT
SNP8	1327872	64°C	GCGCTTGTTGTACAGGTTGA	TACGACGAAGACCCCGACTA
SNP9	3844632	64°C	GATCGATGCGGAGCTCGT	TGACAGGAAGGTCCATAGCC
SNP10	1966028	65°C	GTCGAGGGCTTCCAGTT	GTCTGAGGCCAGCGACAC
SNP11	305277	64°C	CCATCCCAGTTCAACAAGT	ACTTGTCCGGGTTGTAGCTG
SNP12	4339946	64°C	AACCGCTCAAGGCGAAAG	TCCCTTATCTGCGAAGTGCT
SNP13	2087274	65°C	CAGACCGAGCACCTCCTG	CCGCGTTGAAGGATCTCAAG
SNP14	1686154	65°C	GAATCCCCGGAAGTGGTG	GCAGTCCAGATAACGGAACG