



副结核分枝杆菌感染的免疫应答与检测方法研究进展

张振^{1,2}, 常维山¹, 丁家波^{2*}

¹ 山东农业大学动物科技学院, 山东 泰安 270018

² 中国兽医药品监察所, 北京 100081

摘要: 副结核分枝杆菌常引起感染牛的产奶量下降、持续性消瘦、顽固性下痢甚至死亡, 给畜牧业带来了巨大的经济损失。牛通常在幼年期经口感染该菌并具有一个较长的亚临床期, 后期才表现出临床症状, 感染前期以细胞免疫为主并伴随着间歇排菌, 经过一个2到5年的亚临床期后体液免疫应答增强, 同时排菌量明显增加。目前对牛副结核病常用的检测方法有病原学检测方法, 基于细胞免疫反应和基于体液免疫反应的检测方法。由于不同方法的反应原理不同, 加之副结核分枝杆菌感染动物的特定免疫应答规律, 在某一时间内各方法之间敏感性差异较大。本文简要阐述了牛副结核分枝杆菌的传播途径以及牛感染后的免疫应答特点, 对牛副结核病的常见诊断方法进行了综述。

关键词: 副结核分枝杆菌, 牛副结核病, 免疫应答, 检测方法

牛副结核病是由副结核分枝杆菌(*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, MAP)感染牛导致以慢性肠炎为典型病症的重要传染病。副结核分枝杆菌是1种胞内寄生菌, 感染该菌的机体存在细胞免疫和体液免疫分离的现象, 在感染后的不同阶段, 机体表现出不同的病理生理状态和免疫状态, 针对不同的感染阶段, 需要结合基于不同检测原理的检测方法才有可能提高检出率。本文旨在通过对副结核病诊断相关文献的研究报道汇总, 研究机体感染副结核分枝杆菌后的免疫应答规律, 同时根据机体感染该病后不同时期的免疫学变

化规律, 结合本实验室在副结核诊断方面的工作情况, 提炼出不同副结核检测方法在副结核感染不同时期的适用阶段, 为副结核的诊断提供参考。

1 机体感染副结核后免疫应答规律

MAP具有很强的环境抵抗力, 能够长期存在于被污染的土壤与水源中。病原经消化道感染是其主要传播途径^[1], 新生牛往往在采食的过程中感染该菌^[2], 在感染该菌后会有较长时间的亚临床期, 在2岁之前一般为隐性感染, 并不表现临床症状, 后期表现的症状通常为体重急剧下降以及

基金项目: 国家重点研发计划(2016 YFD0500902); 国家“863计划”(2012AA101302)

*通信作者。Tel/Fax: +86-10-62103674; E-mail: dingjiabo@126.com

收稿日期: 2016-01-04; 修回日期: 2016-04-25; 网络出版日期: 2016-05-09

严重腹泻^[3], 部分患病牛出现腹泻症状几周后, 因为蛋白质流失过度以及机体代谢紊乱等原因会在下颈部出现水肿, 一般会在数周内死亡。

机体感染MAP后最初是引起细胞免疫应答, 体液免疫随后产生, 且二者发生时间呈分离现象, 细胞免疫随病情的康复而增强; 反之, 体液免疫随病情的加重而增强^[4]。在感染初期Th1型细胞介导的免疫应答首先发挥作用, 在此阶段动物机体会出现少量排菌现象, 可采用细菌分离培养手段进行检测; 而在2到5年的长期亚临床阶段, 细胞免疫应答与体液免疫应答均不明显, 同时动物机体排菌量下降, 对于此阶段无理想的检测方法; 在感染后期体液免疫发挥主要作用, 此时机体的抗体水平与排菌量均显著增高^[5]。人工感染试验表明, 初次感染MAP后第10-14月后动物排菌量逐渐下降, 再次感染该菌10个月后出现血清抗体水平升高与排菌量增多现象^[6]。根据感染量的不同, 被感染动物从开始排菌以及抗体转阳时间具有很大差异, 自然感染MAP的动物中有95%-98%在2.2岁龄至11.7岁龄出现血清抗体转阳, 因此年龄可以作为判断MAP感染阶段的指标, 通常很难检测到育成牛的排菌情况以及血清抗体, 处于2岁龄以后的牛很可能出现排菌、血清抗体转阳以及典型临床症状^[7]。进一步研究机体感染副结核后不同时期表现出的不同的病理生理状态和免疫状态, 同时结合年龄这一指标, 有助于提高副结核病临床检出率。

2 副结核病检测方法

2.1 病原检测

2.1.1 细菌学检测: 细菌学检测分为细菌镜检和细菌分离培养2种方法, 当其中1种为阳性时, 即可判断为阳性个体。应用于细菌学检测的样品主要为采集的牛粪便与病死牛解剖具有明显病变的肠段以及淋巴结。

副结核分枝杆菌属于革兰氏阳性菌, 细胞壁中含有大量的糖脂, 普通的染色方法很难使其着色^[8]。通常采用萋尔-尼尔逊抗酸染色法进行染色, 抗酸杆菌呈特征性的红色, 而其它细菌和细胞呈蓝色。MAP在显微镜下呈红色球杆状, 成丛成团存在, 背景为蓝色, 应用细菌镜检要求待检样品中含有一定的带菌量同时要求检测人员具有丰富的经验。

MAP细菌分离培养具有很高的特异性, 被作为诊断副结核病的参考标准^[9]。由于牛感染该病后的不同时期排菌情况不同, 因此该方法针对不同的感染阶段敏感性不同, 在感染后期, 患病动物排菌量明显增加, 使用细菌分离培养能有效检测出此阶段的感染个体。根据相关研究报道, 依据牛感染副结核后机体状态的不同, 细菌分离培养方法的敏感性从39.0%至92.0%不等^[10], 因此应用该方法不能有效的检测出不同感染时期的个体。另外MAP分离培养极为困难, 在添加了草分枝杆菌素的副结核培养基中培养16周方可见菌落^[11]。这种方法检测成本较高、周期过长, 往往会错过最佳淘汰时间, 带来极大传播风险, 严重危害健康牲畜, 且该方法操作步骤复杂繁琐, 对检测人员的专业技能也有很高的要求。本实验室在样品(如粪便、肠内容物等)处理过程中发现, 过高浓度的草酸处理会杀死副结核分枝杆菌, 过低浓度的草酸处理会导致部分芽孢杆菌无法杀死而致使培养基污染; 另外待处理的样品来源、样品体积与草酸处理的时间都需要有一定的经验。除了上述从粪便、肠段以及淋巴结中分离MAP外, 还有研究人员从血液、淋巴液以及肠道内容物中分离MAP^[12], 这些方法同样存在着上述缺点。

2.1.2 分子生物学检测: 1987 McFadden等首次发现了副结核特异性插入片段IS900^[13], 现在, 针对MAP特异性片段IS900的PCR检测方法已经被作为确诊副结核的检测技术^[14]。PCR方法存在着敏感

性高的特点,通过对畜群淋巴液的检测发现,应用PCR方法检测有27.1%的样品为副结核阳性,而阳性样本通过细菌分离培养、ELISA等方法其阳性检出率仅为31%^[12]。相对于其他方法,PCR能节约检测成本与检测时间。本实验室根据副结核特异性插入片段IS900序列,设计了1对特异性引物用于建立副结核PCR诊断方法,使用该方法对临床采集的51份粪便样品进行检测,结果有12份为副结核阳性,而使用商品化的副结核ELISA试剂盒对相应血清进行检测,仅有5份在血清学诊断上显示为阳性。该结果表明相比血清学检测,PCR方法具有更高的敏感性,可以检测出少量排菌的阳性牛个体。

应用PCR的方法,不仅能检测粪便和组织中的带菌情况,同时也可以从奶样、血样以及淋巴液中进行病原检测。有文献报道PCR方法检测的特异性约为97%,其敏感性约为60.0%^[15]。但是PCR方法自身存在着假阳性的缺点,同时根据使用引物的不同以及检测人员的操作技术水平不同,往往会导致检测结果不同^[16]。有报道称基于IS900建立的PCR方法通过部分环境微生物基因组也能扩增出与预期MAP大小相同的片段,对PCR产物进行酶切鉴定可以有效的降低假阳率。除IS900外,被鉴定出的副结核特异性序列ISMav2、F57与ISMap02也可应用于副结核的PCR检测^[17]。Sevilla通过将IS1311片段进行酶切反应,能有效地将MAP、禽结核分枝杆菌与结核分枝杆菌进行鉴别诊断,同时能够对MAP进行分型^[18]。近年来,荧光定量PCR已经被广泛应用于副结核的鉴别诊断,该方法具有快速、灵敏度高的特点,应用此方法能够从血液、牛奶、粪便组织与环境检测到副结核的存在情况。此方法受到样品核酸纯度的影响较大,改进DNA提取的方法,使用高纯度的核酸有助于提高该方法的准确性^[19]。目前尚无基于分子生物学的副结核标准诊断方法,进

一步的开发利用分子生物学对于副结核进行诊断具有广阔前景。

2.2 基于细胞免疫的检测方法

2.2.1 皮肤变态反应(SDTH): 皮肤变态反应(SDTH)是基于迟发型变态反应原理进行的检测,该方法操作比较繁琐,使用价值较为有限^[20]。本方法能检测出处于感染早期的牛,对感染中后期的牛敏感性有所下降。本实验室前期使用SDTH对山东某牛场201头青年牛进行检测,共检出33头副结核阳性牛,进一步用商品化ELISA抗体检测试剂盒对33头牛进行血清学检测,结果只有9头检测为阳性。如果仅从阳性率分析,SDTH显然比ELISA具有更高的敏感性,然而由于禽结核菌素与副结核菌素存在抗原成分不明确的缺点,同时与其他环境分枝杆菌存在共同抗原,因此很容易产生非特异性反应^[21]。SDTH作为副结核诊断的经典方法自然有其特殊的优点,但是该方法在实际检验中非常繁琐,至少需对检验牛进行2次保定,对于可疑样本还需进行复检,耗费人力,在生产中很难普及。

2.2.2 IFN- γ 释放试验: 1989年Wood等首次建立了IFN- γ 释放试验用来检测结核杆菌感染^[22]。该方法是通过检测经提纯结核菌素(PPD)刺激16–24 h培养的全血中 γ 干扰素(IFN- γ)的释放水平来判断牛是否感染结核,体外培养的外周血致敏T淋巴细胞经相同抗原再次刺激时会快速分泌IFN- γ 。针对副结核的检测同样适用该方法,使用 γ 干扰素释放试验能够检测到感染副结核牛早期Th1型细胞介导的细胞免疫反应,及时发现处于早期感染阶段的牛^[22]。刺激实验使用的副结核菌素能够刺激致敏淋巴细胞快速产生 γ 干扰素,但同样因为菌素成分的复杂性及分枝杆菌之间的同源性,容易引起交叉反应导致假阳性^[23]。目前国际上尚无统一副结核 γ 干扰素检测标准,且由于根据刺激原类型以及使用量的不同,该方法的敏感性和特异性存在

较大差异^[24], 据报道根据判断标准的不同, 在牛群中进行的副结核 γ 干扰素释放实验特异性从67%到94%, 敏感性则从13%到85%不等^[25]。

2.3 基于体液免疫的检测方法

2.3.1 酶联免疫吸附试验(ELISA): 目前已有商品化的副结核ELISA诊断试剂盒用于牛副结核病的诊断, 针对血清中副结核特异性抗体的检测是目前最常用的副结核检测方法。1978年Jørgensen首先采用酶联免疫吸附试验(ELISA)诊断牛副结核病^[26], 目前商品化ELISA试剂盒主要检测牛血清中以及牛奶中的副结核抗体。MAP除了与结核分枝杆菌、牛结核分枝杆菌、禽结核分支杆菌、草分支杆菌存在严重交叉反应之外, 还与放线菌属、链霉菌属等存在交叉反应, 因此在ELISA检测中存在着严重的假阳性现象^[27]。为了减少假阳性, 研究人员一方面通过亲和层析、凝胶层析等方法提纯包被抗原, 另一方面是排除待检血清中非特异性抗体的干扰^[28], 目前有学者用热处理的草分支杆菌素与待检血清反应^[29], 以减少其他干扰菌的交叉反应。

副结核ELISA诊断的关键是寻找到具有诊断价值的副结核特异性蛋白, Leite等通过蛋白组学寻找到了11种在感染副结核感染早期分泌的特异性蛋白抗原^[30], 通过体外表达的蛋白作为包被抗原, 建立了ELISA方法。用建立的ELISA方法持续追踪人工感染的副结核牛体内几种不同蛋白的抗体变化规律, 结果发现部分特定蛋白抗体在副结核分枝杆菌感染早期就能检测到。本实验室也曾以pET-32a原核表达载体, 成功表达了其中6个特异性蛋白, 分别为MAP0855、MAP0862、MAP1345、MAP2154、MAP3732和MAP3817, 将6个蛋白纯化定量后作为包被抗原, 建立了检测牛副结核病的ELISA方法, 并对临床采集的副结核阳性血清、牛结核阳性血清、牛布病阳性血清、牛大肠杆菌阳性血清以及健康阴性牛血清进

行了检测, 其中重组蛋白MAP0862以及MAP1345能有效将副结核阳性血清与其他干扰血清相区分, 其诊断价值在进一步研究开发。

ELISA检测同样存在着敏感性低的缺点, 有研究表明细菌分离试验与ELISA实验的符合率仅有37%^[31]。ELISA的敏感性同样取决于病畜所处的年龄段与所属类型, 澳大利亚在奶牛群体中进行的一项研究发现针对2、3、4岁龄的奶牛, ELISA的敏感性分别为1.2%、8.9%、11.6%, 针对6岁龄后群体该方法的敏感性为15%^[32]。Nielsen等对黄牛群体进行的研究发现针对不同年龄段的牛ELISA方法的敏感性从7%到94%不等^[33]。

2.3.2 补体结合试验(CFT): 补体结合试验是以检测动物感染病原菌或免疫后血清抗体的一种经典试验方法, 主要检测血清中的IgG与IgM型抗体, 该方法具有较好的敏感性与特异性。Kalis等通过CFT与ELISA检测牛副结核血清抗体的研究表明, CFT的敏感性高于ELISA方法, 能更有效的检测出早期临床样本^[24]。但CFT检验操作复杂, 需要同时满足检测系统(溶菌系统)与指示系统(溶血系统)成立, 对于溶血素、补体以及抗原稍有疏忽就会导致较大的误差, 同时该方法缺少统一操作标准以及标准阳性血清, 且对于不同的病原规程操作方法不一^[34], 在生产中较难普及。颜思通等通过采用微量CFT对副结核病进行检测, 在一定程度上降低了操作难度, 便于在生产中的使用^[34]。

2.3.3 琼脂扩散试验(AGID): 琼脂扩散试验作为一种经典的免疫学实验也一直被应用于副结核病的诊断, 其具有操作简便、可靠的特点。一项在新西兰与澳大利亚在小型反刍动物上进行的副结核检测结果表明, 琼脂扩散试验的敏感性与特异性均高于ELISA。应用于琼脂扩散试验的抗原是副结核P18的提取物, 然而目前缺少标准提取规程。另外, 其特异性和敏感性仍需更多的试验数据支持, 目前该方法难以进入实用阶段。

3 总结和展望

副结核感染后机体的免疫反应规律较为复杂, 需要结合不同感染阶段的特征以及牛群年龄的实际情况灵活使用几种检测方法进行持续追踪, 寻找到适合不同时期的检测方法。比如副结核感染的育成牛通常处于早期感染阶段, 此时应该重点考虑采用针对细胞免疫反应的检测方法, 可采用皮肤变态反应与 γ 干扰素释放试验进行检测, 并结合抗体检测以及细菌分离培养。对于2岁龄后的疑似感染牛, 应重点结合针对体液免疫的检测方法, 采用ELISA方法、补体结合试验以及琼脂扩散试验检测血清中针对副结核抗体水平, 同时结合分子生物学方法以及细菌分离培养方法检测粪便中的带菌情况, 并辅以DTH检测与 γ 干扰素释放试验。由于牛副结核病暂时无特效治疗方法, 对阳性个体的及时淘汰是预防和控制该病的主要手段; 该病潜伏时间较长, 对于曾发生此疾病的流行区或者面临严重威胁的地区, 应通过多种方法定期检测种群状态, 及时淘汰阳性牛, 控制该病发生发展。

参考文献

- [1] Laurin EL, Chaffer M, McClure JT, McKenna SLB, Keefe GP. The association of detection method, season, and lactation stage on identification of fecal shedding in *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infectious dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 2015, 98(1): 211–220.
- [2] David J, Barkema HW, Mortier R, Ghosh S, Guan LL, De Buck J. Gene expression profiling and putative biomarkers of calves 3 months after infection with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2014, 160(1/2): 107–117.
- [3] Kong FD, Xu SF, Wang JM, Zhou BH. Development of diagnostic techniques of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Inspection and Quarantine Science*, 2005, 14(S): 57–60. (in Chinese)
孔繁德, 徐淑菲, 王景明, 周斌华. 副结核分枝杆菌诊断技术的研究进展. *检验检疫科学*, 2005, 14(S): 57–60.
- [4] Xu G, Jiang SG, Wang S, Wang ZC. Bovine paratuberculosis and prevention. *Grass-Feeding Livestock*, 2014, (4): 53–56. (in Chinese)
徐刚, 蒋曙光, 王蒞, 王治才. 牛副结核及其防治. *草食家畜*, 2014, (4): 53–56.
- [5] Nielsen SS, Toft N. Age-specific characteristics of ELISA and fecal culture for purpose-specific testing for paratuberculosis. *Journal of Dairy Science*, 2006, 89(2): 569–579.
- [6] Sun Y, Ma SC, Dong H, Wang XY. Serological investigation and analysis of bovine paratuberculosis in some Provinces of China. *Progress in Veterinary Medicine*, 2015, 36(11): 118–120. (in Chinese)
孙雨, 马世春, 董浩, 王晓英. 我国部分省市牛副结核病的血清学调查与分析. *动物医学进展*, 2015, 36(11): 118–120.
- [7] Meng WJ, Liu G, Wang JD. Clinical and pathology diagnosis of bovine paratuberculosis. *Shanghai Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2015, (2): 54–55. (in Chinese)
孟文军, 刘刚, 王建东. 牛副结核病的临床及病理学诊断. *上海畜牧兽医通讯*, 2015, (2): 54–55.
- [8] Qiao YS. Diagnosis and prevention of bovine paratuberculosis. *Chinese Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2007, (3): 48. (in Chinese)
乔艳双. 成年牛副结核病的诊治和防控. *畜牧兽医科技信息*, 2007, (3): 48.
- [9] OIE. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 6th ed. Paris, France: Office International des Epizooties, 2008: 1092–1106.
- [10] McGregor H, Abbott KA, Whittington RJ. Effects of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection on serum biochemistry, body weight and wool growth in Merino sheep: a longitudinal study. *Small Ruminant Research*, 2015, 125: 146–153.
- [11] Lybeck KR, Storset AK, Dønne B, Valheim M, Olsen I. Faecal shedding detected earlier than immune responses in goats naturally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Research in Veterinary Science*, 2011, 91(1): 32–39.
- [12] Khol JL, Pinedo PJ, Buergelt CD, Neumann LM, Rae DO. Lymphatic fluid for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cows by PCR, compared to fecal sampling and detection of antibodies in blood and milk. *Veterinary Microbiology*, 2014, 172(1/2): 301–308.
- [13] McFadden JJ, Butcher PD, Chiodini R, Hermon-Taylor J. Crohn's disease-isolated mycobacteria are identical to *Mycobacterium paratuberculosis*, as determined by DNA

- probes that distinguish between mycobacterial species. *Journal of Clinical Microbiology*, 1987, 25(5): 796–801.
- [14] Wang JF, Huang SW, Liu SG, Ni JB, Wang C, Zhang JH, Yu JM, Zhu TM, Huang ST. Development of a LAMP assay for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2012, 34(7): 555–557. (in Chinese)
王建峰, 黄素文, 刘思国, 倪建波, 王春, 张吉红, 于纪棉, 朱堂明, 黄绍棠. 牛副结核分枝杆菌LAMP快速检测方法的建立. *中国预防兽医学报*, 2012, 34(7): 555–557.
- [15] Botsaris G, Liapi M, Kakogiannis C, Dodd CER, Rees CED. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bulk tank milk by combined phage-PCR assay: evidence that plaque number is a good predictor of MAP. *International Journal of Food Microbiology*, 2013, 164(1): 76–80.
- [16] Chen R, Liu ZY, Gao XB, Liu ZL, Wu XW, Zeng BJ, Luo CB, Lin ZX. Development and application of a real time PCR detection kit specific for *Mycobacterium paratuberculosis*. *Microbiology*, 2009, 36(2): 292–297. (in Chinese)
陈茹, 刘中勇, 高小博, 刘志玲, 吴晓薇, 曾碧健, 罗长保, 林志雄. 副结核荧光PCR试剂盒研制与应用. *微生物学通报*, 2009, 36(2): 292–297.
- [17] Stabel J, Bannantine J. Development of a nested PCR method targeting a unique multicopy element, ISMap02, for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fecal samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43(9): 4744–4750.
- [18] Sevilla IX, Singh SV, Garrido JM, Aduriz G, Rodríguez S, Geijo MV, Whittington RJ, Saunders V, Whitlock RH, Juste RA. Molecular typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains from different hosts and regions. *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties*, 2005, 24(3): 1061–1066.
- [19] Donat K, Kube J, Dressel J, Einax E, Pfeffer M, Failing K. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in environmental samples by faecal culture and real-time PCR in relation to apparent within-herd prevalence as determined by individual faecal culture. *Epidemiology and Infection*, 2015, 143(5): 975–985.
- [20] Roussey J, Coussens P. Effects of regulatory T cells on peripheral blood mononuclear cell responses to live *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cows with Johne's disease. (VET2P.1035). *The Journal of Immunology*, 2014, 192(1 Supplement): 207.7.
- [21] Li M, Jia H, Xin T, Guo XY, Yuan WF, Hou SH, Hou Q, Gao XT, Wu J, Dong RK, Yang HJ, Liu LX, Zhu HF. Expression, purification and activity evaluation of Mb1230 gene of *Mycobacterium bovis*. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2015, 42(10): 2544–2550. (in Chinese)
李明, 贾红, 鑫婷, 郭晓宇, 袁维锋, 侯邵华, 侯强, 高新桃, 吴竞, 董瑞凯, 杨宏军, 刘来兴, 朱鸿飞. 牛分枝杆菌Mb1230基因的表达纯化及其活性评价. *中国畜牧兽医*, 2015, 42(10): 2544–2550.
- [22] Wood P, Kopsidas K, Milner A, Hill J, Gill I, Webb R, Mack W, Coates K. The development of an *in vitro* cellular assay for Johne's disease in cattle. *Johne's Disease. Current Trends in Research, Diagnosis and Management*, 1989, 3(5): 164–167.
- [23] Bannantine JP, Baechler E, Zhang Q, Li LL, Kapur V. Genome scale comparison of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with *Mycobacterium avium* subsp. *avium* reveals potential diagnostic sequences. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, 40(4): 1303–1310.
- [24] Kalis CHJ, Collins MT, Hesselink JW, Barkema H. Specificity of two tests for the early diagnosis of bovine paratuberculosis based on cell-mediated immunity: the Johnin skin test and the gamma interferon assay. *Veterinary Microbiology*, 2003, 97(1/2): 73–86.
- [25] Huda A, Lind P, Christoffersen AB, Jungersen G. Analysis of repeated tests for interferon-gamma (IFN- γ) response and faecal excretion for diagnosis of subclinical paratuberculosis in Danish cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2003, 94(3/4): 95–103.
- [26] Jørgensen JB. Pathogenicity and immunogenicity of atypical mycobacteria for calves: a short summary. *Reviews of Infectious Diseases*, 1981, 3(5): 979–980.
- [27] Bannantine JP, Li LL, Mwangi M, Cote R, Garay JAR, Kapur V. Complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, isolated from human breast milk. *Genome Announcements*, 2014, 2(1): e01252–13.
- [28] Aly SS, Gardner IA, Adaska JM, Anderson RJ. Off-site rearing of heifers reduces the risk of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* ELISA seroconversion and fecal shedding in a California dairy herd. *Journal of Dairy Science*, 2015, 98(3): 1805–1814.
- [29] Lee SJ, Noh KT, Kang TH, Han HD, Shin SJ, Soh BY, Park JH, Shin YK, Kim HW, Yun CH, Park WS, Jung ID, Park YM. The *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* protein MAP1305 modulates dendritic cell-mediated T cell proliferation through Toll-like receptor-4. *BMB Reports*, 2014, 47(2): 115–120.
- [30] Leite FL, Reinhardt TA, Bannantine JP, Stabel JR. Envelope protein complexes of *Mycobacterium avium* subsp.

- paratuberculosis* and their antigenicity. *Veterinary Microbiology*, 2015, 175(2/4): 275–285.
- [31] Chiodini RJ. Abolish *Mycobacterium paratuberculosis* strain 18. *Journal of Clinical Microbiology*, 1993, 31(7): 1956–1958.
- [32] Jubb TF, Sergeant E, Callinan APL, Galvin JW. Estimate of the sensitivity of an ELISA used to detect Johne's disease in Victorian dairy cattle herds. *Australian Veterinary Journal*, 2004, 82(9): 569–573.
- [33] Nielsen SS, Toft N. Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: a review of accuracies of ELISA, interferon- γ assay and faecal culture techniques. *Veterinary Microbiology*, 2008, 129(3/4): 217–235.
- [34] Yan ST, Lin ZX, Zhu DZ, Yu HQ, Cao ZL. Study of microcomplement fixation test for cattle paratuberculosis and sheep paratuberculosis. *Chinese Journal of Animal Quarantine*, 2004, 21(11): 23–26. (in Chinese)
颜思通, 林志雄, 朱道中, 鱼海琼, 曹志玲. 微量补体结合试验检测牛、羊副结核病的研究. *中国动物检疫*, 2004, 21(11): 23–26.

Immune response of body after *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection and advances in detection methods - A review

Zhen Zhang^{1,2}, Weishan Chang¹, Jiabo Ding^{2*}

¹ College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shandong Agriculture University, Taian 270018, Shandong Province, China

² China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China

Abstract: The progressive form of clinical *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) is characterized by production losses, weight loss, chronic intractable diarrhea, and severe emaciation leading to death in cattle. Substantial economic losses to the animal husbandry are a result of infection. Cattles are usually infected in their youth through the oral route and will experience a long subclinical stage. At the early stage of infection, cellular immunity is the main immune response with bacterium excretion increased significantly after a subclinical period of 2 to 5 years. The majority of methods currently used to detect MAP are based on etiological detection, cellular and humoral immune response. Owing to the different mechanism of diagnostic methods varies a lot at a particular infection period. In this review, we illustrate the transmission route and the characteristic of immune responses of MAP, and also summarize the diagnostic methods of MAP.

Keywords: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, bovine paratuberculosis, immune response, detection method

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Key Research and Development Plan (2016 YFD0500902) and by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2012AA101302)

*Corresponding author. Tel/ Fax: +86-10-62103674; E-mail: dingjiabo@126.com

Received: 4 January 2016; Revised: 25 April 2016; Published online: 9 May 2016