

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOEXPERIMENTAÇÃO**

**ESTUDO DA PARATUBERCULOSE EM VACAS LEITEIRAS NO RIO
GRANDE DO SUL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Diorges Henrique Setim

Passo Fundo, RS, Brasil

2020

**ESTUDO DA PARATUBERCULOSE EM VACAS LEITEIRAS NO RIO GRANDE
DO SUL**

Diorges Henrique Setim

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, Área de Concentração em Bioexperimentação, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo (UPF), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Bioexperimentação**

Orientadora: Prof^a. Dra. Adriana Costa da Motta

Passo Fundo, RS, Brasil

2020

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOEXPERIMENTAÇÃO**

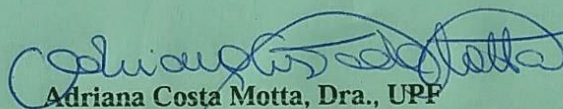
A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

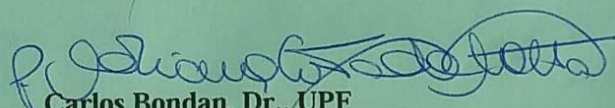
ESTUDO DA PARATUBERCULOSE EM VACAS LEITEIRAS NO RIO GRANDE DO SUL

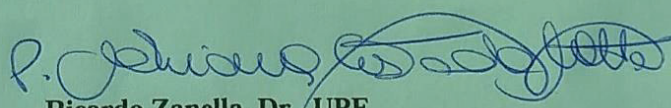
Elaborada por
Diorges Henrique Setim

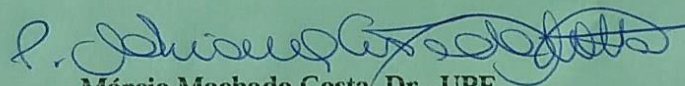
Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Bioexperimentação

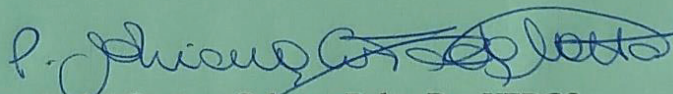
Comissão Examinadora


Adriana Costa Motta, Dra., UPF
(Orientadora/Presidente)


Carlos Bondan, Dr., UPF


Ricardo Zanella, Dr., UPF


Márcio Machado Costa, Dr., UPF


André Gustavo Cabrera Dalto, Dr., UFRGS

**Passo Fundo, RS, Brasil
2020**

CIP – Catalogação na Publicação

S495e Setim, Diorges Henrique
Estudo da paratuberculose em vacas leiteiras no Rio Grande do Sul / Diorges Henrique Setim. – 2020.
46 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Costa da Motta.
Dissertação (Mestrado em Bioexperimentação) –
Universidade de Passo Fundo, 2020.

1. Paratuberculose. 2. Bovino de leite - Rio Grande do Sul. 3. Epidemiologia veterinária - Rio Grande do Sul. I. Motta, Adriana Costa da, orientadora. II. Título.

CDU: 636.2

Catálogo: Bibliotecária Jucelei Rodrigues Domingues – CRB 10/1569

AGRADECIMENTOS

Sou grato pelo privilégio de sempre ter acesso ao ensino e sempre incentivado a buscar mais. E isso se deve, principalmente, a minha mãe, que me faltam palavras para descrever tudo o que já fez por mim nesses vinte e poucos anos, amo você. Ainda, a minha companheira de vida, Fabi, que me apoiou pelo outro lado durante esse período turbulento.

A minha orientadora, Professora Adriana, obrigado pelo incentivo e colaboração nesse projeto novo e desafiador. Pelos conhecimentos e trocas de informações desde a graduação, pelas oportunidades de necropsias e participações em pesquisas.

A todos do Laboratório de Patologia Animal (Tanise, Gabriela, Thaisi, Eduardo) do Curso de Medicina Veterinária da UPF, pela paciência e pelos favores de sempre, obrigado pelas comidas disponibilizadas, principalmente pela catarina de chocolate branco.

As estagiárias extensionistas, bolsistas e voluntária de Iniciação Científica vinculadas ao projeto desta dissertação, Caroline, Jéssica Cristina e Leila pela colaboração no que foi necessário para execução das metodologias, organizações e revisões pertinentes.

Aos demais que colaboraram para que o projeto pudesse ser realizado, Heloísa, Lucí, Jerbeson, Sérgio, Tiago, colaboradores do SARLE-UPF e a todos que ajudaram de alguma maneira, de forma direta ou indireta, muito obrigado.

Aos professores Bondan, Ricardo e Márcio que participaram da qualificação do projeto e colaboraram de uma forma ou outra durante o desenvolvimento da pesquisa.

A realização desse trabalho só foi possível pelo apoio financeiro da CAPES, por meio da bolsa modalidade II e, posteriormente, modalidade I. À Universidade de Passo Fundo (UPF) pela concessão de descontos da mensalidade e pela aquisição de insumos por meio do Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação do Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária UPF.

EPIGRAFE

“Quando não souber se está fazendo pesquisa, ensino ou extensão é porque está fazendo da forma correta”.

David Driemeier/Franklin Riet-Correa

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE ABREVIATURAS	10
RESUMO	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1. ETIOLOGIA	15
2.2. PATOGENIA E MANIFESTAÇÕES DA DOENÇA	15
2.3. DIAGNÓSTICO	17
2.4. TRATAMENTO	18
2.6. CONTROLE E PREVENÇÃO	19
2.7. PERDAS ECONÔMICAS E PRODUTIVAS	20
2.8. POTENCIAL ZONÓTICO	20
2.9. DISTRIBUIÇÃO DA DOENÇA	21
3. CAPÍTULO 1	22
DETECTION OF ANTIBODIES IN MILK AGAINST PARATUBERCULOSIS IN MILK COWS IN RIO GRANDE DO SUL.....	22
ABSTRACT.....	23
RESUMO	24
1. INTRODUCTION	25
2. MATERIALS AND METHODS	26
2.1 Study population, sample calculation and sampling.....	26
2.2 Sample collection and storage	27
2.3 Sample processing for ELISA	27
2.4 Statistical analysis	27
3. RESULTS.....	27
4. DISCUSSION	28
5. CONCLUSION	30
6. REFERENCES	30
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	37
5. REFERÊNCIAS.....	38

LISTA DE FIGURAS**3. CAPÍTULO 1.**

Figure 1.	Map of the distribution of paratuberculosis in the mesoregions of Rio Grande do Sul.....	35
-----------	--	----

LISTA DE TABELAS**3. CAPÍTULO 1**

Table 1.	Relationship of the stratification of the number to be collected, carried out from the mesoregions and their lactating cows herd, according to available data (Aliança Láctea Sul Brasileira, 2020).....	33
Table 2.	Detection of paratuberculosis in the different mesoregions of RS.....	33
Table 3.	Municipalities in which cows with paratuberculosis were detected, the respective amounts of positives, suspects, negatives and sero-reagents and their distributions within the sampled herd.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS

BAARs	Bacilos álcool ácidos resistente
CD	Doença de Crohn
Células M	Células micropregas
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FC	Fixação do complemento
IFN- γ	Interferon gamma
IHQ	Imuno-histoquímica
JD	Doença de Johne
MAP	Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis
nm	Nanômetros
OIE	World Organization for Animal Health
PCR	Polymerase Chain Reaction
RPM	Rotações por minuto
RS	Rio Grande do Sul
Th1	Linfócitos T helper 1
Th2	Linfócitos T helper 2
ZN	Ziehl Neelsen

RESUMO
Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação
Universidade de Passo Fundo

**ESTUDO DA PARATUBERCULOSE EM VACAS LEITEIRAS NO RIO
GRANDE DO SUL**

Autor: Diorges Henrique Setim
Orientadora: Adriana Costa da Motta
Passo Fundo, 30 de Junho de 2020

A paratuberculose é uma doença infectocontagiosa, causada pelo *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), caracterizada por enterite granulomatosa progressiva, diarreia profusa intratável, emaciação e óbito. Acomete principalmente bovinos, sendo esses os principais disseminadores do MAP, no entanto outros animais são suscetíveis. Trata-se de uma doença onerosa para a cadeia produtiva, envolvendo perdas econômicas de grande significância. No Rio Grande do Sul (RS), embora alguns surtos da doença em bovinos tenham sido relatados, carecem estudos epidemiológicos. Nesse contexto, desenvolvemos um estudo epidemiológico focado em vacas leiteiras de fazendas comerciais, de diferentes mesorregiões do Estado, com intuito de verificar a sua distribuição em diferentes regiões do Estado. Assim, verificamos que em duas mesorregiões do Estado a paratuberculose bovina é detectada, assim como, é possível realizar a triagem de rebanhos com amostras do tanque de expansão, devido que a frequência de detecção de anticorpos por rebanho é alta, o que torna a detecção por ELISA eficaz.

Palavras chave: leite, epidemiologia, diagnóstico, MAP.

ABSTRACT
Master's Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação
Universidade de Passo Fundo

**STUDY OF PARATUBERCULOSIS IN DAIRY COWS IN RIO GRANDE
DO SUL**

Author: Diorges Henrique Setim
Advisor: Adriana Costa da Motta
Passo Fundo, 30 de Junho de 2020

Paratuberculosis is an infectious disease caused by *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis (MAP), characterized by progressive granulomatous enteritis, profuse intractable diarrhea, emaciation and death. It mainly affects cattle, which are the main disseminators of MAP, however other animals are susceptible. It is a costly disease for the production chain, involving economic losses of great significance. In Rio Grande do Sul (RS), although some outbreaks of the disease in cattle have been reported, epidemiological studies are lacking. In this context, we developed an epidemiological study focused on dairy cows from commercial farms, from different mesoregions of the State, in order to verify their distribution in different regions of the State. Thus, we verified that in two mesoregions of the State bovine paratuberculosis is detected, as well, it is possible to screen herds with samples from the expansion tank, because the frequency of detection of antibodies per herd is high, which makes the detection by an effective ELISA.

Key words: milk, epidemiology, diagnostic, MAP.

1. INTRODUÇÃO

A paratuberculose, conhecida como doença de Johne, causada pelo *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP), gera perdas produtivas, sanitárias e prejuízos econômicos, afetando principalmente ruminantes (1). Os animais infectados, em sua maioria, não apresentam sinais clínicos característicos da enfermidade, mas podem eliminar a micobactéria nas fezes e leite (2-4). Tem sido proposto uma associação do MAP com a doença de Crohn em seres humanos, entretanto, o agente ainda não é considerado zoonótico (5).

A forma de contaminação é pela via fecal-oral, dessa forma, os bovinos entram em contato com o agente por meio da água ou quaisquer alimentos, tais como colostro, leite, pastagens e ambientes contaminados (2,6). A liberação de MAP no sêmen pode infectar o feto, entretanto, é de menor impacto quando comparado à forma de contaminação oral depois do nascimento (7).

O diagnóstico padrão ouro da paratuberculose é obtido através da análise histopatológica de biópsias ou necropsias, o qual é associado ao isolamento micobacteriano (8,9). Entretanto, a necropsia nem sempre é uma opção (10) e a coleta de biópsia do íleo é complexa (11), o que torna a biópsia retal uma opção para auxiliar no diagnóstico (12). As desvantagens dessas metodologias são a complexidade da execução, a possibilidade de falsos negativos e a demora nos resultados, principalmente do cultivo microbiológico (13).

Com o intuito de realizar um diagnóstico preciso e rápido, ao longo dos anos, inúmeras técnicas foram, e ainda são, criadas e adaptadas para diagnosticar a paratuberculose e o MAP (14). Para identificar animais com paratuberculose, inclusive assintomáticos, o teste de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) pode ser utilizado (15,16). A PCR (Polymerase Chain Reaction) pode substituir o cultivo bacteriano ou auxiliar na identificação das colônias bacterianas cultivadas, fornece resultados com alta sensibilidade (93%) e especificidade (100%) (17,18).

Os ensaios para diagnóstico da paratuberculose disponíveis atualmente, fornecem resultados confiáveis ainda que para o diagnóstico precoce da enfermidade. Dessa forma, é factível realizar o controle da doença de maneira mais ágil e economicamente viável. A OIE

(World Organization for Animal Health) classifica a distribuição da paratuberculose como mundial (19), entretanto, é consolidada a premissa de que estudos epidemiológicos, tanto abrangentes como locais, são necessários para melhor compreender e controlar a doença (20).

Os prejuízos causados pela paratuberculose em todo mundo, ocorrem de forma direta e indireta. Uma das causas indiretas é a disseminação de MAP ao ambiente e em alimentos humanos. Ainda que a Doença de Crohn (CD) não seja classificada como uma zoonose, o MAP já foi identificado em pacientes com essa enfermidade. Tendo em vista o potencial zoonótico dessa micobactéria dos ruminantes, os prejuízos causados pelo MAP alcançam danos imensuráveis, visto a gravidade da doença e o comprometimento da vida das pessoas afetadas pela CD. O MAP pode entrar em contato com humanos, por meio de carnes, vísceras (21), leite (22), fórmulas infantis de lácteos (23), água e verduras (24), sendo que essa contaminação pode ocorrer de forma direta ou indireta.

No Brasil há descrição da doença em 11 Estados (13), com casos clínicos e subclínicos. No Rio Grande do Sul (RS), manifestações clínicas da enfermidade já foram descritas nas mesorregiões metropolitana e sul (9,25,26). Entretanto, nas mesorregiões noroeste e nordeste, as quais concentram, aproximadamente, 60% da produção leiteira do Estado, não há estudo sobre paratuberculose.

Assim, devido à importância sanitária, econômica e de saúde única, é imprescindível conhecer como ocorre a distribuição dessa enfermidade nas diferentes mesorregiões do RS. Assim, em nosso estudo, no capítulo 1, mostramos como ocorre a distribuição da paratuberculose nas mesorregiões de maior importância na cadeia leiteira. A revisão bibliográfica pertencente à dissertação, tem por objetivo trazer os estudos, mais relevantes e atuais, necessários para a compreensão da paratuberculose em todos os seus aspectos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. ETIOLOGIA

A Paratuberculose ou Doença de Johne é uma enterite granulomatosa, debilitante e contagiosa, causada pelo *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*, um bacilo álcool-ácido resistente. O seu crescimento é o mais lento dentre as micobactérias cultiváveis, além de se dependente de micobactina, é intracelular obrigatória e pode resistir por mais de um ano no solo e na água por tempo indeterminado (19,27).

2.2. PATOGENIA E MANIFESTAÇÕES DA DOENÇA

Em bovinos, a manifestação clínica pode ocorrer a partir dos 24 meses, a qual é caracterizada por diarreia intermitente a contínua, emagrecimento com normorexia e, por vezes, polidipsia, pelos arrepiados (25,28), edema submandibular, que evolui para caquexia, desidratação e óbito (9), que pode ser de forma direta ou por suscetibilidade a outras doenças. Os bovinos são elencados como mais acometidos pela enfermidade, porém a mesma afeta caprinos, ovinos (29,30), bubalinos (31), coelhos (32), aves, dentre outros mamíferos domésticos e selvagens (33).

As principais formas de contaminação são fecal-oral e transplacentária. Os bezerros são a categoria animal mais susceptível a infecção (11,34). Pela via transplacentária, possuem uma probabilidade de contaminação em 9% e 39% quando oriundos de vacas assintomáticas e sintomáticas, respectivamente (7). O contato com o agente pode ocorrer no momento do parto, pós-parto imediato, ingestão de colostro, leite (2) água e fezes contaminadas (24).

Ambiente com acúmulo de fezes, fatores estressantes, aleitamento e alimentação incorretos propiciam a invasão pelo bacilo. Além disso, outros patógenos podem interagir, lesionar a mucosa e facilitar a entrada do MAP e/ou infectar a mucosa através da permeabilidade transitória causada por este momentos após sua migração para a lâmina própria. Soma-se a isto, a permeabilidade intestinal fisiológica dos recém-nascidos, a qual é utilizada pelo agente para invadir a mucosa, por meio da pinocitose (34). Nesse sentido, mesmo com a mucosa intacta, as células M captam o MAP do lúmen intestinal e apresentam-no aos macrófagos residentes e células dendríticas

(35,36). Após ser internalizado por essas células, o mesmo impede a formação do fagolisossomo, o que permite sua permanência nesse leucócito (37).

Na fase inicial da infecção, ocorre a resposta imune inata, composta, principalmente, por macrófagos, os quais se tornam-se macrófagos epitelioides. Posteriormente e concomitantemente, há o influxo de linfócitos e formação de células gigantes do tipo Langhans, seguido de plasmócitos (38). Esta resposta inflamatória é mediada por linfócitos T helper 1 (Th1), a qual limita parcialmente a disseminação e progressão da enfermidade (39). Porém, com a multiplicação bacteriana em grande quantidade, ocorre a lise da célula hospedeira e as bactérias permanecem no espaço extracelular até a fagocitose. A permanência do MAP no ambiente extracelular induz uma resposta por linfócitos T helper 2 (Th2), a qual se sobressai a Th1(40). Nessa inversão de papéis, mesmo com alta titulação de imunoglobulinas, a neutralização exercida é baixa. Assim, as bactérias seguem se multiplicando no interior de macrófagos e células gigantes do tipo Langhans. Nesse momento se intensifica a liberação fecal de MAP, como também, se detecta alta titulação de anticorpos neutralizantes (17,41). Dessa forma, gradativamente, pela liberação de quimiocinas e citocinas, intensifica-se o influxo de macrófagos, linfócitos e plasmócitos, a ponto de ocorrer o espessamento da mucosa e lâmina própria da porção intestinal afetada (42,43). Por esse mecanismo, diminui drasticamente a capacidade de absorção de proteínas e demais nutrientes pelo intestino delgado principalmente, além de acometer todo o intestino com a progressão da doença (44). Em consequência, ocasiona sinais sistêmicos, como queda do desempenho zootécnico, pelos eriçados, edema submandibular devido à hipoproteinemia, diarreia aquosa enegrecida intermitente a contínua e intratável, emaciação, caquexia, desidratação e óbito (9,25,45).

Apesar da invasão pelo agente ocorrer em sua maioria no período neonatal até um ano de idade, a manifestação clínica da doença ocorre em animais com mais de 19 meses de idade (16). A idade em que ocorrerá a doença clínica dependerá da idade em que ocorreu a infecção, da quantidade de patógeno ingerida, das condições alimentares e ambientais e do *status* imunitário geral. Casos de manifestação clínica ocorrem, principalmente, após os 4 anos de idade (46), enquanto a soroconversão e derramamento de MAP, podem ser detectados a partir de 2 anos de idade (28).

2.3. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico clínico é complexo, por apresentar alterações inespecíficas, tais como: queda da produção, emagrecimento com normorexia e diarreia profusa de forma intermitente ou contínua, sendo essa última refratária a tratamentos ou não responsiva. Para firmar o diagnóstico, utiliza-se parâmetros de meio direto, identificando o agente, ou indireto através de mensuração da resposta imune do hospedeiro frente à infecção.

Dessa forma, como ‘padrão ouro’ temos o cultivo microbiológico associado à histopatologia. Entretanto, o cultivo microbiológico mesmo com sensibilidade alta (nas fases clínicas) e especificidade próxima a 100%, tem a desvantagem de ser laborioso e demorado, em torno de seis meses para o resultado. Além disso, um resultado negativo não exclui a suspeita.

A PCR (Polymerase Chain Reaction) para identificar o MAP foi desenvolvida para substituir ou auxiliar a cultura microbiológica, fornecendo resultados no mesmo patamar da microbiologia, porém em apenas alguns dias. As amostras de eleição para a PCR, compreendem: fezes da ampola retal, esfregaços da mucosa retal, fezes ambientais, amostras de leite, biópsia retal, fragmentos de intestinos, linfonodos mesentéricos e hepático, fígado, e demais tecidos com alterações compatíveis com a doença (8–10,47).

Os achados de necropsia em bovinos apresentam-se, ao exame externo por: caquexia, evidência de diarreia, mucosas pálidas, pelos eriçados, desidratação e pode haver edema submandibular. Ao exame interno, devido à caquexia, pode haver atrofia serosa da gordura epicárdica e derramamentos cavitários do tipo transudato. As lesões macroscópicas características, como parede intestinal espessada, mucosa com aspecto de circunvoluções cerebrais, encontram-se predominante em íleo, válvula-íleocecal e jejuno (25). Ocorre ainda, a formação de vasos linfáticos dilatados e de aspecto varicoso, linfonodos subjacentes aumentados de tamanho com presença de líquido leitoso aos cortes e ou pontos brancos na superfície de corte. As lesões concentram-se em íleo, válvula-íleocecal e jejuno devido a maior quantidade de placas de Payer e alta concentração de células M, o que torna o local de predileção do MAP (38). No entanto, com a progressão da doença ocorre a disseminação ao duodeno distal, ceco e cólon e de forma multifocal o reto. Ainda, em casos mais avançados, há mineralização da aorta abdominal, semilunares da aorta e serosa do rúmen (9).

Os achados histopatológicos demonstram, infiltrado inflamatório granulomatoso difuso, que abrange a lâmina própria da mucosa, placas de Peyer, submucosa, vasos linfáticos e linfonodos mesentéricos. O infiltrado é composto por macrófagos, macrófagos epitelioides, formação de células gigantes tipo Langhans e infiltrado linfoplasmocitário variável (48). Comumente, bacilos álcool ácidos resistente (BAARs) estão presentes associados aos macrófagos (11), células gigantes ou dispersos na lâmina própria entremeados ao infiltrado inflamatório. No entanto, podem variar em sua concentração e até mesmo não ser evidenciados pela coloração de ZN por eventual rompimento da membrana citoplasmática (43). Na forma disseminada, ocorre a migração para outros órgãos, tais como: fígado, rins, pulmões e trato reprodutivo (49). É possível, ainda, ocorrer atrofia e fusão de vilosidades intestinais, linfangiectasia, linfangite granulomatosa, endolinfangite e perilinfangite, perineurite dos plexos de Meissner e proliferação fibroblástica, que, por vezes, está associada a infiltrado mononuclear multifocal (9).

O agente etiológico pode ser identificado pela imuno-histoquímica (IHQ) em cortes emblocados em parafina em complemento a coloração de ZN, que possui sensibilidade e especificidade inferior, mas de baixo custo, comparada a IHQ (43). Porém, por meio da técnica de IHQ é possível detectar os bacilos, pois não é necessária sua integridade para o MAP ser marcado, com isso apresenta maior sensibilidade em comparação com a coloração de ZN, para a qual se faz necessária a integridade do MAP para ocasionar a coloração positiva (21).

Inúmeras técnicas de diagnóstico são focos de estudos, dentre elas a técnica de ELISA (28,50,51), Imunodifusão em Gel Ágar (8), Fixação do Complemento (52) e Ensaio Microfluídico Associado à *Beads* (53) e a citometria de fluxo (54), as quais avaliam de forma indireta, através da mensuração de imunoglobulinas circulantes contra o MAP. Utiliza-se, ainda, para avaliar a resposta celular individual, o Teste de liberação de IFN- γ (55), inoculação de *Jonina* intradérmica, intravenosa ou teste cervical comparativo (50).

2.4. TRATAMENTO

A utilização de antimicrobianos para tratamento em animais de produção não é indicado, salvo casos extremamente específicos, por ser de elevado custo, e ocasionar

resíduos em carne e leite. Ainda, uma terapêutica similar é utilizada em humanos com tuberculose (56) e CD (57), além de propiciar desenvolvimento de bactérias multirresistentes durante o tratamento em animais (58,59).

O tratamento com antimicrobianos gera apenas remissão dos sinais clínicos e diminuição da carga bacteriana e não cura o animal, como também, a manifestação clínica retorna ao cessar a terapia. Dessa forma, por não haver tratamento efetivo e a caquexia ser progressiva, por vezes esses animais são destinados ao abate (60,61). Contudo, realizar a eutanásia e necropsia de animais com a doença é a melhor conduta, pois assim é possível confirmar a suspeita clínica e impedir a entrada de animais com alto nível de MAP em suas fezes nos frigoríficos (49).

2.6. CONTROLE E PREVENÇÃO

O controle da paratuberculose consiste em identificar animais positivos e eliminá-los do rebanho. O critério de descarte pode ser feito por meio de análise dos resultados de sorologia e identificação do MAP nas fezes. Na rotina, são utilizados testes de ELISA para detecção de imunoglobulinas e uma PCR para identificar o MAP liberado nas fezes (62).

Com esses dois parâmetros disponíveis, o descarte de um animal do rebanho pode ser feito associado a outros fatores que o predisponham ao descarte, tais como: mastites, baixa produtividade, problemas de casco, entre outros. Da mesma forma em que ocorre nas outras doenças, quanto menor tempo um bovino infectado permanecer no rebanho, será melhor para atingir os resultados esperados (63).

Os desenvolvimentos de métodos diagnósticos precoces para a detecção da paratuberculose estão em constantes pesquisas, porém, até o momento são de custos elevados, laboriosos e dessa forma não os tornam factíveis de utilizá-los no controle do rebanho (64,65). Em contrapartida, é possível identificar a paratuberculose com ensaios de ELISA e PCR, tanto utilizados em conjunto como individuais. Entretanto, quanto mais parâmetros mensuráveis de uma enfermidade estiverem disponíveis, melhor será o resultado no controle e prevenção da doença no rebanho (1).

O controle e a prevenção devem ser executados concomitantes, para que o resultado seja positivo e motivacional para o produtor. Dessa forma, é indicado que ocorra a testagem em massa dos animais, eliminação dos positivos e suspeitos em

isolamento, seguido de medidas de higiene e biossegurança para mitigar os danos causados pela enfermidade já instalada na fazenda (66).

Nesse âmbito, a compra de animais deve ser cautelosa, sempre testar animais antes de introduzir na fazenda, mesmo que de propriedades livres do patógeno. Caso a compra seja feita de locais sem o controle da paratuberculose, resultados laboratoriais negativos devem ser interpretados com cautela, como também, quarentena mais restrita a esses animais, seguido de novos testes periódicos (67–69).

2.7. PERDAS ECONÔMICAS E PRODUTIVAS

Estudos recentes nos Estados Unidos da América abordam que as perdas econômicas envolvendo a paratuberculose, são estimadas em US \$ 200 a 1.5 milhões por queda de produção e descarte precoce na indústria de laticínios (70). No Brasil, como 2º maior rebanho bovino comercial do mundo, possivelmente esses prejuízos sejam semelhantes (71).

Perdas em carcaças de bovinos aproximam-se de 17% a 31% em relação a bovinos negativos (72). Enquanto que, a perda na produção leiteira apresenta-se em 1,87 Kg de leite/vaca/dia, o qual representa 5,9% do total da produção anual da vaca (73), podendo chegar até um decréscimo de 12% na produção leiteira (74). Os prejuízos aumentam exponencialmente, se agregados às perdas por mastites clínicas das vacas em lactação, já que, em vacas infectadas com MAP a ocorrência de mastites clínicas são maiores (75,76).

Nesse contexto, é evidente que os custos para controlar a paratuberculose são mínimos, quando comparados aos prejuízos de manter animais positivos nas fazendas (77). A implementação e execução de um plano de controle do MAP na fazenda é um investimento a médio e longo prazo, com resultados obtidos por meio de maior produtividade, lucratividade, sanidade e saúde única (70,78).

2.8. POTENCIAL ZOONÓTICO

Desde a descoberta da doença de Crohn, vários cientistas do mundo buscam elucidar o envolvimento do MAP com essa enfermidade. Algumas teorias defendem que o MAP é apenas oportunista, outras que ele é o agente etiológico (14). Entretanto, o

MAP gera apresentações similares, mas não idênticas, nas diferentes espécies suscetíveis, o que reforça a possibilidade de acometer humanos. A semelhança da histopatologia dessas duas enfermidades foi o que iniciou os estudos a respeito desta provável zoonose (79).

Atualmente, o MAP não é classificado como zoonótico (19), entretanto já foi isolado de pacientes com a doença de Crohn (5). Estudos sobre custos com a doença de Crohn, revelam valores aproximados em 9500 euros por ano, por paciente com a doença, e ainda um aumento de 7% recentemente, devido a maior intensificação de terapia anti-micobacteriana empregada (80).

Recentemente, casos de doença de Crohn obtiveram sucesso com tratamento semelhante ao utilizado na paratuberculose, o que evidenciou a importância do MAP na patogenia da doença (57). Há ainda, a possibilidade do envolvimento do MAP em outras doenças, o que segue em estudos, como a colite ulcerativa, e de forma indireta, outras enfermidades de extrema importância em saúde pública, contudo, possuem outro viés, o mimetismo de epítomos, ocasionando doenças autoimunes, dentre elas: Síndrome de Blau (81), Sarcoidose (82), Diabetes tipo 1 (83), Tireoidite de Hashimoto e Esclerose Múltipla (84).

2.9. DISTRIBUIÇÃO DA DOENÇA

A enfermidade está presente em todos os continentes (19) e no Brasil há relatos da doença em 11 Estados, sendo eles: Rio de Janeiro, Santa Catarina, Rio Grande do Sul (RS), Mato Grosso do Sul, São Paulo, Minas Gerais, Paraíba, Goiás, Pará, Pernambuco e Maranhão (13). No RS, a paratuberculose já foi diagnosticada em bovinos de leite (8,9), de corte (25) e em búfalos (31). Contudo, são escassos os estudos no RS, já que, em sua maioria, abordam surtos esporádicos da doença em sua forma clínica e poucos dados são disponibilizados sobre aspectos epidemiológicos da distribuição da doença neste vasto Estado.

3. CAPÍTULO 1

DETECTION OF ANTIBODIES IN MILK AGAINST PARATUBERCULOSIS IN MILK COWS IN RIO GRANDE DO SUL

Diorges Henrique Setim^a, Carlos Bondan^b, Caroline Canova Cortese^c, Jéssica Cristina Peretti^c, Leila Costella^c, Ricardo Zanella^b, Márcio Machado Costa^b, Adriana Costa da Motta^d

a. Student, Master Program of Post-Graduation in Bioexperimentation (PPGBIOEX), Animal Pathology Laboratory (LPA), College of Agronomy and Veterinary Medicine (FAMV), University of Passo Fundo (UPF), Campus I, Passo Fundo, RS, Brazil.

b. Prof. Ph.D, Veterinary Medicine College, FAMV, UPF, Passo Fundo, RS, Brazil.

c. Students, Veterinary Medicine College, PIBIC and PIVIC, LPA, FAMV, UPF, Passo Fundo, RS, Brazil.

d. Prof. Ph.D, Veterinary Medicine College, LPA, PPGBIOEX, FAMV, UPF, Passo Fundo, RS, Brazil. E-mail: acmotta@upf.br * Corresponding author.

DETECTION OF ANTIBODIES IN MILK AGAINST PARATUBERCULOSIS IN MILK COWS IN RIO GRANDE DO SUL

ABSTRACT

Bovine paratuberculosis causes incurable chronic diarrhea, decreased production and withering. It is caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, a mycobactereine dependent mycobacterium, mandatory intracellular, with slow replication in the host and high environmental resistance. In countries that harbor the disease and quantify the damage, the losses are extremely high, directly and indirectly. In order to implement a control program, obtaining local epidemiological data is essential. Thus, a prospective observational cross-sectional study was carried out. Milk samples collected individually from commercial farm cows were tested by an indirect ELISA and classified as negative, suspicious and positive. The disease proved to be detected in two of the five mesoregions tested, obtaining 20 seroreactive cows out of the 362 tested. Together with information from herds, it was found that expansion tank samples can be used for screening and monitoring this disease, in addition to the size of the herd that contributes to greater detection of positive cows.

Keywords: milk, epidemiology, diagnosis, MAP.

DETECÇÃO DE ANTICORPOS NO LEITE CONTRA A PARATUBERCULOSE EM VACAS LEITEIRAS NO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL

RESUMO

A paratuberculose bovina ocasiona diarreia crônica incurável, queda da produção e definhamento. É causado pelo *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, uma micobactéria dependente de micobactina, intracelular obrigatória, com lenta replicação no hospedeiro e elevada resistência ambiental. Em países que abrigam a doença e quantificam os prejuízos, as perdas são extremamente elevadas, de forma direta e indireta. Para implementar um programa de controle, é fundamental a obtenção de dados epidemiológicos locais. Assim, foi realizado um estudo prospectivo observacional transversal. Amostras de leite coletadas individualmente de vacas de fazendas comerciais foram testadas por um ELISA indireto e classificadas como negativas, suspeitas e positivas. A doença demonstrou ser detectada em duas das cinco mesorregiões testadas, obtendo-se 20 vacas sororreagentes das 362 testadas. Juntamente com informações dos rebanhos, foi verificado que amostras de tanque de expansão podem ser utilizadas para triagem e monitoramento desta doença, além de que o tamanho do rebanho contribui para maior detecção de vacas positivas.

Palavras chave: leite, epidemiologia, diagnóstico, MAP.

1. INTRODUCTION

Paratuberculosis or Johne's disease (JD) is caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), which causes progressive granulomatous enteritis (Ayele et al., 2005). It is an infectious, incurable disease that runs with intermittent to continuous watery diarrhea, despite normorexia and normothermia. There is a sharp drop in the body condition score progressing to cachexia and death (Buergelt et al., 1978; Manning & Collins, 2001).

Cattle are the most affected by paratuberculosis, however other animals can develop the disease in an identical or similar way (Balseiro et al., 2019; Dalto et al., 2012). Crohn's disease (CD) in humans is similar to JD and MAP can be identified in patients with this disease (MCNEES et al., 2015; SECHI; DOW, 2015; FAWZY et al., 2013). This possibility of the causal reaction of MAP and CD (Kuenstner et al., 2015), raises the losses caused directly and indirectly by the infection and dissemination of MAP by cattle, and consequent human infection (Pillai et al., 2015; Timms et al., 2016).

Paratuberculosis is gaining more attention worldwide (Kuenstner et al., 2017), due to direct economic losses (Raizman et al., 2009). Given the complexity of the disease, new studies show that more physiological parameters undergo changes, such as: drop in production (Bates et al., 2018; Raizman et al., 2009), decreased reproductive rates (Garcia-Ispierto & López-Gatius, 2016) and increased levels of mastitis (Rossi et al., 2017; Wilson et al., 1995). These factors cause immense economic losses (GARCIA; SHALLOO, 2015; BHATTARAI et al., 2013) .

Paratuberculosis is distributed worldwide, reported as present in Brazil (OIE, 2020), however, studies are scarce. It is evident the need for epidemiological surveys to complement the data obtained in the country so far. The State of Rio Grande do Sul (RS) is home to 1,554,909 (Aliança Láctea Sul Brasileira, 2020) lactating dairy cows belonging to commercial herds that sell milk to the industry. Thus, a disease with this magnitude of impacts should be further explored in commercial dairy farms and their control carried out.

The present study was carried out in five mesoregions in the State of RS, in which, previously, the clinical form of the disease in the southeastern and metropolitan mesoregions was reported (FISS et al., 2015; GOMES et al., 2002; DRIEMEIER et al., 1999) . However, thus far, there is no information on the epidemiological distribution of paratuberculosis in commercial herds without a history of the disease. Our objective was to verify if paratuberculosis is detected in commercial dairy herds in different mesoregions of RS and if the size of herds influences the detection of positive cows.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Study population, sample calculation and sampling

This research was authorized by the UPF Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA), registered under number 049/2019.

Milk samples were collected from lactating cows from commercial farms, which performed regular milk control at the Service of Analysis of Dairy Herds (SARLE) of the University of Passo Fundo, located in the North of the State of RS. The samples were processed, stored and a commercial ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) was performed to classify them as positive, suspicious or negative for paratuberculosis.

To perform the sample calculation, the national prevalence average was 36.8% and 40.45% in dairy cattle (Yamasaki et al., 2013). Thus, with the use of ELISA (sensitivity 85.3% specificity 95.8%), a margin of error of 5% and reliability of 95% are attributed.

Thus, the following formula was used for the sample calculation (Pfeiffer, 2010):

$$n = Z^2 \frac{P(1 - P)}{D^2}$$

where:

Z - Standard normal distribution value corresponding to the desired confidence level (Z = 2.56 for 99% confidence intervals). P - Expected prevalence. D - Maximum acceptable error in the estimate.

Using these data, a sample size of 357 animals to be collected is obtained. The collections were carried out from the mesoregions with the largest population of lactating dairy cows, combined with the sample collection of SARLE (Table 1).

The 362 samples collected from lactating cows are distributed in 68 dairy farms from five mesoregions of the State of RS (northwest, northeast, central-eastern, southeast, southwest).

For the central-eastern and southwest regions the necessary samples were not obtained. However, to compensate this sample number, the amount that was missing with the two regions with the largest herd of lactating cows in the state (northwest and northeast regions) was collected, thus obtaining a greater number of samples than estimated.

2.2 Sample collection and storage

Samples from commercial dairy herds that were sent to SARLE were subjected to a simple random draw. For the contemplated farms, another simple random drawing was carried out, to select 10 to 15% of the milk samples per herd. This process was carried out until the necessary sample quantity was obtained. No disease history information was provided.

These samples were sent in bottles containing preservative (bronopol), maintained at a temperature of 18 to 20°C until arrival at SARLE. Of these, 2 aliquots of 1 ml each were collected and stored in sterile plastic tubes of 2 ml. Immediately, centrifugation was carried out for 5 minutes at 2000 RPM. The obtained supernatant (fat) was discarded to facilitate the ELISA washing steps. Then, the samples were pipetted and stored in 1 mL sterile plastic tubes, followed by freezing at -20°C, remaining for a maximum of 15 days until testing. The aliquots were thawed at 4°C and subsequently maintained at 18°C to perform the ELISA test.

2.3 Sample processing for ELISA

A commercial indirect ELISA (IDEXX laboratories, Inc., Westbrook, USA) was performed, according to the manufacturer's guidelines, which included a pre-incubation step with *Mycobacterium phlei* to neutralize cross reactions (Selim et al., 2019).

In each ELISA test performed, double positive and negative controls were inserted, at the end of the processing, the optical density values were measured at 450 nm and recorded. The results interpreted as negative ($A / P\% \leq 20\%$), suspicious ($20\% < A / P\% < 30\%$) positive ($A / P\% \geq 30\%$). In this study, we classified samples that were suspicious or positive (that is, samples in which there was an immunological reaction to MAP) as seroreagent.

2.4 Statistical analysis

From the obtained variables (ELISA test), descriptive statistics was used to verify the frequency (absolute and relative) of positivity regarding the analyzed regions. Still, Pearson's correlation was used to verify the relationship between the size of the herd and the number of positive or suspect animals. For this, we used the program R, in which values ≤ 0.05 were considered significant results.

We developed a correlation analysis using the Pearson test. Results were evaluated and correlated with data on farm location, herd size and positive and suspicious cows on the ELISA test.

3. RESULTS

Of the 362 cows tested, 14 were classified as positive, six as suspicious and the other 342 as negative to the ELISA test (Table 2). Lactating cows from these sampled regions represent 5.52% of seroreactivity for paratuberculosis, of the total samples tested. The 14 positive and six suspicious cows are distributed in 13 municipalities in the northwest and northeast mesoregions (Table 3). The 362 samples come from 36 municipalities in RS, their distribution is shown on a map (Figure 1).

In the northwest mesoregion, of a total of 260 cows tested, 10 positive cows (3.84%) and four suspicions (1.53%) were obtained, these belong to nine herds of different properties. Within the herds that contained positive cows, it was estimated that 1.7% to 10% of the frequency with which the antibodies could be detected. Counting positive and suspicious cows, that is, seroreactive cows, we obtained a prevalence of 5.38% in this region.

In the northeast mesoregion, four positive cows (7.8%) and two suspicions (3.92%) were obtained, in three different properties. When counting only farms with positive cases, these were estimated between 2% to 10% of the frequency of detection of antibodies within the herd.

The cows from the other tested municipalities were negative to the ELISA test. Those municipalities in which no positive results occurred, include: Aceguá (southwest mesoregion); Turuçu and Pelotas (southeast mesoregion); Vacaria (northeast mesoregion); Rio Pardo, Sinimbu, Novo Cabrais, Santa Cruz do Sul and Estrela (central-eastern mesoregion); Ibirubá, Taquaruçu do Sul, Palmeira das Missões, Frederico Westphalen, Guarani das Missões, Esperança do Sul, Campina das Missões, Independence, Roque Gonzales, Pirapó, Porto Vera Cruz, Senador Salgado Filho, São Paulo das Missões, Nova Ramada, Ijuí, São Miguel das Missões, Vitória das Missões, Augusto Pestana, Jóia, Boa Vista do Cadeado, Novo Xingu and Rondinha (northwest mesoregion).

The correlation between the size of the herd and the number of positives was not significant ($r = -0,34$; $p = 0,51$) for the northeast mesoregion. However, for the northwestern mesoregion the correlation obtained between the size of the herd and the number of positives correlated positively ($r = 0,74$; $p < 0,001$). Thus, when correlating both mesoregions with positive cases (northwest and northeast) and positive cases with the size of the herd, we obtained a positive correlation ($r = 0,46$; $p < 0,001$).

We also correlated all positive and suspected cases of herds in the northwest and northeast mesoregions and obtained a positive correlation ($r = 0,55$; $p < 0,001$). In addition, a correlation was made between the size of herds (northwest and northeast) with suspected cases, and as a result a positive correlation ($r = 0,52$; $p < 0,001$).

4. DISCUSSION

The detection of paratuberculosis in relation to all tested samples represents 5.2% (20 seroreactive cows) of the total. In herds with only one suspect cow, it is very likely that there are more suspicious and / or positive cows. This is because we found a correlation in finding positive cows in herds of suspicious cows, as well as correlating the detection of suspicious cows in herds with positive cows.

We found that bovine paratuberculosis is detected in only two mesoregions in RS. Our initial hypothesis was that the disease would be present in all studied mesoregions. However, as the sample calculation was lower in the regions classified as negative, it is possible that this fact may have contributed to this result.

In addition, we obtained data regarding the number of lactating cows per herd, in which the differences between the mesoregions and the forms of epidemiological presentation were verified. The correlation made with the northeast mesoregion did not obtain significant results, although the sample number was statistically sufficient. In this region, herds were more heterogeneous and fewer herds were sampled, facts that contribute to the fact that the correlation between the sizes of herds and positive cows is not significant.

However, the northwestern mesoregion correlated significantly and positively. Thus, a correlation of the larger the herd is the greater the detection of antibodies against paratuberculosis. This information is similar to US herd data (Corbett et al., 2018), despite the fact that RS herds are mostly family owned and have fewer animals when compared to herds in the USA.

When assessing the correlation of both northwest and northeast mesoregions with the size of the herd and the number of positive cows, the correlation obtained is positive and significant. In this context, we obtained positive cows in herds smaller than 30 lactating cows, as well as in herds with more than 100 lactating cows. However, the positive correlation in detecting cows in larger herds is robust and expected to occur, especially with this disease.

These facts show that the size of the herd is not a primary factor for the detection of paratuberculosis in dairy cows, but a larger herd contributes to greater detection, as the sampling is performed by the population proportion of the herd. This information brings the importance of the present study, as it emphasizes the similarity with studies carried out in other countries (Lombard, 2011) and demonstrates parameters of the presentation of paratuberculosis (Selim et al., 2019).

The mesoregions that were negative in all tests were also those with a smaller sample size, due to the smaller herd of lactating cows. This lower sample number may have interfered with the negative result, highlighting the importance of further studies in these regions. Since, cases of clinical paratuberculosis were reported in a mesoregion classified as negative in our study, the southeastern mesoregion (Fiss et al., 2015) and the metropolitan (Driemeier et al., 1999) region not addressed in our study.

Detection of cows positive for paratuberculosis on the ELISA test ranged from 5.5 to 90.09% within herds, which makes the implementation of disease monitoring and screening by expansion tank samples reliable (Lavers et al., 2014). Expansion tank samples are very useful for checking the initial status of the disease on a large scale and subsequently testing all herds with positive / suspicious tank samples. In this way, it is possible to screen the entire commercial herd and evaluate the results to start a control program, developed specifically for the reality of the farms.

In the northwest and northeast mesoregions, seroreactivity of 5.38% and 11.76%, respectively, was obtained. Both regions combined result in 17.14% of seroreactive dairy cows, and in these regions cows over 36 months old comprise 552,078 heads. Thus, in absolute numbers, these regions should house a total of approximately 94,626 milking cows seroreactive to the ELISA test for paratuberculosis. These

numbers indicate a warning signal for local livestock, since this work is restricted only to dairy and lactating cows. In this sense, it is likely to rise in a percentage of positive animals, when testing all categories of dairy cattle in the state.

In 2019, a dairy herd of 1,135,498 cows produced 4.27 billion liters of milk in the year (EMATER, 2019). The 94,626 sero-reactive cows estimated in our study, represent 8.33% of the total lactating cows in the State. In this perspective, these percentages of seroreactive cows may be producing up to 12% less of their productive potential (Bates et al., 2018). This decrease in production results in an estimated loss of approximately 355 million liters / year. In addition to this amount of milk, 8.33% of the total produced, with the possibility of containing viable MAP, which can also be mixed with milks free of this pathogen, since there are no tests for this pathogen in the industry (MAPA, 2018).

5. CONCLUSION

Thus, paratuberculosis is likely to be endemic in the northwest and northeast mesoregions, but with a low incidence, which makes it attractive to implement a disease control program. The detection of MAP immunoglobulins in milk is a promising, safe and economical tool for screening and monitoring farms. The sample size per herd was not essential for the detection of positive cows for paratuberculosis, however herds with more cows are likely to be detected positively.

6. REFERENCES

- Ayele WY, Svastova P, Roubal P, Bartos M, Pavlik I. Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis cultured from locally and commercially pasteurized cow's milk in the Czech Republic. *Applied and environmental microbiology*. 2005;71(3):1210–4.
- Buergelt CD, Hall C, Mcentee K, Duncan JR. Pathological Evaluation of Paratuberculosis in Naturally Infected Cattle. *Veterinary Pathology*. 1978;15(2):196–207.
- Manning EJB, Collins MT. Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis: Pathogen, pathogenesis and diagnosis. *OIE Revue Scientifique et Technique*. 2001;20(1):133–50.
- Balseiro A, Perez V, Juste RA. Chronic regional intestinal inflammatory disease: A trans-species slow infection? *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 2019;62(December 2018):88–100.
- Dalto AC, Bandarra PM, Pavarini SP, Boabaid FM, de Bitencourt APG, Gomes MP, Chies J, Driemeier D, da Cruz CEF. Clinical and pathological insights into Johne's disease in buffaloes. *Tropical Animal Health and Production*. 2012;44(8):1899–904.
- Sechi LA, Dow CT. Mycobacterium avium ss. paratuberculosis Zoonosis – The Hundred Year War – Beyond Crohn's Disease. *Frontiers in Immunology*. 2015;6:96.

Fawzy A, Prince A, Hassan AA, Fayed A, Zschöck M, Naga M, Omar M, Salem M, El-Sayed A. Epidemiological studies on Johne's disease in ruminants and Crohn's disease in humans in Egypt. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*. 2013;1(2):79–86.

McNees AL, Markesich D, Zayyani NR, Graham DY. *Mycobacterium paratuberculosis* as a cause of crohn's disease. *Expert Review of Gastroenterology and Hepatology*. 2015;9(12):1523–34.

Kuenstner JT, Chamberlin W, Naser SA, Collins MT, Dow CT, Aitken JM, Weg S, Telega G, John K, Haas D, Eckstein TM, Kali M, Welch C, Petrie T. Resolution of Crohn's disease and complex regional pain syndrome following treatment of paratuberculosis. *World journal of gastroenterology*. 2015;21(13):4048–62.

Pillai N, Dusheiko M, Maillard MH, Rogler G, Brüngger B, Bähler C, Pittet VEH, Anderegg C, Bauerfeind P, Beglinger C, Bègré S, Belli D, Bengoa JM, Biedermann L, Bigler B, Binek J, Blattmann M, Boehm S, Borovicka J, Braegger CP, Brunner N, Bühr P, Burnand B, Burri E, Buyse S, Cremer M, Criblez DH, de Saussure P, Degen L, Delarive J, Doerig C, Dora B, Dorta G, Egger M, Ehmann T, El-Wafa A, Engelmann M, Ezri J, Felley C, Fliegner M, Fournier N, Fraga M, Frei P, Frei R, Fried M, Froehlich F, Funk C, Furlano RI, Gallot-Lavallée S, Geyer M, Girardin M, Golay D, Grandinetti T, Gysi B, Haack H, Haarer J, Helbling B, Hengstler P, Herzog D, Hess C, Heyland K, Hinterleitner T, Hiroz P, Hirschi C, Hruz P, Iwata R, Jost R, Juillerat P, Keller C, Knellwolf C, Knoblauch C, Köhler H, Koller R, Krieger-Grübel C, Ublick GK-, Künzler P, Landolt M, Lange R, Lehmann FS, Macpherson A, Maerten P, Maillard MH, Manser C, Manz M, Marbet U, Marx G, Matter C, Meier R, Mendanova M, Michetti P, Misselwitz B, Morell B, Mosler P, Mottet C, Müller C, Müller P, Müllhaupt B, Mürger-Beyeler C, Musso L, Nagy A, Neagu M, Nichita C, Niess J, Nydegger A, Obialo N, Oneta C, Oropesa C, Peter U, Peternac D, Petit LM, Gfeller FP-, Pilz JB, Pittet V, Raschle N, Rentsch R, Restellini S, Richterich J-P, Rihs S, Ritz MA, Roduit J, Rogler D, Rogler G, Rossel J-B, Rueger V, Saner G, Sauter B, Sawatzki M, Schäppi M, Scharl M, Scharl S, Schelling M, Schibli S, Schlauri H, Uebelhart SS, Schnegg J-F, Schoepfer A, Seibold F, Seirafi M, Semadeni G-M, Semela D, Senning A, Sidler M, Sokollik C, Spalinger J, Spangenberger H, Stadler P, Steuerwald M, Straumann A, Funk BS-, Sulz M, Suter A, Thorens J, Tiedemann S, Tutuian R, Vavricka S, Viani F, Vöggtlin J, Känel R Von, Vonlaufen A, Vouillamoz D, Vulliamy R, Wermuth J, Werner H, Wiesel P, Wiest R, Wylie T, Zeitz J, Zimmermann D. The Evolution of Health Care Utilisation and Costs for Inflammatory Bowel Disease Over Ten Years. *Journal of Crohn's and Colitis*. 2015;6(3):8.

Timms VJ, Daskalopoulos G, Mitchell HM, Neilan BA. The association of *mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with inflammatory bowel disease. *PLoS ONE*. 2016;11(2).

Kuenstner JT, Naser S, Chamberlin W, Borody T, Graham DY, McNees A, Hermon-Taylor J, Hermon-Taylor A, Dow CT, Thayer W, Biesecker J, Collins MT, Sechi LA, Singh SV, Zhang P, Shafran I, Weg S, Telega G, Rothstein R, Oken H, Schimpff S, Bach H, Bull T, Grant I, Ellingson J, Dahmen H, Lipton J, Gupta S, Chaubey K, Singh M, Agarwal P, Kumar A, Misri J, Sohal J, Dhama K, Hemati Z, Davis W, Hier M, Aitken J, Pierce E, Parrish N, Goldberg N, Kali M, Bendre S, Agrawal G, Baldassano R, Linn P, Sweeney RW, Fecteau M, Hofstaedter C, Potula R, Timofeeva O, Geier S, John K, Zayanni N, Malaty HM, Kahlenborn C, Kravitz A, Bulfon A, Daskalopoulos G, Mitchell H, Neilan B, Timms V, Cossu D, Mameli G, Angermeier P, Jelic T, Goethe

- R, Juste RA, Kuenstner L. The Consensus from the Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis (MAP) Conference 2017. *Frontiers in Public Health*. 2017;5(September):1–5.
- Raizman EA, Fetrow JP, Wells SJ. Loss of income from cows shedding Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis prior to calving compared with cows not shedding the organism on two Minnesota dairy farms. *Journal of Dairy Science*. 2009;92(10):4929–36.
- Bates A, O'Brien R, Liggett S, Griffin F. The effect of sub-clinical infection with Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis on milk production in a New Zealand dairy herd. *BMC Veterinary Research*. 2018;14(1):1–11.
- Garcia-Ispierto I, López-Gatius F. Early Foetal Loss Correlates Positively with Seroconversion against Mycobacterium avium paratuberculosis in High-Producing Dairy Cows. *Reproduction in Domestic Animals*. 2016;51(2):227–31.
- Rossi G, Grohn YT, Schukken YH, Smith RL. The effect of Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis infection on clinical mastitis occurrence in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 2017;100(9):7446–54.
- Wilson DJ, Rossiter C, Han HR, Sears PM. Financial Effects of Mycobacterium-Paratuberculosis On Mastitis, Milk-Production, and Cull Rate in Clinically Normal Cows. *Agri-Practice*. 1995;16(3).
- Garcia AB, Shalloo L. Invited review: The economic impact and control of paratuberculosis in cattle. *Journal of Dairy Science*. 2015;98(8):5019–39.
- Bhattarai B, Fosgate GT, Osterstock JB, Fossler CP, Park SC, Roussel AJ. Comparison of calf weaning weight and associated economic variables between beef cows with and without serum antibodies against or isolation from feces of Mycobacterium avium subsp paratuberculosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2013;243(11):1609–15.
- OIE. Paratuberculosis: OIE - Office International des Epizooties. Office International des Epizooties. 2020. p. 2.
- PFEIFFER, D., 2010. *Veterinary epidemiology: an introduction*. John Wiley & Sons, London, UK, p. 97-101.
- Aliança Láctea Sul Brasileira. *Dados da Região: Rio Grande do Sul*. 2020. p. 1–1.
- Fiss L, Lemos Santos B, Paulo Feitosa de Albuquerque P, Aparecido Mota R, Marcolongo-Pereira C, de Lourdes Adrien M, Soares MP, Lucia Schild A. Paratuberculose em bovinos de corte na região sul do Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2015;35:437–42.
- Driemeier D, Farias Cruz CE, Pereira Gomes MJ, Corbellini LG, Loretto AP, Colodel EM. Aspectos clínicos e patológicos da paratuberculose em bovinos no Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 1999;19(3–4):109–15.

Gomes MJP, Driemeier D, Rezende Ribeiro V, WunderJR EA, Asanome W, Frederick Lanzon L, Wald VB. DOENÇA DE JOHNE : ISOLAMENTO DO *Mycobacterium avium* SUBSP . *paratuberculosis* (Map) EM UM REBANHO LEITEIRO INFECTADO NA REGIÃO SUL DO BRASIL *. *Acta Scientiae Veterinariae*. 2002;30(2):113-8.

Yamasaki EM, Brito MF, Mota RA, Mcintosh D, Tokarnia CH. Paratuberculose em ruminantes no brasil. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*. 2013;33(2):127-40.

Selim A, Ali A-F, Ramadan E. Prevalence and molecular epidemiology of Johne's disease in Egyptian cattle. *Acta Tropica*. 2019;195:1-5.

Corbett CS, Naqvi SA, Bauman CA, De Buck J, Orsel K, Uehlinger F, Kelton DF, Barkema HW. Prevalence of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infections in Canadian dairy herds. *Journal of Dairy Science*. 2018;101(12):11218-28.

Lombard JE. Epidemiology and Economics of Paratuberculosis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 2011;27(3):525-35.

Lavers CJ, Barkema HW, Dohoo IR, McKenna SLB, Keefe GP. Evaluation of milk ELISA for detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy herds and association with within-herd prevalence. *Journal of Dairy Science*. 2014;97(1):299-309.

EMATER. RELATÓRIO SOCIOECONÔMICO DA CADEIA PRODUTIVA DO LEITE NO RIO GRANDE DO SUL. Porto Alegre; 2019 Nov.

MAPA. INSTRUÇÃO NORMATIVA No 77, DE 26 DE NOVEMBRO DE 2018 - Imprensa Nacional. 2018. p. 1-12.

Table 1. Relationship of the stratification of the number to be collected, carried out from the mesoregions and their lactating cows herd, according to available data (Aliança Láctea Sul Brasileira, 2020).

Mesoregion	Number of cattle	% of total	Projection	Collected
Northwest	923,459	67.2	239	260
Northeast	163,279	11.89	43	51
Central-eastern	136,485	9.94	36	20
Southwest	78,271	5.7	21	11
Southeast	71,44	5.3	19	20
Total	1,372,934	100	357	362

Table 2. Detection of paratuberculosis in the different mesoregions of RS.

MESOREGIONS	NUMBER OF TESTED COWS	POSITIVE	SUSPICIOUS	SERO-REAGENTS%*
NORTHWEST	260	10(3.84%)	4(1.53%)	14(5.38%)
NORTHEAST	51	4(7.8%)	2(3.92%)	6(11.76%)
SOUTHEAST	20	0	0	0
CENTRAL-EASTERN	15	0	0	0
SOUTHWEST	11	0	0	0
TOTAL**	362	14(3.92%)	6(1.68%)	20(5.6%)

* Sero-reagents comprise animals that in the analyzed sample obtained antibodies classified as suspect or positive.

** Calculations expressed in this line were performed with the totality of tested samples.

Table 3. Municipalities in which cows with paratuberculosis were detected, the respective amounts of positives, suspects, negatives and sero-reagents and their distributions within the sampled herd.

MUNICIPALITIES	REGION	POSIT	SUSP	NEGAT	% SERO- REAGENTS	LACTATING COWS/HERD
ÁGUA SANTA	NORTHWEST	1	0	17	5.5	120
ÁGUA SANTA	NORTHWEST	1	0	3	25	29
BOZANO	NORTHWEST	1	0	5	16.6	40
IBIRAIARAS	NORTHWEST	0	1	2	33.3	30
IJUI	NORTHWEST	1	0	3	25	30
NOVO BARREIRO	NORTHWEST	1	0	2	33.3	25
MARIANO MORO	NORTHWEST	0	1	19	5.26	135
MARIANO MORO	NORTHWEST	1	0	0	90.09	11
PASSO FUNDO	NORTHWEST	3	2	20	20	196
RONDA ALTA	NORTHWEST	1	0	6	14.28	47
NOVA PRATA	NORTHEAST	1	1	2	50	32
SÃO JORGE	NORTHEAST	1	1	14	12.5	110
SERAFINA CORREA	NORTHEAST	2	0	2	50	33
					5.26% -	
TOTAL	11	2	14	6	95	838
					90.09%	

Sero-reagents comprise animals that in the analyzed sample obtained antibodies classified as suspect or positive

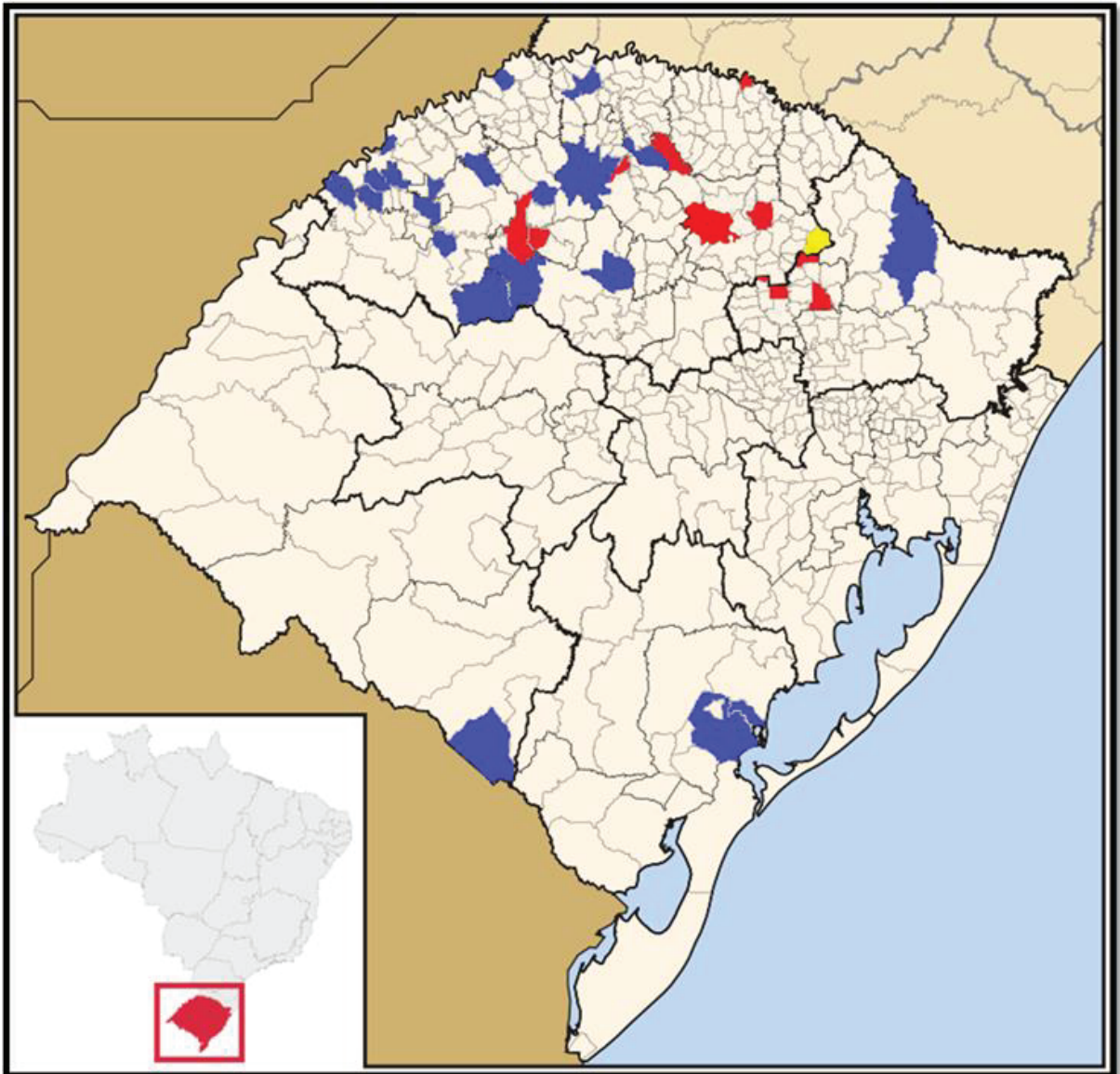


Figure 1. Detail in the lower left corner highlighting the location of Rio Grande do Sul (RS) in Brazil. Enlarged map, State of RS where the location of the municipalities where milk samples were obtained is highlighted. Municipalities are classified as negative (blue), suspicious (yellow) and positive (red). In places with suspicious and positive cows, a positive denomination on the map prevails (red color).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O artigo apresentado no capítulo 1 é parte de um macroprojeto em fase inicial, o qual tem por objetivo gerar conhecimento sobre a paratuberculose bovina tanto em nível regional como nacional e internacional. Nesse sentido, os resultados aqui demonstrados fornecem valiosas informações e, ainda, podem ser úteis internacionalmente.

Dessa forma, temos informações sobre a enfermidade de maneira mais ampla e um retrato fidedigno da realidade da pecuária leiteira do Estado. Espera-se que com essas informações, programas de controle possam ser iniciados, tanto por meio de testes de tanque de expansão como testes individuais por animais. A metodologia aqui empregada, utilizando amostras de leite, demonstra o quanto pode ser agregado valor as amostras de rotina das propriedades, além de facilitar as coletas e acelerar o processo de controle da paratuberculose nos rebanhos.

O fato de não testar e não diagnosticar doenças de rebanho, com receio de obter resultados positivos, não faz com que as doenças deixem de existir, apenas conforta os olhos de quem vê e subtrai das quantias que não as contabiliza.

5. REFERÊNCIAS

1. Kuenstner JT, Naser S, Chamberlin W, Borody T, Graham DY, McNees A, et al. The Consensus from the Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis (MAP) Conference 2017. *Frontiers in Public Health*. 2017;5(September):1–5.
2. Streeter RN, Hoffsis GF, Bech-Nielsen S, Shulaw WP, Rings DM. Isolation of Mycobacterium paratuberculosis from colostrum and milk of subclinically infected cows. *American journal of veterinary research* [Internet]. 1995 Oct [cited 2019 Mar 27];56(10):1322–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8928949>
3. Johnson-Ifearulundu Y., Kaneene J., Sprecher D., Gardiner J., Lloyd J. The effect of subclinical Mycobacterium paratuberculosis infection on days open in Michigan, USA, dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine* [Internet]. Elsevier; 2000 Aug 10 [cited 2019 Mar 29];46(3):171–81. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167587700001458>
4. Klinkenberg D, Koets A. The long subclinical phase of Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis infections explained without adaptive immunity. *Veterinary Research* [Internet]. BioMed Central; 2015 Dec 19 [cited 2019 Mar 25];46(1):63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26092036>
5. McNees AL, Markesich D, Zayyani NR, Graham DY. Mycobacterium paratuberculosis as a cause of crohn’s disease. *Expert Review of Gastroenterology and Hepatology*. 2015;9(12):1523–34.
6. Lombard JE, Gardner IA, Jafarzadeh SR, Fossler CP, Harris B, Capsel RT, et al. Herd-level prevalence of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection in United States dairy herds in 2007. *Preventive Veterinary Medicine* [Internet]. Elsevier; 2013 Feb 1 [cited 2019 Mar 24];108(2–3):234–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016758771200267X?via%3Dihub>
7. Whittington RJ, Windsor PA. In utero infection of cattle with Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis: A critical review and meta-analysis. *The Veterinary Journal* [Internet]. W.B. Saunders; 2009 Jan 1 [cited 2019 Mar 29];179(1):60–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023307003061>
8. Gomes MJP, Driemeier D, Rezende Ribeiro V, WunderJR EA, Asanome W, Frederick Lanzon L, et al. DOENÇA DE JOHNE : ISOLAMENTO DO Mycobacterium avium SUBSP . paratuberculosis (Map) EM UM REBANHO LEITEIRO INFECTADO NA REGIÃO SUL DO BRASIL *. *Acta Scientiae Veterinariae*. 2002;30(2):113–8.
9. Driemeier D, Farias Cruz CE, Pereira Gomes MJ, Corbellini LG, Loretto AP, Colodel EM. Aspectos clínicos e patológicos da paratuberculose em bovinos no Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*. 1999;19(3–4):109–15.
10. Yamasaki EM, Brito M de F, McIntosh D, Galvão A, Peixoto TC, Tokarnia CH. Diagnóstico imuno-histopatológico da paratuberculose subclínica em bovinos no estado do Rio de Janeiro. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*. 2013;33(12):1427–32.
11. Khare S, NUNES J F, D FS, A. LC, T. R, T G, et al. Early Phase Morphological Lesions and Transcriptional Responses of Bovine Ileum Infected with Mycobacterium

- avium subsp . paratuberculosis. *Veterinary Pathology* [Internet]. 2009;728:717–28. Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1354/vp.08-VP-0187-G-FL>
12. Buergelt CD, Hall C, Mcentee K, Duncan JR. Pathological Evaluation of Paratuberculosis in Naturally Infected Cattle. *Veterinary Pathology*. 1978;15(2):196–207.
 13. YAMASAKI EM, BRITO MF, MOTA RA, MCINTOSH D, TOKARNIA CH. Paratuberculose em ruminantes no brasil. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*. 2013;33(2):127–40.
 14. Sechi LA, Dow CT. *Mycobacterium avium* ss. paratuberculosis Zoonosis – The Hundred Year War – Beyond Crohn’s Disease. *Frontiers in Immunology* [Internet]. *Frontiers*; 2015 Mar 4 [cited 2019 Apr 22];6:96. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fimmu.2015.00096/abstract>
 15. Lavers CJ, Barkema HW, Dohoo IR, McKenna SLB, Keefe GP. Evaluation of milk ELISA fordetection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis indairy herds and association with within-herd prevalence. *Journal of Dairy Science* [Internet]. Elsevier; 2014 Jan 1 [cited 2020 Feb 13];97(1):299–309. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030213007789?via%3Dihub#ib0060>
 16. Sergeant ESG, McAloon CG, Tratalos JA, Citer LR, Graham DA, More SJ. Evaluation of national surveillance methods for detection of Irish dairy herds infected with *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis. *Journal of Dairy Science* [Internet]. American Dairy Science Association; 2019;102(3):2525–38. Available from: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2018-15696>
 17. Beaver A, Sweeney RW, Hovingh E, Wolfgang DR, Gröhn YT, Schukken YH. Longitudinal relationship between fecal culture, fecal quantitative PCR, and milk ELISA in *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis-infected cows from low-prevalence dairy herds. *Journal of Dairy Science*. Elsevier Inc.; 2017 Sep 1;100(9):7507–21.
 18. Prendergast DM, Pearce RA, Yearsley D, Ramovic E, Egan J. Evaluation of three commercial PCR kits for the direct detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis (MAP) in bovine faeces. *Veterinary Journal* [Internet]. Elsevier Ltd.; 2018;241(June 2017):52–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2018.09.013>
 19. OIE. Paratuberculosis: OIE - Office International des Epizooties [Internet]. Office International des Epizooties. 2020. p. 2. Available from: <https://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/animal-diseases/Paratuberculosis/>
 20. Barkema HW, Orsel K, Nielsen SS, Koets AP, Rutten VPMG, Bannantine JP, et al. Knowledge gaps that hamper prevention and control of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infection. *Transboundary and Emerging Diseases* [Internet]. Blackwell Publishing Ltd; 2018 May 1 [cited 2020 Jun 27];65:125–48. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/tbed.12723>
 21. Rodrigues ABF, Ristow P, Santos ASO, Lilenbaum W, Fonseca LS, Carvalho CB, et al. Hepatite granulomatosa em bovino causada por *Mycobacterium avium* subsp.

- paratuberculosis. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*. 2010;62(6):1495–8.
22. Carvalho IA, Pietralonga PAG, Schwarz DGG, Faria ACS, Moreira MAS. Short communication: Recovery of viable *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis from retail pasteurized whole milk in Brazil. *Journal of Dairy Science*. 2012;
 23. Botsaris G, Swift BMC, Slana I, Liapi M, Christodoulou M, Hatzitofi M, et al. Detection of viable *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in powdered infant formula by phage-PCR and confirmed by culture. *International Journal of Food Microbiology* [Internet]. Elsevier; 2016 Jan 4 [cited 2019 May 20];216:91–4. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160515301240?via%3Dihub>
 24. Waddell L, Rajić A, Stärk K, McEwen SA. *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis detection in animals, food, water and other sources or vehicles of human exposure: A scoping review of the existing evidence. *Preventive Veterinary Medicine*. 2016;132:32–48.
 25. Fiss L, Lemos Santos B, Paulo Feitosa de Albuquerque P, Aparecido Mota R, Marcolongo-Pereira C, de Lourdes Adrien M, et al. Paratuberculose em bovinos de corte na região sul do Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira* [Internet]. 2015 [cited 2019 Mar 29];35:437–42. Available from: http://www.pvb.com.br/pdf_artigos/27-06-2015_13-28Vet 1899_4102d LD.pdf
 26. Gomes Marcos J.P. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA PARATUBERCULOSE BOVINA NO RIO GRANDE DO SUL [Internet]. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 2002 [cited 2019 Apr 22]. Available from: <https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/3448/000388394.pdf?sequence=1&isAllo wed=y>
 27. Lambrecht RS, Carriere JF, Collins MT. A model for analyzing growth kinetics of a slowly growing *Mycobacterium* sp. *Applied and environmental microbiology* [Internet]. American Society for Microbiology (ASM); 1988 Apr [cited 2019 Mar 26];54(4):910–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3377502>
 28. NIELSEN SS, ERSBOLL AK. Age at Occurrence of *Mycobacterium avium* Subspecies paratuberculosis in Naturally Infected Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* [Internet]. Elsevier; 2010;89(12):4557–66. Available from: [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72505-X](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72505-X)
 29. Windsor PA. Paratuberculosis in sheep and goats. *Veterinary Microbiology*. Elsevier; 2015 Dec 14;181(1–2):161–9.
 30. Medeiros JMA, Junior FG, Almeida AP, Lucena EA, Riet-Correa F. Paratuberculose em caprinos e ovinos no Estado da Paraíba. *Pesquisa Veterinaria Brasileira* [Internet]. Colégio Brasileiro de Patologia Animal; 2012 [cited 2020 Jun 28];32(2):111–5. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2012000200003&lng=en&nrm=iso&tlng=pt
 31. Dalto AC, Bandarra PM, Pavarini SP, Boabaid FM, de Bitencourt APG, Gomes MP, et al. Clinical and pathological insights into Johne’s disease in buffaloes. *Tropical Animal*

- Health and Production. 2012;44(8):1899–904.
32. Greig A, Stevenson K, Perez V, Pirie AA, Grant JM, Sharp JM. Paratuberculosis in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). The Veterinary record [Internet]. British Medical Journal Publishing Group; 1997 Feb 8 [cited 2019 Mar 25];140(6):141–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9050174>
 33. Beard PM, Daniels MJ, Henderson D, Pirie A, Rudge K, Buxton D, et al. Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland. Journal of Clinical Microbiology. 2001;39(4):1517–21.
 34. Bessi R, Pauletti P, Dantas R, Neto RM. Antibodies Absorption in Calves . II . Distal Small Intestine Study. Revista Brasileira de Zootecnia. 2002;31(6):2325–31.
 35. Ferwerda G, Kullberg BJ, de Jong DJ, Girardin SE, Langenberg DML, van Crevel R, et al. Mycobacterium paratuberculosis is recognized by Toll-like receptors and NOD2. Journal of Leukocyte Biology. 2007;82(4):1011–8.
 36. Momotani E, Whipple DL, Thiermann AB, Cheville NF. Role of M Cells and Macrophages in the Entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into Domes of Ileal Peyer’s Patches in Calves. Veterinary Pathology [Internet]. SAGE PublicationsSage CA: Los Angeles, CA; 1988 Mar 26 [cited 2019 Mar 25];25(2):131–7. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/030098588802500205>
 37. Aderem A, Underhill DM. MECHANISMS OF PHAGOCYTOSIS IN MACROPHAGES. Annual Review of Immunology [Internet]. 1999 Apr [cited 2019 Mar 20];17(1):593–623. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.17.1.593>
 38. Arsenault RJ, Maattanen P, Daigle J, Potter A, Griebel P, Napper S. From mouth to macrophage: Mechanisms of innate immune subversion by *Mycobacterium avium* subsp. Paratuberculosis. Veterinary Research. 2014;45(1):1–15.
 39. Sajiki Y, Konnai S, Okagawa T, Nishimori A, Maekawa N, Goto S, et al. Prostaglandin E2 induction suppresses the Th1 immune responses in cattle with Johne’s disease. Infection and Immunity. 2018;86(5):1–15.
 40. Arsenault RJ, Li Y, Bell K, Doig K, Potter A, Griebel PJ, et al. Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis inhibits gamma interferon-induced signaling in bovine monocytes: Insights into the cellular mechanisms of Johne’s disease. Infection and Immunity [Internet]. Infect Immun; 2012 Sep [cited 2020 Jun 28];80(9):3039–48. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22689821/>
 41. Gasteiner J, Awad-Masalmeh M, Baumgartner W. Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection in cattle in Austria, diagnosis with culture, PCR and ELISA. Veterinary Microbiology. Elsevier; 2000 Dec 20;77(3–4):339–49.
 42. Tanaka S, Sato M, Onitsuka T, Kamata H, Yokomizo Y. Inflammatory cytokine gene expression in different types of granulomatous lesions during asymptomatic stages of bovine paratuberculosis. Veterinary Pathology. 2005;42(5):579–88.
 43. Andreazza D, Boos GS, Boabaid FM, Wouters ATB, Wouters F, Souza SO, et al. Caracterização histológica e imuno-histoquímica das lesões de tuberculose em bovinos

- e de linfadenite granulomatosa em suínos. Pesquisa Veterinária Brasileira [Internet]. Colégio Brasileiro de Patologia Animal; 2015 Feb [cited 2019 May 6];35(2):129–36. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2015000200129&lng=pt&tlng=pt
44. Manning EJB, Collins MT. Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis: Pathogen, pathogenesis and diagnosis. OIE Revue Scientifique et Technique. 2001;20(1):133–50.
 45. Fecteau ME. Paratuberculosis in Cattle. Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice [Internet]. Elsevier Inc; 2018;34(1):209–22. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2017.10.011>
 46. Corbett CS, Naqvi SA, Bauman CA, De Buck J, Orsel K, Uehlinger F, et al. Prevalence of Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis infections in Canadian dairy herds. Journal of Dairy Science [Internet]. Elsevier; 2018 Dec 1 [cited 2019 Dec 12];101(12):11218–28. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030218309500?via%3Dihub>
 47. de Albuquerque PPF, de Melo RPB, de Farias Brito M, Bovino F, de Souza MA, Lima AMC, et al. First molecular epidemiological study of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in cattle and buffalo from different regions of Brazil. Tropical Animal Health and Production. Tropical Animal Health and Production; 2018;50(8):1929–35.
 48. Begg DJ, Plain KM, de Silva K, Gurung R, Gunn A, Purdie AC, et al. Immunopathological changes and apparent recovery from infection revealed in cattle in an experimental model of Johne’s disease using a lyophilised culture of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis. Veterinary Microbiology [Internet]. Elsevier; 2018;219(3):53–62. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.03.029>
 49. Vazquez P, Garrido JM, Molina E, Geijo M V., Gomez N, Perez V, et al. Latent infections are the most frequent form of paratuberculosis in slaughtered friesland cattle. Spanish Journal of Agricultural Research. 2014;12(4):1049–60.
 50. Kennedy AE, Da Silva AT, Byrne N, Govender R, MacSharry J, O’Mahony J, et al. The Single Intradermal Cervical Comparative Test Interferes with Johne’s Disease ELISA Diagnostics. Frontiers in Immunology [Internet]. Frontiers; 2014 Nov 12 [cited 2019 Apr 10];5:564. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2014.00564/abstract>
 51. Sergeant ESG, McAloon CG, Tratalos JA, Citer LR, Graham DA, More SJ. Evaluation of national surveillance methods for detection of Irish dairy herds infected with Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis. Journal of Dairy Science [Internet]. Elsevier; 2019 Mar 1 [cited 2019 Apr 6];102(3):2525–38. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030219300906?dgcid=raven_sd_recommender_email
 52. Fecteau M-E. Paratuberculosis in Cattle. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice [Internet]. Elsevier; 2018 Mar 1 [cited 2019 Mar 20];34(1):209–22. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0749072017300919?via%3Dihub#ib51>

53. Wadhwa A, Foote RS, Shaw RW, Eda S. Bead-based microfluidic immunoassay for diagnosis of Johne's disease. *Journal of Immunological Methods* [Internet]. Elsevier; 2012 Aug 31 [cited 2019 Apr 22];382(1–2):196–202. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022175912001676?via%3Dihub>
54. Schillinger S, Bridger PS, Bulun H, Fischer M, Akineden O, Seeger T, et al. Flow cytometric detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-specific antibodies in experimentally infected and naturally exposed calves. *Clinical and vaccine immunology : CVI* [Internet]. American Society for Microbiology (ASM); 2013 Sep [cited 2019 Mar 25];20(9):1457–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23885032>
55. Mortier RAR, Barkema HW, Wilson TA, Sajobi TT, Wolf R, De Buck J. Dose-dependent interferon-gamma release in dairy calves experimentally infected with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* [Internet]. Elsevier; 2014 Oct 15 [cited 2019 Apr 22];161(3–4):205–10. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165242714001809?via%3Dihub>
56. Saktiawati AMI, Harkema M, Setyawan A, Subronto YW, Sumardi, Stienstra Y, et al. Optimal Sampling Strategies for Therapeutic Drug Monitoring of First-Line Tuberculosis Drugs in Patients with Tuberculosis. *Clinical Pharmacokinetics* [Internet]. 2019 Apr 17 [cited 2019 Apr 22];1(1):1–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30997650>
57. Kuenstner JT, Chamberlin W, Naser SA, Collins MT, Dow CT, Aitken JM, et al. Resolution of Crohn's disease and complex regional pain syndrome following treatment of paratuberculosis. *World journal of gastroenterology* [Internet]. Baishideng Publishing Group Inc; 2015 Apr 7 [cited 2019 Apr 22];21(13):4048–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25852293>
58. Schön T, Miotto P, Köser CU, Viveiros M, Böttger E, Cambau E. *Mycobacterium tuberculosis* drug-resistance testing: challenges, recent developments and perspectives [Internet]. Vol. 23, *Clinical Microbiology and Infection*. Elsevier B.V.; 2017 [cited 2020 Jul 1]. p. 154–60. Available from: <http://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198743X16305110/fulltext>
59. Hervé C, Bergot E, Veziris N, Blanc FX. Tuberculosis in 2015: From diagnosis to the detection of multiresistant cases [Internet]. Vol. 32, *Revue des Maladies Respiratoires*. Elsevier Masson SAS; 2015 [cited 2020 Jul 1]. p. 784–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26169235/>
60. Fecteau M-E, Whitlock RH. Treatment and Chemoprophylaxis for Paratuberculosis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* [Internet]. Elsevier Inc.; 2011;27(3):547–57. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cvfa.2011.07.002>
61. St-Jean G, Jernigan AD. Treatment of *Mycobacterium Paratuberculosis* Infection in Ruminants. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* [Internet]. Elsevier; 1991 Nov 1 [cited 2019 Apr 22];7(3):793–804. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0749072015310859>
62. McAloon CG, Roche S, Ritter C, Barkema HW, Whyte P, More SJ, et al. A review of

- paratuberculosis in dairy herds — Part 2: On-farm control. *Veterinary Journal* [Internet]. Elsevier Ltd.; 2019;246:54–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2019.01.009>
63. Lu Z, Mitchell RM, Smith RL, Van Kessel JS, Chapagain PP, Schukken YH, et al. The importance of culling in Johne's disease control. *Journal of Theoretical Biology* [Internet]. Academic Press; 2008 Sep 7 [cited 2020 Feb 13];254(1):135–46. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022519308002427?via%3Dihub>
 64. Kalis CHJ, Collins MT, Hesselink JW, Barkema HW. 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* [Internet]. Elsevier; 2003 Dec 2 [cited 2019 Nov 27];97(1–2):73–86. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113503002426?via%3Dihub>
 65. Mortier RAR, Barkema HW, Wilson TA, Sajobi TT, Wolf R, De Buck J. Dose-dependent interferon-gamma release in dairy calves experimentally infected with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* [Internet]. Elsevier B.V.; 2014;161(3–4):205–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.08.007>
 66. Marcé C, Ezanno P, Weber MF, Seegers H, Pfeiffer DU, Fourichon C. Invited review: Modeling within-herd transmission of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in dairy cattle: A review. *Journal of Dairy Science* [Internet]. Elsevier; 2010 Oct 1 [cited 2020 Feb 27];93(10):4455–70. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030210961249?via%3Dihub>
 67. Britton LE, Cassidy JP, O'Donovan J, Gordon S V., Markey B. Potential application of emerging diagnostic techniques to the diagnosis of bovine Johne's disease (paratuberculosis). *The Veterinary Journal* [Internet]. W.B. Saunders; 2016 Mar 1 [cited 2019 Apr 10];209:32–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023315004426#bib0520>
 68. McAloon CG, Doherty ML, Whyte P, O'Grady L, More SJ, Messam LLM, et al. Bayesian estimation of prevalence of paratuberculosis in dairy herds enrolled in a voluntary Johne's Disease Control Programme in Ireland. *Preventive Veterinary Medicine* [Internet]. Elsevier; 2016 Jun 1 [cited 2020 Feb 13];128:95–100. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167587716301295?via%3Dihub>
 69. Richter V, Lebl K, Baumgartner W, Obritzhauser W, Käsbohrer A, Pinior B. A systematic worldwide review of the direct monetary losses in cattle due to bovine viral diarrhoea virus infection. *The Veterinary Journal* [Internet]. W.B. Saunders; 2017 Feb 1 [cited 2020 Apr 16];220:80–7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023317300102?via%3Dihub#S0040>
 70. Garcia AB, Shalloo L. Invited review: The economic impact and control of paratuberculosis in cattle. *Journal of Dairy Science* [Internet]. Elsevier; 2015;98(8):5019–39. Available from: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-9241>

71. MAPA. Projeto Pecuária ABC — Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento [Internet]. www.agricultura.gov.br. 2017 [cited 2019 Mar 29]. p. 1. Available from: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/plano-abc/projeto-pecuaria-abc/projeto-pecuaria-abc-1>
72. Kudahl AB, Nielsen SS. Effect of paratuberculosis on slaughter weight and slaughter value of dairy cows. *Journal of Dairy Science* [Internet]. Elsevier; 2009 Sep 1 [cited 2019 Apr 22];92(9):4340–6. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002203020970757X>
73. McAloon CG, Whyte P, More SJ, Green MJ, O’Grady L, Garcia A, et al. The effect of paratuberculosis on milk yield—A systematic review and meta-analysis. *Journal of Dairy Science* [Internet]. Elsevier; 2016 Feb 1 [cited 2019 Apr 22];99(2):1449–60. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030215008978#bib0275>
74. Bates A, O’Brien R, Liggett S, Griffin F. The effect of sub-clinical infection with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis on milk production in a New Zealand dairy herd. *BMC Veterinary Research*. BMC Veterinary Research; 2018;14(1):1–11.
75. Rossi G, Grohn YT, Schukken YH, Smith RL. The effect of *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis infection on clinical mastitis occurrence in dairy cows. *Journal of Dairy Science* [Internet]. American Dairy Science Association; 2017;100(9):7446–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2017-12721>
76. Wilson DJ, Rossiter C, Han HR, Sears PM. Financial Effects of *Mycobacterium-Paratuberculosis* On Mastitis, Milk-Production, and Cull Rate in Clinically Normal Cows. *Agri-Practice*. 1995;16(3).
77. Devitt C, Graham DA, O’Flaherty J, Strain S, Citer L. Veterinary experiences of a Johne’s disease control programme in Ireland. *Veterinary Record*. 2018;183(6):193–193.
78. McAloon CG, Roche S, Ritter C, Barkema HW, Whyte P, More SJ, et al. A review of paratuberculosis in dairy herds — Part 1: Epidemiology. *The Veterinary Journal* [Internet]. W.B. Saunders; 2019 Apr 1 [cited 2019 Mar 25];246:59–65. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023319300061#bib0025>
79. Fawzy A, Prince A, Hassan AA, Fayed A, Zschöck M, Naga M, et al. Epidemiological studies on Johne’s disease in ruminants and Crohn’s disease in humans in Egypt. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*. 2013;1(2):79–86.
80. Pillai N, Dusheiko M, Maillard MH, Rogler G, Brüngger B, Bähler C, et al. The Evolution of Health Care Utilisation and Costs for Inflammatory Bowel Disease Over Ten Years. *Journal of Crohn’s and Colitis* [Internet]. 2015 Mar 27 [cited 2019 Apr 22];6(3):8. Available from: <https://academic.oup.com/ecco-jcc/advance-article/doi/10.1093/ecco-jcc/jjz003/5420756>
81. Dow CT, Ellingson JLE. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. Paratuberculosis in Blau Syndrome Tissues. *Autoimmune diseases* [Internet]. Hindawi; 2010 Jun 20 [cited 2019 Apr 22];2011(5):5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21152214>

82. BG C. Case Study: Cardiac Sarcoidosis Resolved With Mycobacterium Avium Paratuberculosis Antibiotics (MAP). *Sarcoidosis, vasculitis, and diffuse lung diseases : official journal of WASOG* [Internet]. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*; 2018 [cited 2020 Jun 28];35(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32476899/>
83. Shariati SH, Alaei A, Keshavarz R, Mosavar N, Rabbani A, Niegowska M, et al. Detection of Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis in Iranian patients with type 1 diabetes mellitus by PCR and ELISA. *Journal of Infection in Developing Countries* [Internet]. *Journal of Infection in Developing Countries*; 2016 Aug 1 [cited 2020 Jun 28];10(8):857–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27580332/>
84. Niegowska M, Paccagnini D, Burrai C, Palermo M, Sechi LA. Antibodies against proinsulin and homologous MAP epitopes are detectable in hashimoto's thyroiditis sardinian patients, an additional link of association. *PLoS ONE* [Internet]. *Public Library of Science*; 2015 Jul 20 [cited 2020 Jun 28];10(7). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26192189/>
85. Ayele WY, Svastova P, Roubal P, Bartos M, Pavlik I. Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis cultured from locally and commercially pasteurized cow's milk in the Czech Republic. *Applied and environmental microbiology* [Internet]. *American Society for Microbiology*; 2005 Mar 1 [cited 2019 Apr 1];71(3):1210–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15746320>
86. Balseiro A, Perez V, Juste RA. Chronic regional intestinal inflammatory disease: A trans-species slow infection? *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* [Internet]. *Elsevier*; 2019;62(December 2018):88–100. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2018.12.001>
87. Timms VJ, Daskalopoulos G, Mitchell HM, Neilan BA. The association of mycobacterium avium subsp. paratuberculosis with inflammatory bowel disease. *PLoS ONE*. *Public Library of Science*; 2016 Feb 1;11(2).
88. Raizman EA, Fetrow JP, Wells SJ. Loss of income from cows shedding Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis prior to calving compared with cows not shedding the organism on two Minnesota dairy farms. *Journal of Dairy Science* [Internet]. *Elsevier*; 2009 Oct 1 [cited 2020 Apr 6];92(10):4929–36. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030209708239>
89. Garcia-Ispuerto I, López-Gatius F. Early Foetal Loss Correlates Positively with Seroconversion against Mycobacterium avium paratuberculosis in High-Producing Dairy Cows. *Reproduction in Domestic Animals* [Internet]. *Blackwell Publishing Ltd*; 2016 Apr 1 [cited 2020 Apr 3];51(2):227–31. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/rda.12670>
90. Bhattarai B, Fosgate GT, Osterstock JB, Fossler CP, Park SC, Roussel AJ. Comparison of calf weaning weight and associated economic variables between beef cows with and without serum antibodies against or isolation from feces of Mycobacterium avium subsp paratuberculosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. *American Veterinary Medical Association* 1931 North Meacham Road - Suite 100, Schaumburg, IL 60173 USA 847-925-8070 847-925-1329 avmajournals@avma.org ; 2013 Dec 1;243(11):1609–15.

91. Selim A, Ali A-F, Ramadan E. Prevalence and molecular epidemiology of Johne's disease in Egyptian cattle. *Acta Tropica* [Internet]. Elsevier; 2019 Jul 1 [cited 2020 Feb 13];195:1–5. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X18313779#fig0005>
92. Toth JD, Aceto HW, Rankin SC, Dou Z. Short communication: Survey of animal-borne pathogens in the farm environment of 13 dairy operations. *Journal of Dairy Science*. Elsevier; 2013 Sep 1;96(9):5756–61.
93. TELLES TS, BACCHI MD, COSTA GV DA, SCHUNTZEMBERGER AMS. Milk production systems in Southern Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências. FapUNIFESP (SciELO)*; 2020;92(1).
94. Lombard JE. Epidemiology and Economics of Paratuberculosis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* [Internet]. Elsevier Inc.; 2011;27(3):525–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cvfa.2011.07.012>
95. EMATER. RELATÓRIO SOCIOECONÔMICO DA CADEIA PRODUTIVA DO LEITE NO RIO GRANDE DO SUL [Internet]. Porto Alegre; 2019 Nov [cited 2020 May 28]. Available from: https://www.ufsm.br/unidades-universitarias/ccr/wp-content/uploads/sites/370/2019/12/RELATORIO-LEITE-2019_2.pdf
96. MAPA. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 77, DE 26 DE NOVEMBRO DE 2018 - Imprensa Nacional [Internet]. 2018 [cited 2020 May 28]. p. 1–12. Available from: http://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/52750141/do1-2018-11-30-instrucao-normativa-n-77-de-26-de-novembro-de-2018-52749887
97. Ellingson JLE, Anderson JL, Koziczkowski JJ, Radcliff RP, Sloan SJ, Allen SE, et al. Detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in retail pasteurized whole milk by two culture methods and PCR. *Journal of food protection* [Internet]. 2005 May [cited 2019 Apr 1];68(5):966–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15895728>
98. Savi R, Ricchi M, Cammi G, Garbarino C, Leo S, Pongolini S, et al. Survey on the presence of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in ground beef from an industrial meat plant. *Veterinary Microbiology* [Internet]. Elsevier; 2015 Jun 12 [cited 2020 Mar 29];177(3–4):403–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113515001170?via%3Dihub>
99. Albuquerque PPF de, Santos A de S, Souza Neto OL de, Kim P de CP, Cavalcanti EFTSF, Oliveira JMB de, et al. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in bovine milk from the state of Pernambuco, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* [Internet]. Sociedade Brasileira de Microbiologia; 2017;48(1):113–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.010>
100. ELLINGSON JLE, ANDERSON, JENNIFER L KOZICZKOWSKI JJ, RADCLIFF RP, SLOAN SJ, ALLEN SE, SULLIVAN NM. Detection of Viable *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in Retail Pasteurized Whole Milk by Two Culture Methods and PCR. *Journal of Food Protection*. 2016;68(5):966–72.