



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial



(21) BR 102022010773-4 A2

(22) Data do Depósito: 01/06/2022

(43) Data da Publicação Nacional:
14/03/2023

(54) Título: COMPOSIÇÃO DE BIOMARCADOR, KIT E MÉTODO PARA DIAGNOSTICAR A DOENÇA DE JOHNE

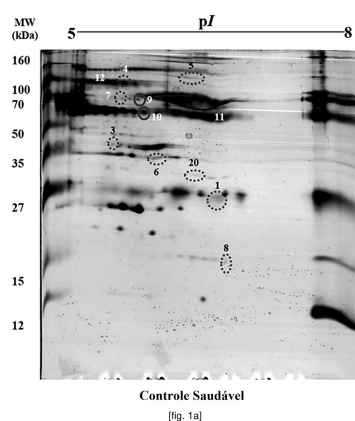
(51) Int. Cl.: G01N 33/68; C07K 14/81; G01N 33/569.

(30) Prioridade Unionista: 11/06/2021 KR 10 2021 00 75890.

(71) Depositante(es): SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION; INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY.

(72) Inventor(es): HAN-SAN YOO; MIN-KYOUNG SHIN; HYUN-EUI PARK; HONG-TAE PARK.

(57) Resumo: COMPOSIÇÃO DE BIOMARCADOR, KIT E MÉTODO PARA DIAGNOSTICAR A DOENÇA DE JOHNE. A presente invenção se refere a uma composição de biomarcador para diagnosticar a doença de Johne usando a medição de alfa-2-macroglobulina (A2M) e uso do mesmo. Já que o biomarcador da presente invenção pode prover sensibilidade melhorada a infecções subclínicas pela revelação de diferenças nas expressões de proteínas hospedeiras no soro de sujeitos infectados com MAP durante vários estágios de progressão de JD, o mesmo pode ser efetivamente usado para erradicar JD de uma população de sujeitos. Em particular, já que o biomarcador da presente invenção é detectado usando o método ELISA, é possível diagnosticar a doença de Johne mais eficientemente do que quando outros métodos, tal como espectrometria de massa, forem usados, e o mesmo pode ser diretamente aplicado no campo. Além do mais, é possível prover um efeito diagnóstico mais excelente do que os kits de ELISA existentes para diagnosticar a doença de Johne que estão comercialmente disponíveis.



RELATÓRIO DESCRITIVO

“COMPOSIÇÃO DE BIOMARCADOR, KIT E MÉTODO PARA DIAGNOSTICAR A DOENÇA DE JOHNE”

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDO RELACIONADO

[001] Este pedido reivindica a prioridade e o benefício do Pedido de Patente Coreano 10-2021-0075890, depositado em 11 de junho de 2021, cuja revelação é aqui incorporada pela referência em sua íntegra.

[002] Este pedido foi suportado pelo Ministério da Agricultura, Alimentos e Questões Rurais (Nº 918020044SB010(1545023103)).

CAMPO DA TÉCNICA

[003] A presente invenção se refere a uma composição de biomarcador para diagnosticar a doença de Johne usando a medição de alfa-2-macrogolubulina (A2M) e ao uso da mesma.

ANTECEDENTES DA TÉCNICA

[004] A doença de Johne (JD), que causa significativo dano econômico à atividade leiteira em todo o mundo, é uma enterite granulomatosa crônica em ruminantes causada por *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* (MAP). Os principais hospedeiros de MAP são ruminantes domésticos, incluindo gado, ovelha, cabras e cervos, e casos de infecção em não ruminantes também foram descobertos. Além do mais, já que foi verificada evidência de que MAP é associado com doenças autoimunes humanas, tais como doença de Crohn, esclerose múltipla, diabetes tipo 1 e artrite reumatoide, trata-se de uma importante doença a partir de uma perspectiva da saúde pública.

[005] As proeminentes características clínicas de JD são diarreia persistente, perda de peso progressiva, produção de leite diminuída e fraqueza depois de um longo período de incubação. Durante o progresso da doença, gado infectado excreta MAP através das fezes, que, por sua vez, contamina a água, a alimentação, o leite e o ambiente nas cercanias. Devido ao componente de ácido micólico incluído na parede celular das bactérias, MAP suporta condições ambientais severas, incluindo secura,

baixo pH e altas ou baixas temperaturas, e MAP pode sobreviver por mais do que um ano na pastagem e sobreviver por um período de tempo muito mais longo na água. A ingestão das substâncias contaminadas com MAP é uma rota de infecção principal. Portanto, a rápida detecção e seleção de eliminações fecais subclínicos em fazendas são exigidas para o controle de JD.

[006] O diagnóstico de JD é amplamente dividido em duas categorias. A presença de MAP em espécimes clínicos, tais como fezes, leite, colostro e tecido intestinal, pode ser confirmada por PCR e cultura bacteriana. A cultura bacteriana usando amostras fecais provenientes de animais infectados é o padrão para a diagnose de JD e é o único método para detecção direta de MAP vivo. Entretanto, a observação de colônias visíveis exige pelo menos 4 semanas depois da inoculação devido à lenta taxa de crescimento. Em particular, já que indivíduos infectados de forma subclínica mostram diferentes taxas de progresso da doença, a excreção das bactérias através das fezes pode ocorrer intermitentemente, resultando em resultados falsos-negativos para animais infectados. A detecção de genes específicos de MAP, tais como IS900, ISMap02 e f57, através de PCR é rápida, e é possível processar um número relativamente grande de amostras de uma vez. Contudo, a detecção com base em PCR tem diversas limitações. Primeiro, vários componentes inibitórios de PCR na amostra fecal podem interferir com a reação, resultando em resultados falsos-negativos. Segundo, a amplificação não específica de DNA derivado de hospedeiro e outras bactérias pode levar a resultados falsos-positivos. Terceiro, já que a maior parte dos animais infectados de forma subclínica usualmente excreta MAP intermitentemente, resultados falsos-negativos podem ser obtidos. O ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA) previamente desenvolvido para diagnose de MAP é um método que pode identificar anticorpos específicos de MAP em soro, e é possível processar um grande número de amostras de uma vez. Entretanto, já que a maior parte dos indivíduos infectados de forma subclínica não tem anticorpos específicos de MAP, resultados falsos-negativos podem ser obtidos. Além do mais, a coinfeção com outros patógenos, tais como *Mycobacterium bovis*, *Fasciola hepatica*

e micobactérias não tuberculosas, pode alterar a resposta imune e, desse modo, interferir com a precisa diagnose. Em outras palavras, as técnicas de diagnóstico que podem detectar animais infectados de forma subclínica são urgentemente necessárias para o controle e a erradicação de JD.

[007] Biomarcadores são indicadores mensuráveis de mudanças fisiológicas durante o progresso da doença. Em muitos estudos, a fim de identificar potenciais biomarcadores em animais infectados com MAP, esforços foram feitos para identificar candidatos a biomarcador pela análise da transcrição do hospedeiro em modelos infectados com MAP e descobrir diversos genes que são regulados para cima. Entretanto, a expressão de RNAm e a expressão de proteína destes genes nem sempre mostrou uma alta correlação, e havia uma limitação em que isto era realizado com um tamanho de amostra relativamente pequeno.

DOCUMENTOS DA TÉCNICA RELACIONADA

DOCUMENTOS NÃO PATENTE

[008] (Documento Não Patente 0001) Seo JH, Youn JH, Kim EA, Jun JS, Park JS, Yeom JS, et al. *Helicobacter pylori* antigens inducing early immune response in infants. *J Korean Med Sci.* (2017) 32:1139–46. doi: 10.3346/jkms.2017.32.7.1139

[009] (Documento Não Patente 0002) Seth M, Lamont EA, Janagama HK, Widdel A, Vulchanova L, Stabel JR, et al. Biomarker discovery in subclinical mycobacterial infections of cattle. *PLoS ONE.* (2009) 4:e5478. doi: 10.1371/journal.pone.0005478

REVELAÇÃO

PROBLEMA TÉCNICO

[010] Desta maneira, em decorrência da realização de diligentes esforços para prover um biomarcador de JD para diagnosticar gado exposto a MAP e infectado com MAP subclínico pela melhoria da sensibilidade de kits comerciais de ELISA e PCR fecal, que são métodos de diagnóstico existentes, os inventores da presente invenção completaram a presente invenção pela confirmação que a proteína do soro alfa-2-globulina (A2M) pode ser efetivamente utilizada para a diagnose de JD em animais infectados e, além do mais, particularmente em casos subclínicos.

[011] Portanto, é um objetivo da presente invenção prover uma composição de biomarcador para diagnosticar a doença de Johne usando a medição de alfa-2-macroglobulina (A2M) e o uso da mesma.

SOLUÇÃO TÉCNICA

[012] A presente invenção provê uma composição de biomarcador para diagnosticar a doença de Johne, incluindo um agente para medir um nível de proteína de alfa-2-macroglobulina (A2M) ou um nível de RNAm da mesma.

[013] De acordo com uma modalidade exemplar preferida da presente invenção, a doença de Johne ocorre em um ruminante.

[014] De acordo com uma modalidade exemplar preferida da presente invenção, o ruminante é gado, uma cabra, uma ovelha ou uma cabra-montesa.

[015] De acordo com uma modalidade exemplar preferida da presente invenção, o ruminante inclui ruminantes clínicos e ruminantes infectados subclínicos.

[016] De acordo com uma modalidade exemplar preferida da presente invenção, o agente para medir o nível de proteína é pelo menos um selecionado a partir do grupo que consiste em um anticorpo, uma proteína de interação, um ligante, nanopartículas e um aptâmero que se ligam especificamente à proteína ou a um fragmento de peptídeo.

[017] De acordo com uma modalidade exemplar preferida da presente invenção, o agente para medir o nível de RNAm é pelo menos um selecionado a partir do grupo que consiste em um par de iniciadores, uma sonda e um nucleotídeo antissentido que se ligam especificamente ao gene.

[018] Além do mais, a presente invenção provê um kit para diagnosticar a doença de Johne, incluindo a composição de biomarcador.

[019] De acordo com uma modalidade exemplar preferida da presente invenção, o kit é um kit de reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa (RT-PCR), um kit de chip de DNA, um kit de ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA), um kit de chip de proteína, um kit rápido ou um kit de monitoramento de reação múltipla (MRM).

[020] Além do mais, a presente invenção provê um método para diagnosticar a doença de Johne, incluindo:

i) medir um nível de proteína de alfa-2-macroglobulina (A2M) ou um nível de RNAm da mesma em uma amostra isolada a partir de um sujeito; e

ii) classificar como doença de Johne se o nível medido for mais alto do que um nível de controle normal.

[021] De acordo com uma modalidade exemplar preferida da presente invenção, a amostra é pelo menos uma selecionada a partir do grupo que consiste em sangue, plasma, soro, linfa, fluido cerebrospinal, fezes, tecido isolado, células isoladas e saliva.

EFEITOS VANTAJOSOS

[022] Já que o biomarcador da presente invenção pode prover sensibilidade melhorada a infecções subclínicas pela revelação de diferenças nas expressões de proteínas hospedeiras no soro de sujeitos infectados com MAP durante vários estágios de progressão de JD, o mesmo pode ser efetivamente usado para erradicar JD de uma população de sujeitos. Em particular, já que o biomarcador da presente invenção é detectado usando o método ELISA, é possível diagnosticar a doença de Johne mais eficientemente do que quando outros métodos, tal como espectrometria de massa, forem usados, e o mesmo pode ser diretamente aplicado no campo. Além do mais, é possível prover um efeito diagnóstico mais excelente do que os kits de ELISA existentes para diagnosticar a doença de Johne que estão comercialmente disponíveis.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[023] A figura 1 mostra resultados representativos de eletroforese bidimensional em gel de proteínas do soro bovino de acordo com os estágios de infecção de MAP em grupos de controle saudável, eliminação subclínica e eliminação clínica. As faixas de pI são indicadas no topo.

[024] A figura 2 mostra os níveis de expressão de biomarcadores (alfa-2-macroglobulina, alfa-1-beta-glicoproteína e transtirretina; (1) a (3)) em amostras de soro bovino de acordo com os estágios de infecção de MAP, e mostra os resultados

de detecção de amostras de soro bovino por kits comerciais de diagnóstico de ELISA (IDEXX ELISA e IDVet ELISA; (4), (5)). As amostras de soro bovino foram agrupadas nas seguintes cinco amostras de soro a partir de um total de 126 cabeças de gado: (a) um grupo de controle saudável (HC, n = 11): selecionado a partir de fazendas sem doença de Johne (JD), negativo para PCR fecal e negativo para ELISA por ambos os kits comerciais; (b) um grupo de exposição a MAP (E, n = 20): selecionado a partir de fazendas positivas para JD, negativas para PCR fecal e negativas para ELISA por ambos os kits comerciais; (c) um grupo de eliminação subclínica (SCS, n = 27): positivo para PCR fecal e negativo para ELISA por ambos os kits comerciais; (d) um grupo de eliminação não subclínica (SCNS, n = 50): negativo para PCR fecal e positivo para ELISA por pelo menos um kit comercial; e (e) um grupo de eliminação clínica (CS, n = 18): positivo para PCR fecal e positivo para ELISA por pelo menos um kit comercial (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001). Os valores de corte ideais para A2M, A1BG, TTR, IDEXX e IDVET ELISA são indicados por linhas vermelhas cheias em cada gráfico.

[025] A figura 3 mostra as curvas de característica de operação do receptor (ROC) de biomarcadores selecionados (A2M, alfa-2-macroglobulina; A1BG, alfa-1-beta glicoproteína; TTR, transtirretina) e dois ELISAs comerciais (IDEXX e IDVET). As áreas sob as curvas de ROC de A2M, A1BG, TTR, IDEXX e IDVET ELISAs foram 0,973, 0,641, 0,512, 0,796 e 0,828, respectivamente, e os valores de corte ideais foram 27,56, 11,93, 190,13, 8,92 e 4,37, respectivamente.

MODOS DA INVENÇÃO

[026] A seguir, a presente invenção será descrita com mais detalhes.

[027] O termo "eliminação" da presente invenção pode se referir a um indivíduo que excreta MAP nas fezes.

[028] O termo "ruminante clínico" da presente invenção pode se referir a um ruminante que exibe os principais sintomas da doença de Johne, e o termo "ruminante infectado subclínico" pode se referir a um ruminante que está infectado com as bactérias causadoras da doença de Johne, tal como MAP, mas não mostram nenhum

dos maiores sintomas da doença de Johne devido aos motivos do período de incubação, do estágio inicial da doença de Johne ou similares.

[029] O termo "diagnose" da presente invenção significa julgamento da real condição da doença de um indivíduo em um sentido amplo em todos os aspectos. Os conteúdos do julgamento são a nome da doença, etiologia, tipo da doença, severidade, modo detalhado da doença, a presença ou a ausência de complicações e similares. Na presente invenção, diagnose é, preferivelmente, para determinar o risco da doença de Johne e o início da mesma, que pode ser causada pela infecção com as bactérias causadoras da doença de Johne.

[030] Os inventores da presente invenção descobriram 12 biomarcadores de proteína para JD pelo uso de amostras de soro em diferentes estágios da infecção. Entre os biomarcadores descobertos, três proteínas (A2M, A1BG e TTR) foram selecionadas de acordo com sua significância biológica. A2M é uma grande glicoproteína envolvida na captura de uma ampla faixa de proteases para a defesa do hospedeiro. A2M tem um domínio de isca usável para uma variedade de proteases de patógenos e proteases armadilhas que usam estruturas como a nossa através de um processo de rearranjo estrutural por meio de ativação proteolítica. Proteases micobacterianas promovem a invasão de células hospedeiras, promovem o crescimento durante a infecção, e desempenham um importante papel em subsequente sobrevivência intracelular e progresso da doença. Além da inibição de proteases, A2M também ajusta a atividade biológica de citocinas e fatores de crescimento, tais como TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10, bFGF, β -NGF, PDGF e TGF- β . Nos estágios iniciais da infecção com MAP, citocinas pró-inflamatórias, tais como IFN- γ , IL-12, TNF- α e IL-6, foram significativamente aumentadas em animais infectados com MAP, se comparadas com um grupo de controle saudável que exibe uma resposta imune Th1 dominante. Inversamente, mudanças imunológicas ocorrem de Th1 para Th2, e o progresso da doença sugere a modulação da resposta imune de hospedeiro por patógenos. Portanto, a regulação para cima de A2M em animais infectados com MAP pode ser associada com a modulação de respostas imunes

durante o progresso da doença. A2M é principalmente sintetizada no fígado e a produção da mesma é afetada por várias citocinas, tais como TNF- α , IL-1 e IL-6. Neste particular, a regulação para cima de A2M pode ser induzida por citocinas proinflamatórias altamente abundantes em animais infectados com MAP. Na presente invenção, níveis de A2M foram significativamente mais altos em animais infectados com MAP, incluindo os casos tanto expostos quanto subclínicos. Portanto, A2M pode ser um promissor biomarcador para a diferenciação entre animais infectados com MAP e animais não infectados.

[031] A1BG é uma glicoproteína do plasma que pertence à família supergênica da imunoglobulina, incluindo um domínio similar à imunoglobulina. TTR é uma proteína do plasma tetramérica envolvida no transporte de hormônios da tireoide e retinol. A1BG foi significativamente aumentado apenas no grupo exposto, se comparado ao grupo de controle saudável. Além do mais, elevados níveis de TTR sérico foram detectados no grupo de eliminação não subclínica. Entretanto, A1BG e TTR não podem ser utilizados como biomarcadores para JD, em virtude de não ter havido mudança consistente entre gado não infectado e infectado. Isto é o contrário de um estudo prévio que sugeriu a regulação para cima de A1BG sérico no gado experimentalmente infectado com MAP em 12 meses (PI) depois da infecção, comparado com o gado infectado com *M. bovis* (Documento Não Patente 2). Além do mais, níveis de A1BG sérico foram regulados para cima em gado infectado com MAP em 3 meses PI e simultaneamente diminuídos em gado não infectado. Além do mais, gado experimentalmente infectado com MAP teve abundância de TTR sérico aumentada em 3 meses PI, se comparado com o gado não infectado, e níveis de TTR sérico foram consistentes até 10 meses, se comparados com o gado não infectado. A diferença nas expressões de A1BG e TTR da presente invenção pode ser explicada pela origem das amostras. Especificamente, na presente invenção, amostras de soro provenientes de gado naturalmente infectado que tinham pelo menos 1 ano de idade foram usadas, mas no [Documento Não Patente 2], já que bezerros neonatos que foram experimentalmente infectados em 6 semanas de idade foram usados, a

resposta imune foi diferente daquela do gado adulto.

[032] Na presente invenção, foi mostrado que A2M ELISA produziu valores AUC mais altos e sensibilidade mais alta do que dois kits comerciais de ELISA para a detecção de animais infectados de forma subclínica com MAP. De fato, A2M ELISA mostrou excelente desempenho de diagnóstico para a detecção de animais infectados com MAP, incluindo casos subclínicos. A2M ELISA detectou 85,18% de animais eliminação subclínicas, enquanto kits de IDEXX e IDVET ELISA detectaram 0%. Além do mais, A2M ELISA detectou 90% de casos não eliminação subclínicas, e os kits de IDEXX e IDVET ELISA detectaram 96% e 52%, respectivamente. Similarmente, A2M ELISA detectou 100% de animais clínicos eliminação, enquanto os kits de IDEXX e IDVET ELISA detectaram 94,44% e 88,88%, respectivamente. Em resumo, A2M ELISA melhorou a taxa de detecção de animais infectados com MAP, particularmente no grupo de eliminação subclínica.

[033] Animais expostos a MAP foram negativos tanto para PCR fecal quanto para kits comerciais de ELISA. Entretanto, todos os animais expostos foram cocriados com animais infectados com MAP, e alguns animais expostos foram positivo para PCR fecal em diferentes momentos, sugerindo uma alta probabilidade de infecção com MAP no grupo exposto. Níveis de A2M sérico nos grupos exposto a MAP e eliminação subclínica foram significativamente mais altos do que no grupo de controle saudável, mas não foram observados nos níveis de soro dos outros dois biomarcadores. Além do mais, níveis elevados de A2M sérico foram consistentes no grupo de eliminação subclínica, no grupo de eliminação não subclínica e no grupo de eliminação clínica. Portanto, níveis elevados de A2M sérico podem ser associados com a resposta imune de hospedeiro à infecção com MAP em um estágio inicial.

[034] A presente invenção provê valiosa informação em relação aos biomarcadores séricos de hospedeiro para JD em vários estágios de infecção. Além do mais, o estado de infecção detalhada de cada animal, tais como observações histológicas e resultados da análise de citocina e cultura bacteriana no tecido, provê informação mais confiável para análise estatística.

[035] Desta maneira, a presente invenção pode prover uma composição de biomarcador para diagnosticar a doença de Johne, incluindo um agente para medir um nível de proteína de alfa-2-macroglobulina (A2M) ou um nível de RNAm da mesma.

[036] De acordo com uma modalidade exemplar preferida da presente invenção, a doença de Johne pode ocorrer em um ruminante, e o ruminante pode ser gado, uma cabra, uma ovelha ou uma cabra-montesa. Preferivelmente, o ruminante pode ser gado.

[037] De acordo com uma modalidade exemplar preferida da presente invenção, o ruminante pode incluir ruminantes clínicos e ruminantes infectados subclínicos.

[038] De acordo com uma modalidade exemplar preferida da presente invenção, o agente para medir o nível de proteína pode ser pelo menos um selecionado a partir do grupo que consiste em um anticorpo, uma proteína de interação, um ligante, nanopartículas e um aptâmero que se ligam especificamente à proteína ou a um fragmento de peptídeo.

[039] O termo "anticorpo" se refere a uma substância que se liga especificamente a um antígeno e causa uma reação antígeno-anticorpo. Com os propósitos da presente invenção, um anticorpo se refere a um anticorpo que se liga especificamente ao biomarcador para diagnosticar a doença de Johne da presente invenção. Os anticorpos da presente invenção incluem todos de anticorpos policlonais, anticorpos monoclonais e anticorpos recombinantes. Os anticorpos podem ser facilmente preparados, isolados e purificados pelo uso de técnicas bem conhecidas na tecnologia. Além do mais, os anticorpos da presente invenção incluem fragmentos funcionais de moléculas do anticorpo, bem como formas completas com duas cadeias leves de comprimento completo e duas cadeias pesadas de comprimento completo. Fragmentos funcionais de moléculas do anticorpo se referem a fragmentos com pelo menos uma função de ligação a antígeno e, por exemplo, há Fab, F(ab'), F(ab')₂, Fv e similares. Além do mais, os anticorpos da presente invenção podem ser comercialmente obtidos.

[040] O termo "aptâmero" pode ser um ácido oligonucleico ou uma molécula de

peptídeo.

[041] De acordo com uma modalidade exemplar preferida da presente invenção, o agente para medir o nível de RNAm pode ser pelo menos um selecionado a partir do grupo que consiste em um par de iniciadores, uma sonda e um nucleotídeo antissentido que se ligam especificamente ao gene.

[042] O termo "iniciador" é uma sequência de ácido nucleico que tem um grupo 3' hidroxila livre curto, que pode formar um par de molde e base complementar, e se refere a uma sequência de ácido nucleico curta que serve como um ponto de partida para cópia de iniciadores de fita molde são capazes de iniciar a síntese de DNA na presença de reagentes para polimerização (*isto é*, DNA polimerase ou transcriptase reversa) e quatro diferentes trifosfatos de nucleosídeo em tampões e temperaturas apropriados. As condições de PCR e o comprimento dos iniciadores sentido e antissentido podem ser modificadas com base no que é conhecido na técnica.

[043] O termo "sonda" se refere a um fragmento de ácido nucleico, tais como RNA ou DNA, correspondente a diversas bases para curto a diversas centenas de bases para longo que são possíveis para alcançar ligação específica a um gene ou RNAm, e pode ser construída na forma de uma sonda de oligonucleotídeo, uma sonda de DNA de fita única, uma sonda de DNA de fita dupla, uma sonda de RNA ou similares, e pode ser rotulada para detecção mais fácil.

[044] O termo "antissentido" se refere a um oligômero que tem uma sequência de bases de nucleotídeo e uma parte principal entre subunidades, em que um oligômero antissentido é hibridizado com uma sequência alvo em RNA por pareamento de base Watson-Crick e, desse modo, tipicamente seguindo a formação de um RNAm e RNA: heteroduplex oligomérico em uma sequência alvo. Um oligômero pode ter complementaridade de sequência exata ou complementaridade aproximada de uma sequência alvo.

[045] Além do mais, a presente invenção pode prover um kit para diagnosticar a doença de Johne, incluindo a composição.

[046] Já que a doença de Johne é doença de Johne idêntica a um alvo pela

composição de biomarcador, a descrição da mesma será substituída pela descrição exposta.

[047] De acordo com uma modalidade exemplar preferida da presente invenção, o kit pode ser um kit de reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa (RT-PCR), um kit de chip de DNA, um kit de ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA), um kit de chip de proteína, um kit rápido ou um kit de monitoramento de reação múltipla (MRM) e, preferivelmente, o mesmo pode ser um kit de ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA).

[048] O kit da presente invenção pode consistir em um ou mais outros das composições de componente, das soluções ou dos dispositivos adequados para os métodos comumente usados de análise dos níveis de expressão. Por exemplo, um kit para medir um nível de expressão de proteína pode incluir um substrato, um tampão adequado, um anticorpo secundário rotulado com uma enzima cromogênica ou uma substância fluorescente, um substrato cromogênico e similares para a detecção imunológica de um anticorpo.

[049] O kit da presente invenção pode incluir um meio de extração de amostra para obter uma amostra a partir do sujeito a ser avaliado. O meio de extração de amostra pode incluir uma agulha, uma seringa ou similares. O kit pode incluir um contêiner de coleta de amostra para receber a amostra extraída, que pode ser um líquido, um gás ou um semissólido. O kit pode incluir adicionalmente instruções para uso. A amostra pode ser qualquer amostra de sujeito em que A2M pode estar presente ou ser secretado. Por exemplo, a amostra pode ser sangue, plasma, soro, linfa, fluido cerebrospinal, fezes, tecido isolado, células isoladas e saliva. A medição de A2M em uma amostra de sujeito pode ser realizada em amostras integrais ou amostras processadas.

[050] Além do mais, a presente invenção pode prover um método para diagnosticar a doença de Johne, incluindo:

i) medir um nível de proteína de alfa-2-macroglobulina (A2M) ou um nível de RNAm da mesma em uma amostra isolada a partir de um sujeito; e

ii) classificar como doença de Johne se o nível medido for mais alto do que um nível de controle normal.

[051] De acordo com uma modalidade exemplar preferida da presente invenção, a amostra pode ser pelo menos uma selecionada a partir do grupo que consiste em sangue, plasma, soro, linfa, fluido cerebrospinal, fezes, tecido isolado, células isoladas e saliva e, preferivelmente, a mesma pode ser soro.

[052] Já que a doença de Johne é doença de Johne idêntica a um alvo pela composição de biomarcador, a descrição da mesma será substituída pela descrição exposta.

[053] A seguir, a presente invenção será descrita com mais detalhes através dos exemplos. Estes exemplos são apenas para ilustrar a presente invenção, e é aparente aos versados na técnica que o escopo da presente invenção não deve ser interpretado como sendo limitado por estes exemplos.

EXEMPLO 1

SUJEITOS ANIMAIS

[054] Gado foi selecionado a partir de uma fazenda em Chungcheongnam-do e duas fazendas em Gangwon-do. Para a análise proteômica das proteínas do soro, 28 cabeças de gado foram selecionadas de acordo com os resultados da análise de qPCR fecal e dos níveis do anticorpo MAP sérico detectados por ELISA e classificadas em 3 grupos, como segue: (1) um grupo de controle saudável (n = 10) , selecionado em fazendas livres da doença de Johne (JD), negativo para PCR fecal e ELISA sérico; (2) um grupo de eliminação subclínica (n = 8), positivo para PCR fecal e negativo para ELISA; e (3) um grupo de eliminação clínica (n = 10), que exhibe típicos sinais clínicos de JD e positivo para PCR fecal e ELISA. De acordo com os resultados ELISA nas amostras de soro detectadas usando dois kits comerciais de diagnóstico de ELISA (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME, Estados Unidos; ID Screen Paratuberculosis Indirect, ID Vet, Montpellier, França) para a avaliação de candidatos a biomarcador, 126 cabeças de gado foram selecionadas, e MAP foi detectado em amostras de fezes por qPCR marcando IS900 e ISMap02. Especificamente, as 126

cabeças de gado foram divididas em 4 grupos, como segue: (1) um grupo de controle saudável (n = 11), selecionado a partir de fazendas sem JD, negativo para PCR fecal e negativo para ELISA por ambos os kits comerciais; (2) um grupo exposto a MAP (n = 20), selecionado a partir de fazendas positivas em JD, negativo para PCR fecal e negativo para ELISA por ambos os kits comerciais; (3) um grupo de eliminação subclínica (n = 27), positivo para PCR fecal e negativo para ELISA por ambos os kits comerciais; (4) um grupo de eliminação não subclínica (n = 50), negativo para PCR fecal e positivo para ELISA por pelo menos um kit comercial; e (5) um grupo de eliminação clínica (n = 18), mostrando típicos sinais clínicos de JD para um ou mais kits comerciais, positivo para PCR fecal e positivo para ELISA. Amostras de sangue foram coletadas pela venopunção da veia caudal usando Vacutainer Plus Plastic Serum Tubos (BD Biosciences, San Jose, CA, Estados Unidos). O soro foi isolado por centrifugação em 2.500 g por 10 minutos. O soro isolado foi transferido para um tubo de 1,5 mL e armazenado em -80°C até o uso. Os estudos em animal foram revisados e aprovados pelo Comitê de Ética Animal da Seoul National University (SNU-200525-4). [Tabela 1] a seguir mostra as características de 28 animais selecionados para perfilagem sérica. [Tabela 2] a seguir mostra as características de 126 animais selecionados para a avaliação de candidatos a biomarcador.

Tabela 1

		Controle saudável (n=10)	Eliminação subclínica (n=8)	Eliminação clínica (n=10)
Idade, número de anos, média ± SD		2,80 ± 1,31	3,50 ± 1,51	5,42 ± 1,61
Sexo, fêmea		10 (100)	8 (100)	10 (100)
separação de MAP		0 (0)	1 (12,5)	8 (80)

PCR fecal positivo		0 (0)	8 (100)	10 (100)
razão S/P de ELISA sérico, média $\pm$ SD	IDEXX	4,06 $\pm$ 1,85	7,31 $\pm$ 4,15	235,93 $\pm$ 27,67

Tabela 2

		Controle saudável (n=11)	Exposto (n=20)	Eliminação subclínica (n=28)	Não eliminação subclínica (n=50)	Eliminação clínica (n=18)
Idade, número de anos, média $\pm$ SD		5,69 $\pm$ 1,6	4,33 $\pm$ 1,6	3,83 $\pm$ 2,33	4,73 $\pm$ 1,43	5 $\pm$ 1,71
Sexo, fêmea		11 (100)	20 (100)	28 (100)	50 (100)	18 (100)
separação de MAP		0 (0)	0 (0)	1 (3,6)	0 (0)	14 (77,8)
PCR fecal positivo		0 (0)	0 (0)	28 (100)	0 (0)	18 (100)
razão S/P de ELISA sérico, média $\pm$ SD	IDEXX	3,73 $\pm$ 1,82	8,58 $\pm$ 11,74	5,84 $\pm$ 7,79	114,21 $\pm$ 54,14	207,67 $\pm$ 102,30
	IDVet	2,49 $\pm$ 1,24	8,01 $\pm$ 5,59	2,69 $\pm$ 2,16	90,25 $\pm$ 77,14	183,35 $\pm$ 60,99

[055] As razões amostra/positivo (S/P) médias de ELISA para o grupo de controle saudável, o grupo de eliminação subclínica e o grupo de eliminação clínica foram 4,16, 7,31 e 235,93, respectivamente. As idades médias do gado entre os grupos não diferiram significativamente. As razões S/P médias de IDEXX ELISA para o grupo de controle saudável, o grupo exposto a MAP, o grupo de eliminação subclínica, o grupo de eliminação não subclínica e o grupo de eliminação clínica foram 3,73, 8,58, 5,84, 114,14 e 207,67, respectivamente. Similarmente, as razões S/P médias de IDVET ELISA para estes grupos foram 2,49, 8,01, 2,69, 90,25 e 183,35, respectivamente.

EXEMPLO 2

IDENTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA

[056] Através da análise MALDITOF/MS, um total de 12 regiões importantes foram identificadas, e uma lista das proteínas significativas foi gerada.

[057] Amostras de soro agrupadas foram preparadas em três grupos para a análise de eletroforese bidimensional em gel (2-DE) para proteínas do soro. O Kit de Remoção Calbiochem ProteoExtract (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha) foi usado para remover albumina e IgG das amostras de soro agrupadas de acordo com as instruções do fabricante. O 2-DE e análise de imagem usando amostras 2-DE foram realizados da forma previamente descrita (Documento Não Patente 1). A proteína das amostras de soro foi lavada com 40 mmol/L de HCl (Tris-hidrocloreto, pH 7,2) e 1 mmol/L ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), e dissolvida em 9,5 mol/L de ureia, 4% CHAPS (3-((3-colamidopropil)dimetilamônio)-1-propanossulfonato) e 35 mmol/L de Tris-HCl (pH 7,2). Uma solução de reidratação incluindo 8 mol/L de ureia, 4% CHAPS, 10 mmol/L de ditioneitol (DTT) e 0,2% anfólitos carregadores (pH 3,0 a 10,0) foi misturada com a amostra de proteína solubilizada (30 µg) e aplicada em tiras com gradiente em pH imobilizado (IPG) (7 cm; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, Estados Unidos) em pH 3,0 a 10,0 em uma bandeja reexpandida (Bio-Rad). Focalização isoeletrica (IEF) foi realizada usando células IEF da proteína (Bio-Rad), e três etapas pré-ajustadas incluíram uma primeira etapa de condicionamento (15 minutos, 250 Vh), uma etapa de inclinação de voltagem linear (3 horas, 4.000 Vh) e

uma etapa de incremento linear da voltagem máxima (até 30.000 Vh). Depois de IEF, as tiras foram equilibradas em 0,375 mol/L de tampão Tris (pH 8,8) contendo 6 mol/L de ureia, 2% dodecil sulfato de sódio (SDS), 20% glicerol, 2% DTT e 0,01% azul de bromofenol. As tiras equilibradas foram reequilibradas com o mesmo tampão suplementado com 2,5% iodoacetamida. SDS-PAGE 2D foi realizada por um dia sem um gel de empilhamento em 20 mA por gel usando um gel de poliacrilamida removível 12,5% (8 a 10 cm).

[058] Pontos de proteína separados do gel foram visualizados por tingimento com prata e escaneados usando o Fluor-S Multimager (Bio-Rad). A intensidade do ponto de cada amostra foi analisada usando o Software PDQUEST 2D Gel Analysis versão 6 (Bio-Rad). Depois do tingimento com prata, pontos individuais foram excisados do gel 2-DE e transferidos para tubos de 1,5 mL. A seguir, 30 mmol/L de ferricianeto de potássio e 100 mmol/L de tiosulfato de sódio foram misturados (razão 1:1), e 100 µL da mistura foram adicionados na amostra e vortexada até a cor marrom desaparecer. Água destilada foi adicionada na amostra 3x para parar a reação. A seguir, 500 µL de 200 mmol/L de bicarbonato de amônio foram adicionados para cobrir o gel por 20 min. A solução foi descartada, e as peças de gel foram desidratadas com 100 µL de acetonitrila e, então, seca usando centrifugação a vácuo. Para digestão em gel, um tampão de digestão com 12,5 ng/mL de tripsina foi adicionado nas peças de gel que incluem os pontos de proteína e incubado no gelo por 45 minutos. A seguir, a solução da enzima foi removida e 20 µL de um tampão livre de enzima foram adicionados para manter a hidratação em 37°C durante a noite durante a reação enzimática. Posteriormente, as peças de gel foram vigorosamente vortexadas por 30 minutos. A solução digerida foi transferida para novos tubos de 1,5 mL e seca usando centrifugação a vácuo. Finalmente, as amostras foram dissolvidas em 2 µL de 0,1% ácido trifluoroacético (TFA).

[059] Para impressão em massa de peptídeos, uma solução matriz incluindo ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico (40 mg/mL) em acetonitrila 50% e TFA 0,1% foi preparada. Um volume igual da solução matriz foi adicionado à solução da amostra, e

2 µL foram transferidos para uma placa alvo por tempo de voo de dessorção/ionização a laser auxiliada por matriz (MALDI-TOF)/TOF, secos rapidamente e lavados com água deionizada. Após secar em temperatura ambiente por 10 minutos, a solução misturada foi submetida à análise MALDI-TOF-espectrometria de massa (MS) e MS/MS usando um espectrômetro de massa ABI 4800 Plus TOF-TOF (Aplicado Biosystems, Framingham, MA, Estados Unidos). O aparelho foi instalado para análise com uma operação a laser 200 Hz Nd:355 nm YAG. Picos com uma razão sinal/ruído de >25 foram selecionados, e os 10 íons mais fortes foram usados para análise MS/MS em modo 1 kV, e 1.000 a 1.250 exposições a laser consecutivas. A proteína de *Bos taurus* da base de dados da proteína do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (versão 20140415, 2.845 sequências, 921.323 resíduos) foi usada para todas as análises espectrais MALDI-TOF-MS com uma faixa de peso molecular de $\pm 15\%$. 2-DE permitiu uma precisão de massa de peptídeo de 50 ppm. O software da base de dados Protein Pilot V.3.0 (incluindo buscador de banco de dados MASCOT V.2.3.02) foi usado para analisar dados espectrais MS/MS em uma tolerância de massa de 50 ppm. Um limite estatisticamente significativo de $P = 0,05$ foi usado para detectar escores de íon peptídico individual.

Tabela 3

Número de ponto	Nome da proteína	ID(NCBI)	MW(Da)	pI	Valor esperado	Grupo aumentado
1	Complemento C3	A0A4W2D411	190190	8,36	3,20E-04	Eliminação subclínica
2	Transtirretina	A0A4W2BU20	15831	5,91	2,40E-04	Eliminação subclínica
3	Apolipoproteína a-IV	V6F7X3	42963	5,3	6,70E-24	Eliminações subclínicas e clínicas

4	Alfa-2-macroglobulina	R9QSM8	134613	5,75	1,40E-04	Eliminações subclínicas e clínicas
5	Região constante de cadeia pesada de IgM	2232299	48512	5,68	3,10E+02	Eliminações subclínicas e clínicas
6	Componente de complemento 3d	Q693V9	34593	6,68	1,10E-20	Eliminação clínica
7	Precursor de alfa-1B-glicoproteína	Q2KJF1	54091	5,29	2,40E-05	Eliminação clínica
8	Caliceína G	A0A1R3UGP4	28249	9,07	3,40E-02	Eliminações subclínicas e clínicas
9	Precursor de componente de complemento C9	A0A3Q1MU98	58618	5,66	1,10E-08	Eliminação clínica
10	Proteína não caracterizada	A0A3Q1M3L6	41077	5,16	7,90E-04	Eliminação clínica
11	Região constante de cadeia pesada	7547266	36510	6,09	2,70E-08	-

	hIgG1					
12	Cadeia pesada de inibidor de inter-alfa-tripsina	F1MMD7	101620	6,2 2	5,00E-0 3	-

[060] Em função disso, da maneira mostrada na [Tabela 3] anterior e [a figura 1], duas proteínas (complemento C3 e transtirretina (TTR)) foram abundantes apenas no grupo de eliminação subclínica, comparado com o grupo de controle saudável, e quatro proteínas (componente de complemento 3d, precursor de alfa-1B-glicoproteína (precursor A1BG), precursor do componente de complemento C9 e proteína não caracterizada) foram abundantes apenas no grupo de eliminação clínica. Além do mais, quatro proteínas (apolipoproteína A-IV, alfa-2-macroglobulina (A2M), região constante de cadeia pesada de IgM e calicreína G) foram abundantes tanto no grupo de eliminação subclínica quanto no grupo de eliminação clínica. A identificação da região constante de cadeia pesada hIgG1 ou albumina sérica bovina, sugerido a possibilidade de liberação incompleta de imunoglobina e albumina. A2M, A1BG e TTR foram selecionadas para avaliação adicional de desempenho de diagnóstico.

EXEMPLO 3

BIOMARCADORES PARA ELISA

[061] Com base nos resultados de ELISA sérico e PCR fecal, tentou-se determinar o nível sérico de cada candidato a biomarcador em diferentes grupos de infecção.

[062] Para a detecção quantitativa dos três biomarcadores selecionados (alfa-2-macroglobulina (A2M), alfa-1-beta glicoproteína (A1BG) e transtirretina (TTR)) no soro de cada animal, um kit comercialmente disponível de ELISA foi usado de acordo com as instruções do fabricante (MyBioSource, San Diego, CA, Estados Unidos). As faixas de detecção de A2M, TTR e A1BG foram 0,156 a 10 µg/mL, 312,5 a 5.000 ng/mL e 2,5 a 50 ng/mL, respectivamente. Os Cvs intra e interensaio do kit de ELISA foram <8% e <10%, respectivamente. Curvas padrão foram geradas para determinar a

concentração de cada biomarcador nas amostras de soro.

[063] Em função disso, da maneira mostrada na [figura 2], os níveis de A2M sérico foram maiores no grupo exposto a MAP (E, $p < 0,01$), o grupo de eliminação subclínica (SCS, $p < 0,0001$), o grupo de eliminação não subclínica (SCNS, $p < 0,0001$) e o grupo de eliminação clínica (CS, $p < 0,0001$) do que no grupo de controle saudável. Os níveis de A1BG sérico foram significativamente maiores no grupo exposto a MAP do que no grupo de controle saudável ($p < 0,05$), e significativamente inferiores no grupo de eliminação subclínica do que no grupo exposto a MAP ($p < 0,01$). Além disso, o grupo de eliminação subclínica mostrou maiores níveis de A1BG sérico do que o grupo de eliminação subclínica ($p < 0,01$). Os níveis de TTR sérico foram significativamente maiores no grupo de eliminação não subclínica do que no grupo de controle saudável ($p < 0,05$), mas não existe nenhuma diferença significativa entre os outros grupos de infecção.

EXEMPLO 4

UTILIDADE DIAGNÓSTICA DE BIOMARCADORES SELECIONADOS

[064] O desempenho de diagnóstico das proteínas biomarcadoras candidatas comparado com kits comerciais de ELISA foi apresentado por grupo (Tabela 4). Todos os sujeitos nos grupos 1, 2 e 3 correspondentes às eliminações clínicas foram positivo para ELISA A2M. Em particular, 25 dos 26 animais nos grupos 5 e 6, que tiveram eliminações não subclínicas e testaram positivo apenas por um dos kits comercialmente disponíveis, foram diagnosticados como positivo por A2M-ELISA. Acima de tudo, nenhum diagnóstico usando A2M-ELISA no grupo 7, que pertence à eliminação subclínica, e grupo 8, que pertence ao grupo exposto, 23 dos 27 animais e 18 dos 20 animais foram respectivamente diagnosticados como positivo (Tabela 3). A análise de curva de ROC sugeriu a possibilidade de discriminação entre diferentes grupos de infecção usando ELISA a base de biomarcador. A AUC e valores de corte ideais foram calculados (figura 3). Ao comparar tanto o grupo de controle saudável ($n = 11$) quanto os grupos de gado infectado ($n = 115$), ELISA A2M mostrou excelente capacidade de discriminação com $AUC = 0,973$ (intervalo de confiança de 95% [CI]:

0,946 a 1,000, $p < 0,0001$). A sensibilidade foi 90,4%, e a especificidade foi 100%. Inversamente, ELISA A1BG mostrou pouca capacidade de discriminação com AUC = 0,641 (CI de 95%: 0,543 a 0,739, $p = 0,0048$), uma sensibilidade de 50,4%, e uma especificidade de 100%. Similarmente, ELISA TTR mostrou pouca capacidade de discriminação com um valor de AUC de 0,512 (CI de 95%: 0,348 a 0,677, $p = 0,8840$), uma sensibilidade de 15,7% e uma especificidade de 100%. O kit comercial de ELISA IDEXX mostrou capacidade de discriminação razoável, com um valor de AUC de 0,796 (CI de 95%: 0,720 a 0,872, $p < 0,0001$), uma sensibilidade de 67,83% e uma especificidade de 100%. Além do mais, o kit comercial de ELISA IDVET mostrou excelente capacidade de identificação com um valor de AUC de 0,828 (CI de 95%: 0,753 a 0,904, $p < 0,0001$), uma sensibilidade de 73,04%, e uma especificidade de 100%. Quando as curvas de ROC obtidas usando os três biomarcadores foram comparadas com as curvas de ROC obtidas usando os dois kits comerciais, A2M mostrou excelente desempenho de diagnóstico (figura 3).

Tabela 4

	Grupo			A2M		A1BG		TTR		ELISA IDEXX		ELISA IDVET	
	PCR	ELISA IDEXX	ELISA IDVET	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N
1	P	P	P	15	0	7	8	1	14	15	0	15	0
2	P	P	N	2	0	1	1	0	2	2	0	0	2
3	P	N	P	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0
4	N	P	P	21	3	17	7	1	23	24	0	24	0
5	N	P	N	23	1	13	11	3	21	24	0	0	24
6	N	N	P	2	0	1	1	2	0	0	2	2	0
7	P	N	N	23	4	2	25	8	19	0	27	0	27
8	N	N	N	18	2	16	4	2	18	0	20	0	20
9	N	N	N	0	11	0	11	0	11	0	11	0	11

ANÁLISE ESTATÍSTICA

[065] A ANOVA com teste post hoc de Tukey entre diferentes grupos de infecção foi realizada usando software GraphPad Prism versão 7.00 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, Estados Unidos). Os valores P menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. A análise de curva de característica de operação do receptor (ROC) foi realizada para determinar a área abaixo da curva (AUC) e os valores de corte ideais para cada biomarcador candidato. A análise de curva de ROC foi realizada usando MedCalc software versão 19.4 (Software MedCalc, Ostend, Bélgica). Os valores de corte ideais foram determinados como valores que representam o índice máximo de Youden ($J = Se + Sp - 1$). A capacidade para discriminar entre os diferentes grupos de infecção e o grupo de controle saudável foi determinada com os significados a seguir. Especificamente, biomarcadores com valores de AUC de 0,9 ou mais foram considerados como tendo a capacidade de discriminação mais excelente. Valores de AUC $\geq 0,8$ e $< 0,9$ foram considerados como tendo excelente capacidade de discriminação. Valores de AUC $\geq 0,7$ e $< 0,8$ foram considerados como tendo capacidade de discriminação razoável. Valores de AUC $< 0,7$ foram considerados de baixa capacidade de discriminação.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição de biomarcador para diagnosticar a doença de Johne, **caracterizada por** compreender um agente para medir um nível de proteína de alfa-2-macroglobulina (A2M) ou um nível de RNAm da mesma.

2. Composição de biomarcador de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** a doença de Johne ocorrer em um ruminante.

3. Composição de biomarcador de acordo com a reivindicação 2, **caracterizada por** o ruminante ser gado, uma cabra, uma ovelha ou uma cabra-montesa.

4. Composição de biomarcador de acordo com a reivindicação 2, **caracterizada por** o ruminante incluir ruminantes clínicos e ruminantes infectados subclínicos.

5. Composição de biomarcador de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** o agente para medir o nível de proteína ser pelo menos um selecionado a partir do grupo que consiste de um anticorpo, uma proteína de interação, um ligante, nanopartículas e um aptâmero que se ligam especificamente à proteína ou a um fragmento de peptídeo.

6. Composição de biomarcador de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** o agente para medir o nível de RNAm ser pelo menos um selecionado a partir do grupo que consiste de um par de iniciadores, uma sonda e um nucleotídeo antissentido que se ligam especificamente ao gene.

7. Kit para diagnosticar a doença de Johne, **caracterizado por** compreender a composição de biomarcador como definida na reivindicação 1.

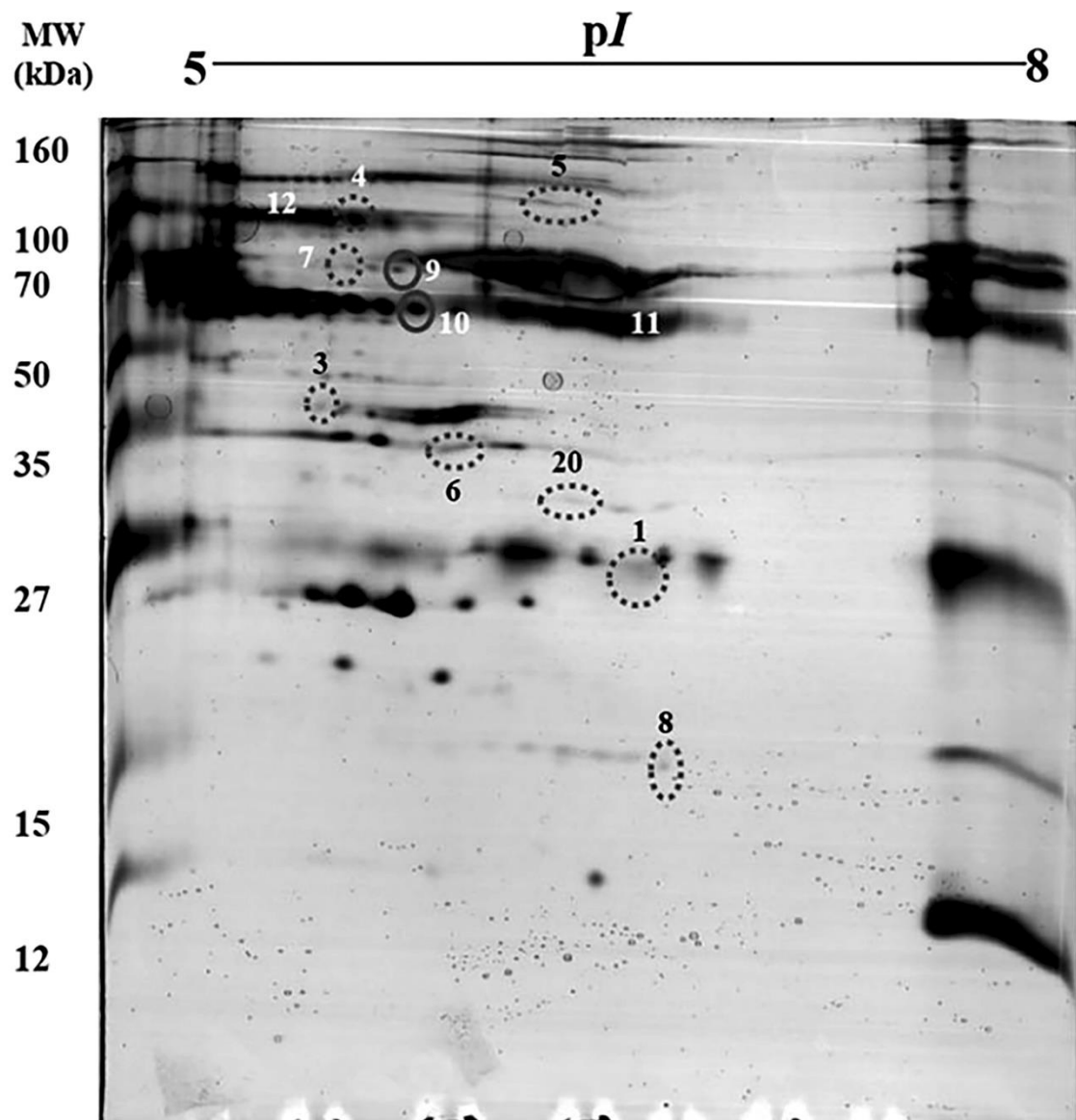
8. Kit de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado por** o kit ser um kit de reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa (RT-PCR), um kit de chip de DNA, um kit de ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA), um kit de chip de proteína, um kit rápido ou um kit de monitoramento de reação múltipla (MRM).

9. Método para diagnosticar a doença de Johne, **caracterizado por** compreender:

i) medir um nível de proteína de alfa-2-macroglobulina (A2M) ou um nível de RNAm da mesma em uma amostra isolada a partir de um sujeito; e

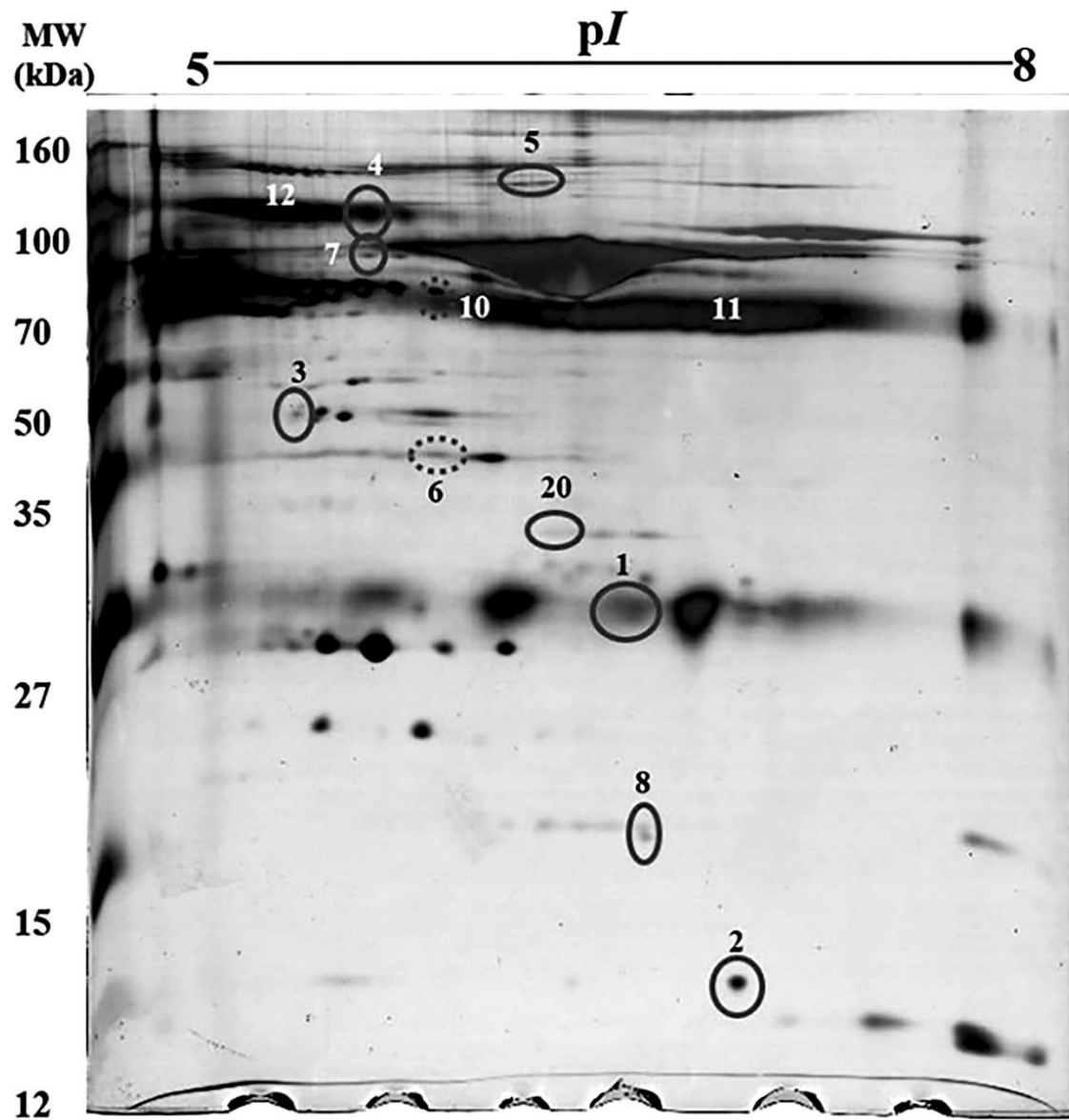
ii) classificar como doença de Johne se o nível medido for mais alto do que um nível de controle normal.

10. Método de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado por** a amostra ser pelo menos um selecionado a partir do grupo que consiste em sangue, plasma, soro, linfa, fluido cerebrospinal, fezes, tecido isolado, células isoladas e saliva.



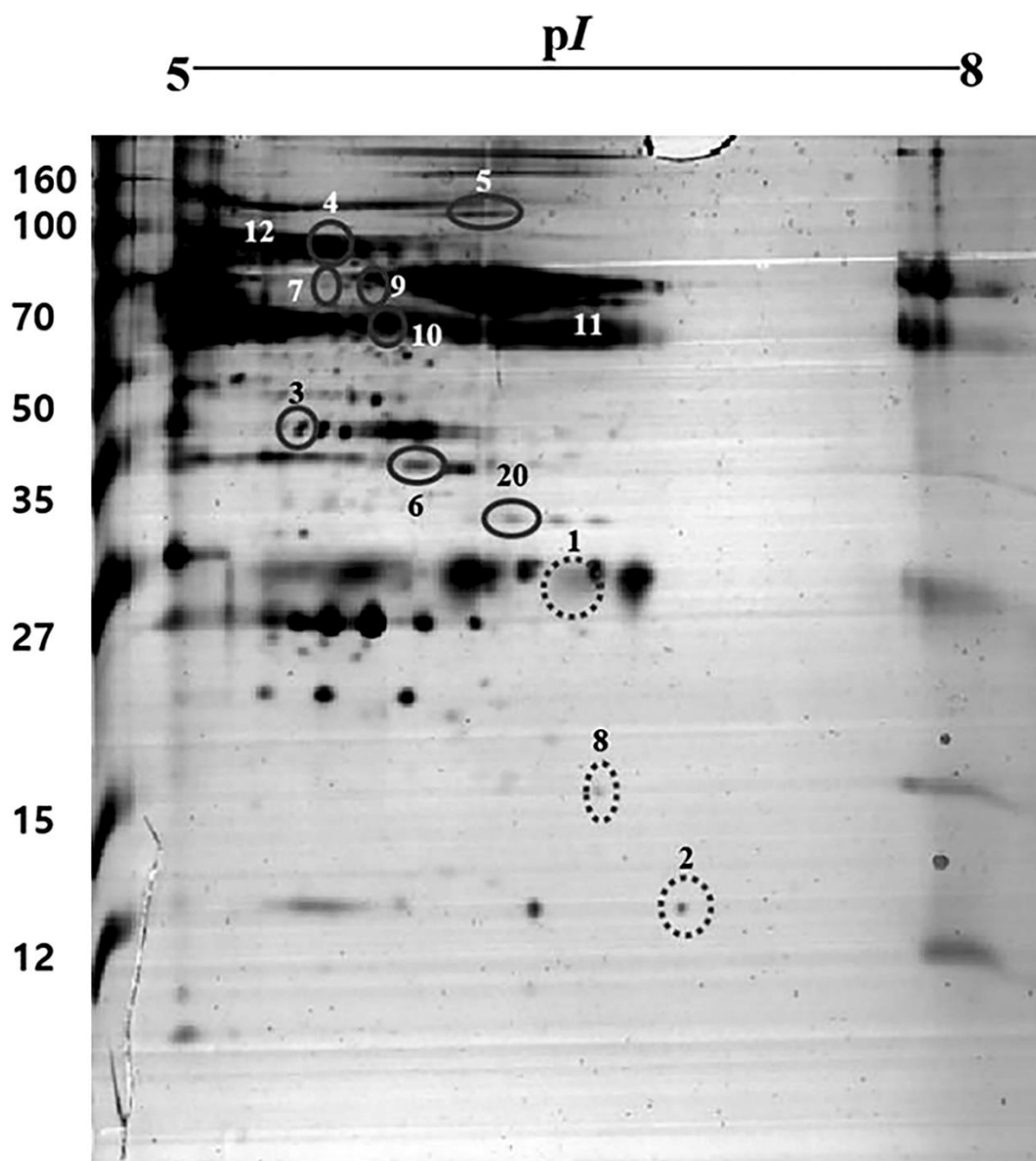
Controle Saudável

[fig. 1a]



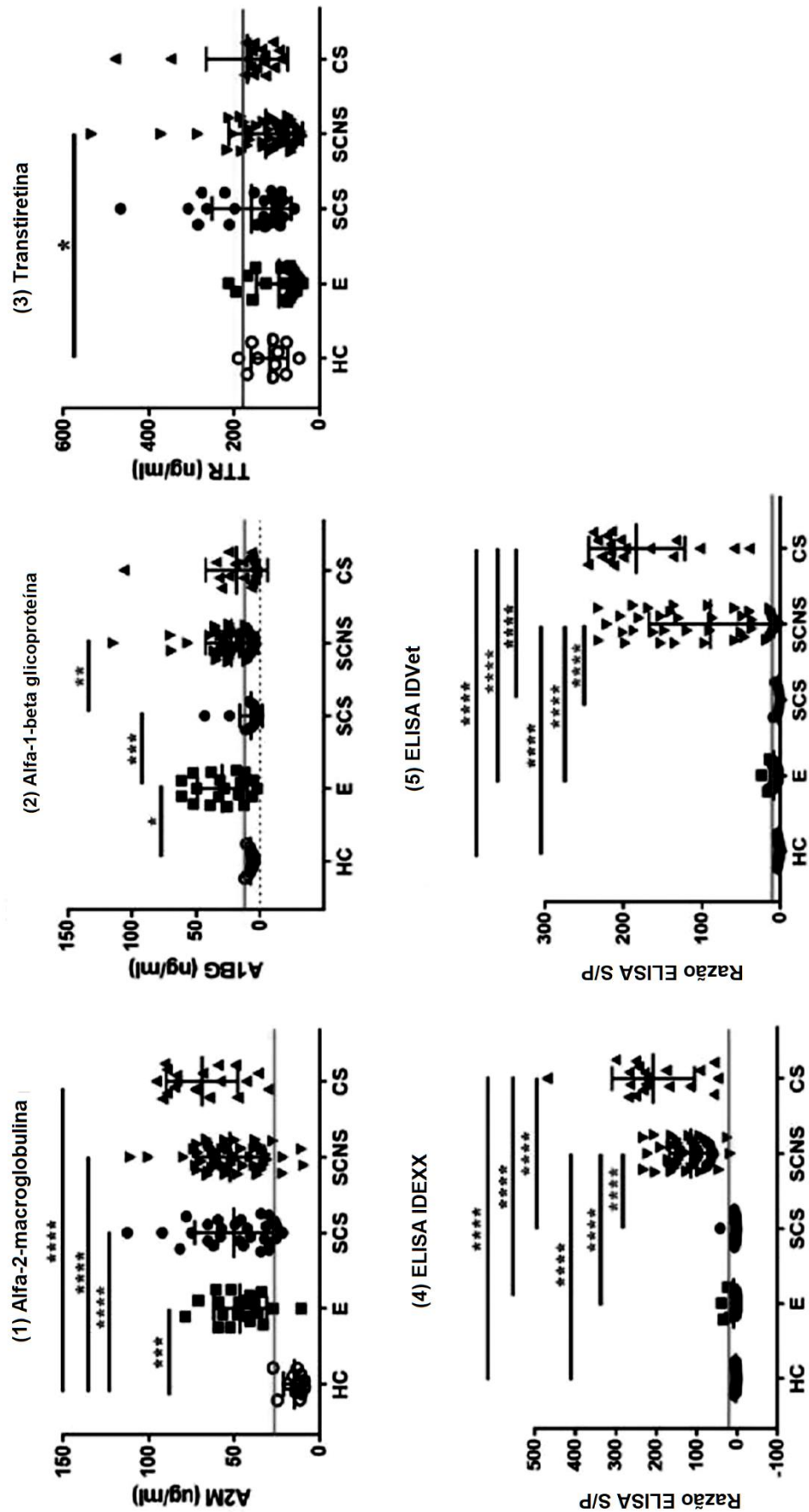
Eliminação subclínica

[fig. 1b]

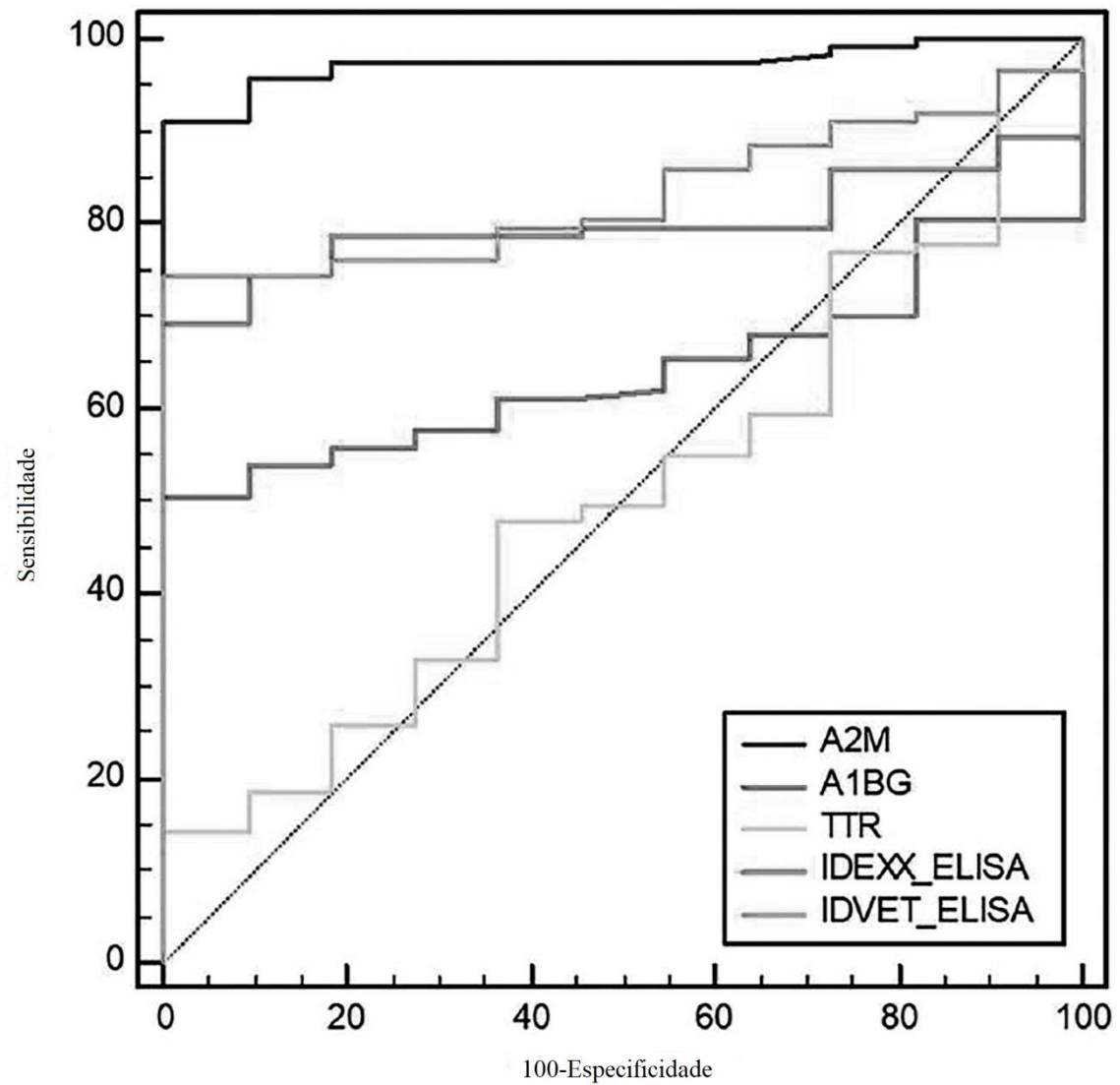


Eliminação clínica

[fig. 1c]



[fig. 2]



[fig. 3]

RESUMO

“COMPOSIÇÃO DE BIOMARCADOR, KIT E MÉTODO PARA DIAGNOSTICAR A DOENÇA DE JOHNE”

A presente invenção se refere a uma composição de biomarcador para diagnosticar a doença de Johne usando a medição de alfa-2-macrogolublina (A2M) e uso do mesmo. Já que o biomarcador da presente invenção pode prover sensibilidade melhorada a infecções subclínicas pela revelação de diferenças nas expressões de proteínas hospedeiras no soro de sujeitos infectados com MAP durante vários estágios de progressão de JD, o mesmo pode ser efetivamente usado para erradicar JD de uma população de sujeitos. Em particular, já que o biomarcador da presente invenção é detectado usando o método ELISA, é possível diagnosticar a doença de Johne mais eficientemente do que quando outros métodos, tal como espectrometria de massa, forem usados, e o mesmo pode ser diretamente aplicado no campo. Além do mais, é possível prover um efeito diagnóstico mais excelente do que os kits de ELISA existentes para diagnosticar a doença de Johne que estão comercialmente disponíveis.