

Investigação de anticorpos anti-MAP em rebanho bovino leiteiro após teste de tuberculinização

Investigation of anti-MAP antibodies in dairy cattle after tuberculin test

JÚLIA ANDRADE SILVA

Discente do curso de Medicina Veterinária (UNIPAM)
E-mail: juliaandrade@unipam.edu.br

MARIANA ASSUNÇÃO DE SOUZA

Professora orientadora (UNIPAM)
E-mail: marianaa@unipam.edu.br

Resumo: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) é o agente etiológico da paratuberculose, ou doença de Johne, que afeta principalmente os ruminantes. Este estudo teve como objetivo investigar a ocorrência de anticorpos anti-MAP em um rebanho bovino leiteiro após um teste de tuberculinização. Foram coletadas 106 amostras (53 de sangue e 53 de leite) de 14 vacas em lactação, nos intervalos antes do teste de tuberculinização, 14, 30 e 70 dias após a aplicação de PPD bovino e aviário. Nenhuma amostra de leite foi reagente no teste ELISA para MAP. Duas amostras de soro sanguíneo de animais (A01 e A02) foram reagentes. No animal A01, a detecção de anticorpos anti-MAP ocorreu antes da tuberculinização e aos 14 e 30 dias após o exame, enquanto no animal A02, a única detecção ocorreu aos 14 dias. Conclui-se que o momento ideal para a coleta das amostras foi aos 14 dias após a aplicação da tuberculina.

Palavras-chave: ELISA; paratuberculose, rebanho leiteiro.

Abstract: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) is the etiological agent of paratuberculosis, or Johne's disease, which mainly affects ruminants. This study aimed to investigate the occurrence of anti-MAP antibodies in a dairy cattle herd after a tuberculin test. A total of 106 samples (53 blood and 53 milk) were collected from 14 lactating cows, at intervals before the tuberculin test, 14, 30, and 70 days after the application of bovine and avian PPD. No milk samples were reactive in the ELISA test for MAP. Two blood serum samples from animals (A01 and A02) were reactive. In animal A01, the detection of anti-MAP antibodies occurred before the tuberculin test and at 14 and 30 days after the test, while in animal A02, the only detection occurred at 14 days. It was concluded that the ideal time for sample collection was 14 days after the application of tuberculin.

Keywords: ELISA; paratuberculosis; dairy cattle herd.

1 INTRODUÇÃO

A paratuberculose ou doença de Johne é causada pela bactéria *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), um patógeno importante, especialmente, para rebanhos bovinos leiteiros (HARRIS; BARLETTA, 2001). O MAP pertence ao Complexo *Mycobacterium avium* (CMA), que faz parte do gênero *Mycobacterium*, em que também se

encontra o Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) que engloba sete subespécies, entre elas a *Mycobacterium bovis*, agente causadora da tuberculose bovina (FORRELLAD *et al.*, 2013).

Os prejuízos econômicos causados por essa infecção ocorrem, principalmente, em rebanhos leiteiros e estão relacionados à diminuição da produção de leite, no ganho de peso, baixa eficiência reprodutiva, abate prematuro e redução do valor da carcaça ao abate (HENDRICK *et al.*, 2005). Os sinais clínicos são comumente observados nos animais adultos, e a maior prevalência ocorre em animais de três a cinco anos de idade. Como o período de incubação é muito longo, variando de seis meses a quinze anos, as manifestações clínicas nos animais são observadas tardiamente (LARSEN; MERKAL; CUTLIP, 1975). Os sinais consistem principalmente em desidratação, caquexia e diarreia profusa, que ocorrem devido à má absorção dos nutrientes ocasionada por uma enterite granulomatosa (CLARKE, 1997).

A paratuberculose pode ser diagnosticada por exames diretos, por meio do isolamento microbiológico, baciloscopia, técnicas de PCR (Reação em cadeia da polimerase) e ainda pelos métodos indiretos, como o teste imunoalérgico (tuberculinização) ou exames sorológicos como o *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA). O diagnóstico alérgico-cutâneo baseia-se em uma resposta de hipersensibilidade tardia, mediada por linfócitos sensibilizados, desencadeada em indivíduos anteriormente expostos ao bacilo. O exame pode ser realizado com o antígeno PPD (*purified protein derivative*) Johnina (obtida de cultura de *M. paratuberculosis*) ou PPD aviária (obtida a partir do *Mycobacterium avium* subsp. *avium*) (MEGID *et al.*, 2016).

Mesmo se tratando de respostas imunes diferentes, o diagnóstico alérgico pode interferir nos níveis de anticorpos anti-MAP, elevando consideravelmente os títulos no ELISA devido a uma resposta imune humoral anamnésica (CASAL *et al.*, 2014), mediada predominantemente por IgG1 (WATERS *et al.*, 2011). De acordo com Bridges e Winden (2021), é improvável que a inoculação intradérmica de PPD bovina e aviária resulte em uma resposta humoral, no entanto isso não pode ser completamente descartado em animais sensibilizados.

Estabelecer o melhor momento para coleta da amostra biológica e que tipo de amostra é mais adequada para a detecção de anticorpos anti-MAP é de fundamental importância para a identificação dos animais infectados e controle da doença. Considerando que o desempenho diagnóstico dos testes sorológicos é suscetível à resposta anamnésica induzida por tuberculinização prévia em animais infectados com MAP (BRIDGES; WINDEN, 2021), objetivou-se com este estudo investigar a ocorrência de anticorpos anti-MAP em um rebanho bovino leiteiro após o teste de tuberculinização.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 CEUA

Obteve-se aprovação do Comitê de Ética na Utilização de Animais - CEUA do Centro Universitário de Patos de Minas - UNIPAM, protocolo n. 125/21.

2.2 LOCAL E ANIMAIS

O estudo foi realizado em um rebanho bovino leiteiro da região do Alto Paranaíba, estado de Minas Gerais, no município de Patos de Minas. Foram avaliadas 14 fêmeas bovinas, a partir dos dois anos de idade, raça mestiça, criadas em sistema semi-intensivo e em período de lactação.

2.3 TUBERCULINIZAÇÃO

O exame de tuberculinação (teste cervical comparativo) foi realizado por médico veterinário habilitado pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT). O exame foi realizado com PPD bovino, obtido de cultura de *M. bovis*, e aviário, obtido de cultura de *M. avium* subsp. *avium*. Foi inoculado 0,1mL por via intradérmica, no terço médio da tábua do pescoço, após a realização de cutimetria da região. Os resultados das diferenças ($\Delta B - \Delta A$) foram interpretados de acordo com o Regulamento Técnico do PNCEBT (BRASIL, 2006).

2.4 COLETA DAS AMOSTRAS

A coleta das amostras de sangue e leite foram realizadas antes da tuberculinação, aos 14, 30 e 70 dias após a aplicação da tuberculina. Para a coleta de sangue os animais foram contidos em bretes e, posteriormente, coletado aproximadamente 5 mL de sangue por meio de punção da veia coccígea, com tubo *vacutainer* sem anticoagulante, adaptador e agulha 25mm x 0,8mm, estéril. As amostras de leite foram colhidas durante a ordenha, para isso os animais foram contidos no brete de ordenha e posteriormente, coletado aproximadamente 5 mL de leite, colhidas dos 4 tetos mamários da fêmea, excluindo o primeiro jato, sendo dispensado diretamente em tubo coletor universal estéril. As amostras foram mantidas sob refrigeração em caixas de isopor com gelo e encaminhadas para o Laboratório de Doenças Infecciosas do Centro Universitário de Patos de Minas - UNIPAM, onde foram congeladas em temperatura de -20°C até a realização do exame.

2.5 ELISA MAP

Para a detecção de anticorpos anti-MAP nas amostras de leite foi utilizado o kit comercial de ELISA *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Antibody Test - IDEXX®. Os testes foram realizados no Laboratório de Doenças Infecciosas do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM), de acordo com as instruções do fabricante.

As amostras utilizadas como controles positivo e negativo foram diluídas em placa não impregnada na proporção 1:20 e pré-incubadas por 2 horas a temperatura de 22°C. Em seguida foram transferidos 100µL do conteúdo das cavidades à placa impregnada e a mesma incubada por 45 minutos. Posteriormente, o conteúdo líquido das cavidades foi removido e realizado 4 lavagens com solução de lavagem própria do kit. Em seguida adicionado 100µL do conjugado HRPO na proporção 1:100, e a placa novamente incubada por 30 minutos. Após isso, o conteúdo líquido foi removido e

procedido a lavagem por 3 vezes. Posteriormente, foi adicionado 100µL do substrato TMB e a placa incubada durante 10 minutos. A parada da reação ocorreu com a adição de 100µL de solução de interrupção. Os valores de densidade óptica (DO) das amostras e controles foram medidos em espectrofotômetro de placas a 450nm.

Para validação do exame foram utilizados os seguintes critérios: Controle Positivo (CP) $CPx \geq 0,350$ e $CPx / CN(DO\ 450) \geq 3,00$. O cálculo dos resultados foi determinado pela relação: $100 \times [(Amostra\ A(450) - CN(DO\ 450)) / (CPx - CN(DO\ 450))]$. Para interpretação dos resultados considerou-se os seguintes parâmetros: amostras com relação $A/P\% \leq 45\%$ Negativas; $45\% < A/P\% < 55\%$ Suspeitas e $A/P\% \geq 55\%$ Positivas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram avaliadas 14 vacas em período de lactação e coletadas um total de 106 amostras, 53 de sangue e 53 de leite. Das 53 amostras de soro sanguíneo, em duas foram detectados anticorpos anti-MAP. O rebanho não apresentava histórico de diarreia e nem sinais clínicos sugestivos da doença. Segundo Vilar (2016), a prevalência aparente reduzida é atribuída ao período de latência da doença, que é relativamente longo, de 2 a 10 anos, e os níveis de anticorpos anti-MAP são detectados apenas no final deste período.

De acordo com Yamasaki *et al.* (2013), há descrição da enfermidade em pelo menos 11 estados brasileiros e em diversas espécies de ruminantes como bovinos, búfalos, ovinos e caprinos. Em um estudo realizado por Souza *et al.* (2021), na cidade de Lagoa Formosa - MG, das 40 fazendas avaliadas, 8 (20%) apresentaram no mínimo um bovino com anticorpos anti-MAP e das 236 vacas examinadas, 14 foram reativas, resultando no soro prevalência de 20%. No Brasil, encontrou-se 65% de animais reagentes em rebanhos leiteiros de São Paulo e no Rio de Janeiro 18% de 1004 amostras foram positivas para MAP (FERREIRA; FONSECA; LILENBAUM, 2001).

A paratuberculose é uma doença de importância mundial, uma vez que causa prejuízos econômicos, principalmente nos rebanhos leiteiros, aumentando os custos sanitários devido à cronicidade da enfermidade (COSTA *et al.*, 2010). Com base em testes sorológicos, a soro prevalência mundial da doença estima-se estar entre 7% a 55%. Apesar de ser considerado necessário o controle para efeito de comércio internacional de animais e alimentos de origem animal, a Organização Mundial de Saúde Animal lista a paratuberculose como uma doença de notificação obrigatória, e no Brasil ainda não existe um programa oficial de controle da doença (MEGID *et al.*, 2016).

Os bovinos assintomáticos que testam positivo para MAP por meio do teste ELISA são considerados importantes fontes de infecção, pois eliminam o bacilo no ambiente, contaminando água e alimentos (FECTEAU, 2017). Caso o MAP seja incluído na lista de agentes transmitidos por alimentos, pode gerar grandes consequências econômicas para a indústria de alimentos, principalmente por não haver estudos sobre o potencial impacto econômico (KENNEDY; BENEDICTUS, 2001). Conforme descrito por Souza *et al.* (2021), é necessário informar aos responsáveis pela fazenda sobre as perdas econômicas que a doença pode ocasionar, o que serve como incentivo para a implementação de medidas de controle eficazes no rebanho.

As 53 amostras de leite analisadas não revelaram a presença de anticorpos anti-MAP em nenhuma delas. De acordo com o estudo realizado por Kennedy *et al.* (2014)

com 139 vacas, há concordância entre os resultados obtidos em amostras de sangue e leite, e que as amostras de leite apresentam um intervalo de tempo mais curto para retornar aos níveis normais de anticorpos, devido à eliminação elevada de IgG secretados para a glândula mamária durante o período de aumento da produção de leite.

O fato de todas as amostras de leite terem dado resultado negativo pode estar associado ao achado de Nielsen e Toft (2012), que mostrou que vacas com maior produção de leite durante o pico de lactação tendem a ter redução nos títulos de anticorpos anti-MAP no leite por efeito de diluição. O teste ELISA de anticorpos anti-MAP no leite é importante, pois, segundo Megid *et al.* (2016), embora o foco primário da infecção esteja geralmente na porção ileocecal do intestino, a bactéria pode ser transportada pelos macrófagos para a glândula mamária, sendo eliminada no leite. A principal via de infecção em bezerros é a via oro-fecal, que ocorre quando entram em contato com o úbere contaminado com fezes contendo a micobactéria (BEGG; WHITTINGTON, 2008), ou ainda por meio da transmissão pelo colostro de vacas infectadas. Conforme descrito no livro de Megid *et al.* (2016), é possível identificar, pelo teste ELISA, a produção de imunoglobulinas nos bezerros 134 dias após a infecção.

O leite destinado ao consumo humano e sua possível relação com a doença de Crohn no homem torna necessário a realização de testes para identificar a presença de anticorpos no leite. Conforme descrito por Santos (2011) a doença de Crohn é caracterizada por uma enfermidade sistêmica de processo inflamatório crônico, transmural e recidivante, provocando a formação de úlceras, espessamento da parede intestinal e formação de fístulas em várias partes do trato gastrointestinal humano. Embora a etiologia da doença de Crohn não esteja totalmente elucidada, estudos epidemiológicos indicaram alguns fatores, como predisposição genética e baixa resposta imunológica dos indivíduos.

Estudos para avaliar a incidência de MAP nos alimentos são necessários em razão dos possíveis efeitos nocivos à população. Em um estudo realizado por Whan *et al.* (2005) na Irlanda do Norte, foram avaliadas a presença de MAP em águas não tratadas coletadas em estações de tratamento durante um ano. Das 192 amostras coletadas, 8% apresentaram resultados positivos. O leite também pode ser uma forma de transmissão da doença em humanos. De acordo com Yamasaki *et al.* (2013), pesquisadores têm relatado a presença de MAP no leite cru e pasteurizado, e a micobactéria já foi detectada no sangue de pacientes com a doença de Crohn. Em relação à resistência do patógeno no leite, conforme descrito por Cunha e Ballus (2009), mesmo após pasteurizado, o leite cru que apresenta alto grau de contaminação pode conter a micobactéria, tornando-se uma importante fonte de transmissão da doença para os seres humanos.

Nas amostras de soro sanguíneo, dois animais foram reagentes, sendo detectados anticorpos anti-MAP em quatro amostras. Em A01, a detecção ocorreu antes da aplicação do PPD aviário, com 14 e 30 dias após o exame, enquanto no animal A02, o único momento de detecção foi aos 14 dias após o exame, conforme demonstrado na Tabela 1. Conforme descrito por Kennedy *et al.* (2014), em um estudo realizado com 139 vacas avaliadas antes e após o Teste Cervical Intradérmico, tanto em amostras coletadas de soro quanto de leite, foi registrada uma prevalência de 39% de resultados positivos, demonstrando que há uma maior prevalência de vacas soropositivas para MAP usando leite e soro em aproximadamente 14 dias após a inoculação de PPD aviário.

Tabela 1: Anticorpos anti-*Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*, detectados no sangue de bovinos leiteiros, em relação ao intervalo de coleta, Patos de Minas - MG, 2022

ID Animal	ANTES PPD	14 DIAS	30 DIAS	70 DIAS
A01	+	+	+	N.C.*
A02	-	+	-	-

* N.C.: não coletado.

Fonte: elaborado pelos autores de acordo com os resultados coletados.

Assim como no estudo de Bridges e Winden (2021), há um aumento contínuo na produção de anticorpos entre o dia 1 e o dia 14 após a inoculação de PPD aviário em vacas infectadas com MAP, que já estão sensibilizadas ao antígeno e têm células B de memória que permitem uma resposta humoral mais rápida. De acordo com Barden, Smith e Higgins (2020), há uma maior chance de os animais testarem positivo para paratuberculose de 0 a 30 dias após o teste bTB em comparação com 90 dias. Além disso, Kennedy *et al.* (2014) encontraram um aumento significativo nos anticorpos contra MAP após a administração de PPD. Os resultados do estudo atual demonstram que há um aumento contínuo nos anticorpos após a inoculação de PPD em bovinos infectados, com mais chances de testes positivos para paratuberculose ao longo do tempo - o aumento de anticorpos é perceptível após duas semanas, quando atinge seu pico.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, conclui-se que o diagnóstico por meio do teste ELISA com amostras de leite não foi a forma mais eficiente de detecção de anticorpos anti-MAP, enquanto que nas amostras de sangue foi possível detectar animais soropositivos, principalmente aos 14 dias após a aplicação da tuberculina.

REFERÊNCIAS

- BARDEN, M.; SMITH, R. F.; HIGGINS, H. M. The interpretation of serial Johne's disease milk antibody results is affected by test characteristics, pattern of test results and parallel bovine tuberculosis testing. **Preventive Veterinary Medicine**, [S. l.], v. 183, 105134, out. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105134>.
- BEGG, D. J.; WHITTINGTON, R. J. Experimental animal infection models for Johne's disease, an infectious enteropathy caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **The Veterinary Journal**, [S. l.], v. 176, n. 2, p. 129-145, maio 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.02.022>.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual técnico do programa nacional de controle e erradicação da brucelose e da tuberculose animal - PNCEBT**. Brasília: MAPA/SDA/DSA, 2006. 188 p.

BRIDGES, N.; WINDEN, S. The occurrence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* positive milk antibody ELISA results in dairy cattle under varying time periods after skin testing for bovine tuberculosis. **Animals**, [S. l.], v. 11, n. 5, 1224, abr. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ani11051224>.

CASAL, C. *et al.* Strategic use of serology for the diagnosis of bovine tuberculosis after intradermal skin testing. **Veterinary Microbiology**, [S. l.], v. 170, n. 3-4, p. 342-351, jun. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.02.036>.

CLARKE, C. J. The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. **Journal of Comparative Pathology**, [S. l.], v. 116, n. 3, p. 217-261, abr. 1997. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0021-9975\(97\)80001-1](https://doi.org/10.1016/s0021-9975(97)80001-1).

COSTA, J. C. M. *et al.* Levantamento sorológico de *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis* em bovinos leiteiros no estado do Espírito Santo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 62, n. 6, p. 1491-1494, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-09352010000600028>.

CUNHA, M. F.; BALLUS, C. A. *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis*: uma preocupação para a indústria de laticínios. **Revista Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, Juiz de Fora, v. 64, n. 366, p. 3-11, 2009. Disponível em: <https://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/view/69>.

FECTEAU, M. E. Paratuberculosis in cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, [S. l.], v. 34, n. 1, p. 209-222, mar. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cvfa.2017.10.011>.

FERREIRA, R. S; FONSECA, L.; LILENBAUM, W. 2001. Detecção de anticorpos contra *Mycobacterium paratuberculosis* em rebanhos bovinos do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 4, p. 166-171, jan. 2001.

FORRELLAD, M. A. *et al.* Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Virulence**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 3-66, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.4161/viru.22329>.

HARRIS, N. B.; BARLETTA, R. G. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in veterinary medicine. **Clinical Microbiology Reviews**, [S. l.], v. 14, n. 3, p. 489-512, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/CMR.14.3.489-512.2001>.

HENDRICK, S. H. *et al.* Effect of paratuberculosis on culling, milk production, and milk quality in dairy herds. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, [S.l.], v. 227, n. 8, p. 1302-1308, out. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.2460/javma.2005.227.1302>.

- KENNEDY, D. J.; BENEDICTUS, G. Control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in agricultural species. **Revue Scientifique et Technique Office International Épizooties**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 151-179, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.20506/rst.20.1.1274>.
- KENNEDY, A. E. *et al.* O teste comparativo cervical intradérmico único interfere no diagnóstico ELISA da doença de Johne. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 5, 564, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00564>.
- LARSEN, A. B.; MERKAL, R. S.; CUTLIP, R. C. Age of cattle as related to resistance to infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. **American Journal of Veterinary Research**, [S. l.], v. 36, n. 3, p. 255-257, 1975. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1115424/>
- MEGID, J. *et al.* **Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia**. 1. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016.
- NIELSEN, S. S.; TOFT, N. Effect of days in milk and milk yield on testing positive in milk antibody ELISA to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, [S. l.], v. 149, n. 1-2, p. 6-10, set. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.05.013>.
- SANTOS, S. C. **Doença de Crohn: uma abordagem geral**. 2011. 47 f. Monografia (Especialização em Análises Clínicas), Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011. Disponível em: <https://hdl.handle.net/1884/32917>.
- SOUZA, M. A. *et al.* *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and bovine leukemia virus seroprevalence and associated risk factors in dairy herds in Minas Gerais state, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 73, n. 2, p. 508-512, mar. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-11899>.
- VILAR, A. L. T. **Epidemiological characterization of bovine paratuberculosis in the State of Paraíba**. 2016. 97f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Patos - PB, 2016. Disponível em: <http://dspace.sti.ufcg.edu.br:8080/jspui/handle/riufcg/25491>.
- WHAN, L. *et al.* Occurrence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in untreated water in northern Ireland. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 71, n. 11, p. 7107-7112, nov. 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.71.11.7107-7112.2005>.

INVESTIGAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-MAP EM REBANHO
BOVINO LEITEIRO APÓS TESTE DE TUBERCULINIZAÇÃO

WATERS, W. R. *et al.* Development and evaluation of an enzyme linked immunosorbent assay for use in the detection of bovine tuberculosis in cattle. **Clinical and Vaccine Immunology**, [S. l.], v. 18, n. 11, p. 1882-1888, nov. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/CVI.05343-11>.

YAMASAKI, E. M. *et al.* Paratuberculose em ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 2, p. 127-140, fev. 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-736x2013000200001>.