



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

STEFANY LIA OLIVEIRA CAMILO

**PARATUBERCULOSE EM VACAS LEITEIRAS DE ALTA
PRODUÇÃO NO PARANÁ, BRASIL**

Londrina
2021

STEFANY LIA OLIVEIRA CAMILO

**PARATUBERCULOSE EM VACAS LEITEIRAS DE ALTA
PRODUÇÃO NO PARANÁ, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Júlio Augusto Naylor Lisboa

Londrina
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

S816 Camilo, Stefany Lia Oliveira.
Paratuberculose em vacas leiteiras de alta produção no Paraná, Brasil / Stefany Lia Oliveira Camilo. - Londrina, 2021.
63 f.

Orientador: Júlio Augusto Naylor Lisbôa.
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2021.
Inclui bibliografia.

1. bovinos - Tese. 2. paratuberculose - Tese. I. Lisbôa, Júlio Augusto Naylor. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 619

STEFANY LIA OLIVEIRA CAMILO

**PARATUBERCULOSE EM VACAS LEITEIRAS DE ALTA PRODUÇÃO
NO PARANÁ, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Júlio Augusto Naylor Lisboa
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota
Universidade Federal Rural de Pernambuco –
UFRPE

Profa. Dra. Marilene de Farias Brito
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro –
UFRRJ

Londrina, 25 de fevereiro de 2021.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Virologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias - UEL, como requisito para a obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, área de concentração em Sanidade Animal, sob orientação do Prof. Dr. Júlio Augusto Naylor Lisbôa.

Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram obtidos junto à agência e órgão de fomento à pesquisa abaixo relacionados:

- 1. PROPPG: Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação.**
- 2. CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico**
- 3. INCT/Leite: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia sob projeto nº 465725/2014-7**

Dedico este trabalho a meus pais e minha irmã.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar saúde e força para alcançar meus objetivos, por ter me fortalecido nos momentos de desânimo.

Aos meus pais, Célio e Marlene, que nunca mediram esforços para tornarem meus sonhos possíveis e que foram meus maiores incentivadores e apoio nessa etapa.

À minha irmã Liz Caroline, que mesmo longe se faz presente em todos os momentos sendo meu porto seguro. E ao meu cunhado Ruan Zanella, por todo apoio e conselhos.

Ao Prof. Júlio Lisbôa, pela orientação, paciência e pelos conhecimentos repassados durante os oito anos de trabalho, especialmente no período do mestrado, além da amizade formada. O senhor contribuiu grandemente para a formação da minha vida profissional e eu serei eternamente grata por tudo.

Aos Médicos Veterinários, Emanuel Binotto, Pedro Vieira e equipe da Policlínica Veterinária Carambeí, Weverton e Gunther da Colônia Witmarssum, Paulo Doering e ao Sr. Humberto da Cooperativa Castrolanda, e à Suelen González e Edgar, pela seleção e contato das propriedades e por tornarem as coletas possíveis. E aos proprietários que gentilmente permitiram a realização deste trabalho.

À toda a equipe do Laboratório de Virologia, em especial à Juliana Fritzen, por terem me acolhido, ensinado e feito esse trabalho ser completo. Vocês me proporcionaram horas de trabalho aliados à descontração que fizeram a diferença na minha vida pessoal e acadêmica.

Aos professores Ulisses de Pádua Pereira e Roberta Lemos Freire por contribuírem com a banca de qualificação desse trabalho.

Ao professor Rinaldo Mota e equipe da UFRPE, pelas sugestões e por terem cedido a amostra de controle positivo.

À PROPPG e ao INCT/Leite pelo apoio financeiro, e ao CNPq pela bolsa concedida.

Às amigas Priscilla Fajardo e Juliana Curti, não só pelos puxões de orelha e ensinamentos, mas por toda a amizade e incentivo durante o tempo que estamos juntas! E à bebê Lívia Curti que tornou nosso grupo mais completo!

Aos amigos Thalissa Farias, Tavine Bianchini, Mateus Mathias, Ana Clara Souza, Francesco Chiaro, Nathalia Covre, Larissa Bergamo, Eduardo Rossignolo, Ranielle Rosenthal, Lahys Diniz e Giovana Bernini que foram diversão, descontração e apoio durante todo o trabalho.

“Não te envergonhes se às vezes os animais estão
mais próximos de ti do que as pessoas. Eles também
são seus irmãos”
(São Francisco de Assis)

CAMILO, Stefany Lia Oliveira. **Paratuberculose em vacas leiteiras de alta produção no Paraná, Brasil.** 2021. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

RESUMO

A paratuberculose é uma doença infectocontagiosa crônica caracterizada por enterite granulomatosa que acomete ruminantes domésticos e selvagens e tem grande relevância para os bovinos. Causada pelo *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), um bacilo álcool-ácido resistente que pode sobreviver dentro de macrófagos, é transmitida principalmente pela via oro-fecal. Os bezerros são mais susceptíveis e se infectam nos primeiros meses de vida, no entanto, só desenvolverão sinais clínicos a partir dos 3 anos de idade. As principais manifestações clínicas são diarreia crônica, emagrecimento progressivo e diminuição da produção leiteira. A paratuberculose é responsável por prejuízos econômicos significativos seja pelo descarte precoce dos doentes ou com a queda da produção e possui um potencial zoonótico que ameaça a saúde pública, por isso deve ser investigada. Este é o primeiro estudo observacional transversal sobre paratuberculose em vacas de alta produção do estado do Paraná, Brasil. O objetivo foi identificar rebanhos com vacas sororreagentes contra MAP, com ou sem eliminação fecal da micobactéria, e os fatores de risco associados com a doença. Antes das coletas foi aplicado um questionário epidemiológico contendo questões sobre manejo da propriedade para identificação dos fatores associados à doença. Amostras de sangue e de fezes foram coletadas de 708 vacas, maiores do que 2 anos, em 54 rebanhos distribuídos em cinco municípios da bacia leiteira dos Campos Gerais, Paraná, Brasil. As amostras de soro foram submetidas ao Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos contra MAP. As vacas positivas no teste de ELISA, e trinta e uma vacas negativas, tiveram as fezes analisadas por PCR em tempo real (qPCR). Os rebanhos foram considerados positivos com a presença de pelo menos uma vaca sororreagente. A soroprevalência em rebanhos foi de 61,1% (33/54), variando entre 12,5% e 80% entre os municípios. A prevalência de vacas sororreagentes foi de 9,8% (69/708) e a frequência variou de 5% e 87,5% entre os rebanhos. Apenas uma amostra de fezes foi positiva no qPCR e representou 1,45% (1/69) das vacas sororreagentes, concluindo que a concordância entre os resultados dos dois métodos foi baixa. A introdução de animais oriundos de outras propriedades leiteiras foi considerada o único fator de risco (OR: 2,45; IC 95% 1,03-5,85) para a ocorrência de paratuberculose. Os resultados obtidos permitem sugerir que o MAP está presente entre os rebanhos da bacia leiteira dos Campos Gerais, Paraná, Brasil e que possui baixa prevalência de vacas com infecção ativa.

Palavras-chave: Doença de Johne. Diarreia crônica. ELISA. qPCR. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

CAMILO, Stefany Lia Oliveira. **Paratuberculosis in high-producing dairy cows in Paraná, Brazil**. 2021. 63 p. Dissertation (Master's degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

ABSTRACT

Paratuberculosis is a chronic infectious disease, characterized by granulomatous enteritis, which affects domestic and wild ruminants, and has great relevance for cattle. Caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), an acid-fast bacilli that can survive within macrophages, it is transmitted mainly via oro-fecal pathway. Calves are more susceptible and become infected in the first months of life, however, they will only develop clinical signs after 3 years of age. The main clinical manifestations are chronic diarrhea, progressive weight loss and decreased milk production. Paratuberculosis is responsible for significant economic losses, whether due to the early discard or decreased production and has a zoonotic potential that affects public health, so it should be investigated. This is the first cross sectional observational study about paratuberculosis in high-producing dairy cows in the state of Paraná, Brazil. The objective was to identify herds with seroreagent dairy cows against MAP, with or without fecal elimination of mycobacteria, and the risk factors associated with the disease. Before collections, an epidemiological questionnaire was applied containing questions on property management to identify factors associated with the disease. Blood and feces samples were collected from 708 dairy cows, older than 2 years, in 54 herds distributed in five cities of Campos Gerais dairy basin, Paraná, Brazil. The serum samples were analyzed by Enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) to detect antibody against MAP. The positive cows in ELISA, and thirty negative cows, had their feces analyzed by real-time PCR (qPCR). One herd was considered positive with the presence of at least one seroreagent cow. The herd-level prevalence was 61.1% (33/54) ranged from 12.5% to 80% among the cities. The animal-level prevalence was 9.8% (69/708) and the frequency per herds ranged from 5% to 87.5%. Only one feces sample was positive in qPCR, representing 1.45% (1/69) of the seroreagent dairy cows, concluding that the agreement between the results of the two methods was low. The introduction of animals from other dairy farms was identified as the only risk factor (OR = 2.45; CI95%: 1,03-5,85) for the occurrence of paratuberculosis. These results suggest that MAP is present among herds in the dairy basin of Campos Gerais, Paraná, Brazil and has low animal-level prevalence.

Keywords: Johne's disease. Chronic diarrhea. ELISA. qPCR. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Tamanho da amostra de rebanhos e vacas de alta produção coletados para o estudo da paratuberculose em municípios da bacia leiteira dos Campos Gerais, estado do Paraná, Brasil, realizado entre outubro de 2019 e janeiro de 2020.....	42
Tabela 2	Prevalência de rebanhos positivos e de vacas sororreagentes para <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> na bacia leiteira dos Campos Gerais do estado do Paraná, Brasil, entre outubro de 2019 e janeiro de 2020.....	46
Tabela 3	Análise univariada dos fatores associados à ocorrência de rebanhos com animais sororreagentes para <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> na bacia leiteira dos Campos Gerais, estado do Paraná, Brasil, entre outubro de 2019 e janeiro de 2020	47
Tabela 4	Análise univariada dos fatores associados à ocorrência de vacas sororreagentes para <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> na bacia leiteira dos Campos Gerais, estado do Paraná, Brasil, entre outubro de 2019 e janeiro de 2020.....	48
Tabela 5	Análise multivariada dos fatores de risco associados à ocorrência de animais sororreagentes para <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> em rebanhos e vacas da bacia leiteira dos Campos Gerais, estado do Paraná, Brasil, entre outubro de 2019 e janeiro de 2020.....	49

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	PARATUBERCULOSE (DOENÇA DE JOHNE)	14
2.2	ETIOLOGIA.....	15
2.3	EPIDEMIOLOGIA.....	17
2.4	PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS	19
2.5	MÉTODOS DIAGNÓSTICOS.....	21
2.6	TRATAMENTO	23
2.7	PREVENÇÃO.....	23
2.8	RELAÇÃO COM A DOENÇA DE CROHN	25
3	REFERÊNCIAS	27
4	HIPÓTESE	36
5	OBJETIVOS	37
5.1	OBJETIVO GERAL.....	37
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
6	ARTIGO – OCORRÊNCIA DE PARATUBERCULOSE EM VACAS LEITEIRAS DE ALTA PRODUÇÃO NO PARANÁ, BRASIL	38
7	CONCLUSÕES	58
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	59
	APÊNDICES	60
	APÊNDICE A Questionário epidemiológico para investigação dos fatores de risco de paratuberculose	61
	ANEXOS	62
	ANEXO A Aprovação e Registro da Comissão de Ética no uso de animais.....	63

1 1 INTRODUÇÃO

2 O agronegócio possui grande importância econômica para o Brasil, e representa
3 aproximadamente 21,4% do Produto Interno Bruto (PIB) do país e nesse contexto, destaca-se a
4 pecuária bovina. Em 2019, o rebanho bovino brasileiro era de 214 milhões de animais, sendo
5 que 16,3 milhões eram de vacas ordenhadas (BRASIL, 2019). A produção leiteira é a quinta
6 maior do mundo, e em 2020 foi de 34 bilhões de litros de leite, representando aproximadamente
7 43,1 bilhões de reais (FAO, 2020). A região sul representa 33,4% da produção do país e o estado
8 do Paraná é o segundo maior produtor de leite. A bacia leiteira dos Campos Gerais, localizada
9 na mesorregião Centro-oriental do estado, destaca-se pela alta produtividade e pelo predomínio
10 de propriedades com alto nível de tecnificação. A média anual de produção por vaca é de 6.741
11 litros de leite, e supera as médias estadual (3.324 L/vaca/ano) e federal (2.141 L/vaca/ano).
12 Além disso, os municípios de Castro e Carambeí estão entre os três maiores produtores de leite
13 do país, com produtividade média anual de 8.023 litros e 9.023 litros, respectivamente, com
14 volume total no ano equivalente a 280 e 180 milhões de litros de leite (BRASIL, 2019).

15 Dentre as enfermidades que podem afetar a sanidade dos bovinos destaca-se a
16 paratuberculose (Doença de Johne), causada pelo *Mycobacterium avim* subsp. *paratuberculosis*
17 (MAP). É caracterizada como uma inflamação intestinal crônica e incurável, que tem como
18 principais sinais clínicos principais diarreia e emagrecimento progressivo, sendo que, animais
19 na fase subclínica da doença podem ser aparentemente saudáveis e ainda assim transmitir a
20 micobactéria (FECTEAU, 2018). A paratuberculose causa prejuízos econômicos significantes
21 pela diminuição da produção leiteira e do ganho de peso, baixa eficiência reprodutiva, abate
22 prematuro, redução no valor da carcaça e custos com diagnóstico e tratamento. É considerada
23 uma doença com ameaça potencial à indústria, causando um impacto global na produção de
24 carne e leite, e pode ter um potencial zoonótico que ainda não foi completamente esclarecido
25 (BEHR; COLLINS, 2010).

26 Nas últimas décadas, foram realizados estudos no Brasil que comprovam a ocorrência
27 da doença nas cinco regiões do país, incluindo relatos em 12 dos 39 estados da federação
28 (YAMASAKI et al., 2013). No entanto, não são conhecidas informações sobre a situação
29 epidemiológica e ocorrência desta infecção em ruminantes criados no estado do Paraná.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PARATUBERCULOSE (DOENÇA DE JOHNE)

A paratuberculose acomete classicamente ruminantes, sendo eles bovinos, ovinos, caprinos e cervídeos. No entanto, seu agente etiológico, o *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* (MAP), já foi isolado de outras espécies tais como coelhos, texugos, gambás, corvos, coiotes, gatos e guaxinins, que se tornam importantes na investigação epidemiológica, pois, podem ser reservatórios e propiciar a contaminação ambiental pela micobactéria (BEHR; COLLINS, 2010; MCALOON et al., 2019).

A principal via de transmissão é a oro-fecal e os bovinos são mais susceptíveis nos primeiros meses de vida, pela ingestão de colostro e leite, e quando entram em contato com fezes contaminadas com a micobactéria. A idade torna os animais mais resistentes à infecção e bezerros de 12 meses tem a resistência equivalente à de um bovino adulto (SWEENEY, 2011). Mortier et al. (2013) avaliaram experimentalmente a dose infectante de MAP e a susceptibilidade relacionada à idade em bezerros de corte e concluíram que animais até 1 ano têm maior probabilidade de se tornarem infectados e que doses infectantes maiores resultam em lesões mais graves. No entanto, ambientes com grande quantidade de MAP podem superar a resistência de vacas e novilhas e infectá-las, seja pela água, alimentos ou utensílios contaminados (FECTEAU, 2018; SWEENEY, 2011; WINDSOR; WHITTINGTON, 2010). Fatores individuais, genéticos, doenças concomitantes e outras causas de estresse também podem interferir na susceptibilidade dos bovinos à infecção (ARSENAULT et al., 2014; SWEENEY, 2011).

Stabel et al. (2009) compararam em infecção experimental a inoculação de cepas de MAP por via intraperitoneal e oral, e sugeriram que a via oral induz maior colonização intestinal e eliminação fecal da bactéria (STABEL et al., 2009). A via intrauterina também pode ser uma forma de transmissão da doença e, vacas na fase clínica da doença têm maior probabilidade de infectar seus bezerros na fase intrauterina do que as assintomáticas (ARSENAULT et al., 2014). Além disso, leite e colostro de animais em estágios avançados da doença podem ser vias de eliminação, bem como os fluidos corporais como saliva, líquido uterino e sêmen (ARSENAULT et al., 2014).

O desenvolvimento dos sinais clínicos da doença depende da dose infectante, da susceptibilidade e da resposta imune do hospedeiro, por isso, nem todos os animais infectados irão se tornar doentes (SWEENEY, 2011). Dos bezerros acometidos, a maioria desenvolverá

1 infecção persistente e, apenas 10 a 15%, poderão ter a fase clínica avançada da doença. Sendo
2 assim, o sistema imune do hospedeiro determina a ocorrência ou não dos sinais clínicos
3 (ARSENAULT et al., 2014).

4 O primeiro relato de paratuberculose no mundo foi em 1894, na Alemanha (JOHNE;
5 FROTHINGHAM, 1895). Uma vaca com diminuição da produção de leite e perda de peso
6 diagnosticada erroneamente com tuberculose intestinal (*Mycobacterium bovis*). No exame *post*
7 *mortem* verificaram espessamento da mucosa dos segmentos intestinais e aumento de
8 linfonodos mesentéricos. No exame histopatológico, observou-se uma grande quantidade de
9 bactérias álcool-ácido resistentes, semelhante ao agente etiológico da tuberculose. Suspeitam
10 que a doença observada na vaca poderia ser causada pela bactéria da tuberculose em aves
11 (posteriormente identificada como *Mycobacterium avium*) e foi denominada enterite
12 pseudotuberculosa (CHIODINI; VAN KRUININGEN; MERKAL, 1984).

13 O termo Doença de Johne foi introduzido no ano de 1906, e em 1912, o agente etiológico
14 foi definido como o *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (HOLT, 1912; TWOR;
15 INGRAM, 1912). O primeiro relato nos Estados Unidos foi em 1908, e na década de 1920 a
16 paratuberculose foi gradativamente sendo diagnosticada na Europa, Ásia e África, e nos anos
17 30 na Índia e América do Sul. Segundo Manning e Collins (2001), em 1970 a enfermidade já
18 se apresentava dispersa no mundo, e atualmente a Organização Internacional de Epizootias
19 (OIE) confirma a distribuição global (MANNING; COLLINS, 2001; OIE, 2019). Em 9 dos 20
20 países da América Latina há relatos sobre a ocorrência da paratuberculose (ESPESCHIT et al.,
21 2017).

22 No Brasil, o primeiro relato da doença foi de um bovino importado da Bélgica no ano
23 de 1915, no estado do Rio de Janeiro (DUPONT, 1915). Em 1956 um touro importado da
24 Holanda teve o diagnóstico confirmado com exame histopatológico (SANTOS; SILVA, 1956).
25 E somente em 1960 a doença foi relatada em um bovino nascido e criado no país (DACORSO
26 FILHO et al., 1960). Desde então, a paratuberculose já foi identificada em bovinos, bubalinos,
27 caprinos e ovinos brasileiros (YAMASAKI et al., 2013).

28

29 2.2 ETIOLOGIA

30

31 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) é um bacilo álcool-ácido
32 resistente, gram positivo, imóvel, com alta concentração de ácido micólico em sua parede. É
33 uma bactéria da família *Mycobacteriaceae* e do gênero *Mycobacterium*, que abrange também
34 os micro-organismos responsáveis pela tuberculose humana e bovina (CUNHA; BALLUS,

1 2009). Está inserido no complexo do *Mycobacterium avium* que abrange cinco subespécies de
2 micobactéria, e difere-se das outras por apresentar maior dependência de micobactina J, um
3 quelante de ferro essencial para sua replicação. Quando cultivado em meios de cultura como o
4 Herrold Egg Yolk Medium (HEWM) ou Lowenstein-Jensen (LJ) tem como característica a
5 formação de colônias despigmentadas e rugosas, de crescimento lento, variando entre 8 e 16
6 semanas de incubação (MANNING; COLLINS, 2001).

7 As características da parede celular conferem às micobactérias a habilidade de resistir à
8 fatores físicos e químicos do ambiente (JOHNSON-IFEARULUNDU; KANEENE, 1999).
9 Além disso, a parede celular é responsável pela patogenicidade de MAP, que pode manter-se
10 viável nos macrófagos e inibir a formação dos fagossomos, limitando a eliminação da
11 micobactéria pelo sistema imune do hospedeiro e mantendo a infecção crônica (COLLINS,
12 2003). Segundo Lamont et al. (2012) MAP pode esporular, aumentando sua resistência à fatores
13 químicos e físicos, porém, o mecanismo ainda não é descrito. Os efeitos da pasteurização do
14 leite são controversos; alguns estudos afirmam que o processo é eficaz na inativação do MAP,
15 e outros, relatam que quantidades elevadas da micobactéria resistiriam ao processo (GERRARD
16 et al., 2018).

17 Genotipicamente MAP pode ser identificado pela presença de 15 a 20 cópias do
18 elemento de inserção 900 (IS900) que foi o primeiro elemento relatado em micobactérias
19 (COLLINS; GABRIC; DELISLE, 1990; GREEN et al., 1989). Elementos de inserção são
20 pequenos elementos genéticos que contém genes relacionados às funções de transposição e que
21 podem ser utilizados na identificação de patógenos (HARRIS; BARLETTA, 2001). Outras
22 sequências e elementos foram relatados e podem ser utilizados para identificação da
23 micobactéria. A sequência “F57”, possui 620 pares de base e é uma sequência única e específica
24 (POUPART et al., 1993), assim como a *ISMav2* é um elemento de inserção encontrado no MAP
25 que não é comum à outras bactérias dessa família (STOMMINGER; STEVENSON;
26 GERLACH, 2001). Apesar de outras sequências serem mais específicas, o IS900 ainda é
27 considerado mais sensível na identificação de MAP (LILENBAUM; MARASSI; OELEMAN,
28 2007).

29 A região IS1311 também é utilizada para determinação de cepas de MAP e foi
30 demonstrada também no *Mycobacterium avium*, com mutações em cinco pontos da sequência
31 de inserção. Essas mutações foram utilizadas para definir cepas com a utilização de técnicas
32 moleculares, como a Análise de Enzimas de Restrição (REA) (WHITTINGTON et al., 1998).
33 Foram definidas quatro cepas da micobactéria sendo elas primeiramente bovino (*Cattle*) e ovino
34 (*Sheep*) e após *bison* e intermediário (COLLINS; GABRIC; DE LISLE, 1990;

1 WHITTINGTON; MARSH; WHITLOCK, 2001). No entanto, estudos posteriores sobre a
2 composição genômica redefiniram-nas em apenas duas linhagens, tipo *Cattle* (tipo C) e *Sheep*
3 (tipo S). As estirpes *bison* e intermediária passaram a ser consideradas sub-divisões dos tipos
4 bovino e ovino, respectivamente (ALEXANDER; TURENNE; BEHR, 2009; THIBAUT et al.,
5 2012).

6 As cepas de MAP diferem-se quanto à patogenicidade. Janagama et al. (2006) afirmaram que
7 as cepas tipo C, quando comparadas às do tipo S, são encontradas em maior número em
8 macrófagos. O'Brien et al. (2010) em estudo com cervos, afirmaram que cepas do tipo C
9 estabeleceram 100% de infecção, enquanto as do tipo S apenas 69%, e sugeriram que, essas
10 seriam menos patogênicas. Verna et al. (2007) em estudo com ovinos, verificaram que, animais
11 infectados com a cepa tipo S apresentaram lesões mais graves do que os induzidos com o tipo
12 C, e sugeriram que a cepa do tipo *Cattle* se desenvolve de forma lenta e localizada. Contrariando
13 o estudo anterior, Fernandez et al. (2014) realizaram indução experimental de paratuberculose
14 em ovinos testando as cepas tipo C e S concluíram que os animais infectados com cepas do tipo
15 S apresentaram lesões restritas ao sistema linfóide sem alterações ao longo do tempo, enquanto
16 animais infectados com a cepa tipo C apresentaram lesões mais graves, porém regressivas, que
17 diminuíram com o tempo. Stabel, Palmer e Whitlock (2003) avaliaram a resposta imune em
18 bezerros de corte e bezerros de búfalo infectados com cepas do tipo C e tipo *bison* e concluíram
19 que os búfalos foram mais susceptíveis que os bezerros à infecção pelo tipo *bison*.
20 Inversamente, os bezerros de corte foram menos resistentes à infecção com cepas do tipo C.

21

22 2.3 EPIDEMIOLOGIA

23

24 Estudos de prevalência da doença em bovinos brasileiros, utilizando ELISA para
25 diagnóstico sorológico da paratuberculose, descreveram em São Paulo de 37,9% a 65,5% de
26 animais positivos (FONSECA et al., 2000; RIVEIRA, 1996), no Rio de Janeiro de 11,8% a
27 40% (FERREIRA; FONSECA; LILENBAUM, 2001; FERREIRA et al., 2003; RISTOW et al.,
28 2007; YAMASAKI et al., 2010), em Goiás 60,24% (ACYPRESTE et al., 2005), no Mato
29 Grosso do Sul 45% (RIVEIRA, 1996), no Espírito Santo 11,4% (COSTA et al., 2010), em
30 Pernambuco de 2,7% (SÁ et al., 2013) e na Paraíba de 10% (MEDEIROS et al., 2012; VILAR
31 et al., 2015;).

32

33

34

Na região Sul a paratuberculose foi relatada em Santa Catarina num touro brasileiro e
em uma vaca importada da Holanda (PORTUGAL et al., 1979), e no Rio Grande do Sul em
bovinos (DRIEMEIER et al., 1999; FISS et al., 2015; GOMES et al., 2002; RAMOS et al.,

1 1986), caprinos (POESTER; RAMOS, 1994) e um estudo de prevalência em búfalos que obteve
2 20% de animais positivos no teste de ELISA (DALTON et al., 2012). No estado do Paraná não
3 há informações sobre ocorrência da doença.

4 A identificação dos fatores de risco associados à ocorrência da paratuberculose é uma
5 etapa essencial que antecede a implementação de medidas de controle da doença. Bolton et al.
6 (2011) relataram que nos rebanhos americanos com soroprevalência superior a 10%, e em
7 plantéis maiores que 300 animais, podem favorecer a dispersão do MAP. Segundo Lombard
8 (2011) e McAloon et al. (2017) a disseminação de MAP entre rebanhos ocorre principalmente
9 pela circulação de animais infectados durante a compra e venda. Rangel et al. (2015) em uma
10 revisão sistemática de trabalhos publicados de 1996 até 2011, confirmam que a entrada de
11 animais positivos na propriedade é o principal fator para favorecer a ocorrência da doença. A
12 presença de animais silvestres na propriedade, segundo Rangel et al. (2015), não está
13 relacionada com a paratuberculose. Em bovinos leiteiros da Irlanda, McAloon et al. (2017)
14 afirmaram que o tempo em que o bezerro permanece no piquete maternidade após o nascimento,
15 e a utilização destes locais para alocar animais doentes e com afecções do sistema locomotor
16 são fatores de risco.

17 Correa-Valência et al. (2019) afirmaram que em rebanhos colombianos a criação de
18 outras espécies concomitantemente à bovinocultura favorece a ocorrência da paratuberculose.
19 No Chile, estudo recente concluiu como fatores de risco a alimentação exclusiva de bezerros
20 com substitutos de leite e distâncias inferiores a 30 metros entre a sala de ordenha e o curral
21 dos bezerros. Além disso, a introdução recente de animais no rebanho elevou as chances de
22 casos clínicos compatíveis com paratuberculose em um período de 12 meses (VERDUGO;
23 VALDES; SALGADO, 2020).

24 No Brasil, Sá et al. (2013), em estudo com bovinos leiteiros no estado de Pernambuco,
25 afirmaram que o número de nascimentos superior a 51 bezerros por ano é fator de risco para
26 ocorrência da paratuberculose. Esses autores relataram fatores com tendência à associação
27 como a não realização de quarentena ao adquirir animais, utilização de ordenha manual,
28 presença de bezerro ao pé e a higienização ineficiente de ordenhas e instrumentos. Na Paraíba,
29 Vilar et al. (2015) obtiveram a não utilização de piquetes maternidade para o parto, e rebanhos
30 com número de animais adultos superior a 12 foram fatores de risco, além disso, bovinos do
31 sertão da Paraíba tinham maior probabilidade de apresentarem anticorpos contra MAP do que
32 em outras regiões do estado.

33 A associação entre a ocorrência de paratuberculose e de tuberculose, ou ainda,
34 evidências de coinfeção entre as enfermidades em bovinos, ainda não foi completamente

1 elucidada. No entanto, Byrne et al. (2019) realizaram um estudo retrospectivo no Reino Unido
2 nos anos de 2004 a 2015, e afirmaram que rebanhos positivos para tuberculose têm maior
3 chance de diagnosticar animais positivos para MAP.

4 5 2.4 PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS 6

7 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* possui tropismo pelas células intestinais.
8 Após a ingestão, MAP invade o epitélio intestinal pelas células M ou pelos enterócitos. As
9 células dendríticas e os macrófagos podem carrear a micobactéria para os linfonodos
10 mesentéricos e regionais e para a circulação periférica (MCNEES et al., 2015).

11 A entrada de MAP nas placas de Peyer resulta na supressão das barreiras intestinais que
12 permite a passagem da bactéria dos enterócitos para a lâmina própria do intestino. Ocorre
13 recrutamento de macrófagos para o local da infecção e, assim como outras micobactérias, pode
14 persistir nessas células pela inibição do processo de maturação dos fagossomos, fazendo com
15 que a apresentação e destruição dos antígenos seja comprometida (KOETS; EDA;
16 SREEVATSAN, 2015; MCNEES et al., 2015). Nos macrófagos ocorre a multiplicação
17 bacteriana e aumento do volume celular, levando à morte celular e a liberação de micobactérias
18 que serão fagocitadas novamente. Consequentemente, ocorre aumento do número de
19 macrófagos infectados e bactérias invadindo as vilosidades intestinais e camadas profundas da
20 lâmina própria. O intestino espessado fica com a capacidade de absorção de nutrientes reduzida
21 o que resulta em perda de peso e hipoproteinemia (BEHR; COLLINS, 2010; SWEENEY,
22 2011).

23 O sistema imune é responsável por controlar a infecção pela micobactéria ou persistir
24 nos macrófagos. Pode-se considerar duas situações em relação à patogenia da doença: a invasão
25 do epitélio intestinal e a persistência do micro-organismo nos macrófagos (MCNEES et al.,
26 2015). Alguns indivíduos irão controlar e eliminar o MAP pelos macrófagos, e não irão manter
27 a infecção, e outros irão permanecer infectados. Durante o início da infecção, o sistema
28 imunológico do bovino produz resposta imune celular, contra os macrófagos infectados. Com
29 a progressão da doença, ocorre uma resposta humoral, caracterizada pela produção de
30 imunoglobulinas G, que não consegue eliminar os patógenos intracelulares (ARSENAULT et
31 al., 2014).

32 A paratuberculose é uma doença crônica e progressiva que é dividida em quatro
33 estágios: fase silenciosa, subclínica, clínica e clínica avançada. O estágio I compreende a fase
34 silenciosa, também chamada de fase eclipse, na qual os animais são infectados, mas, não

1 apresentam nenhum sinal clínico. A proliferação de MAP assim como a resposta inflamatória,
2 é lenta. Nesta fase a eliminação fecal pode ocorrer, mas é rara, estando abaixo dos níveis de
3 detecção dos métodos diagnósticos disponíveis, e os anticorpos séricos não são produzidos
4 (MANNING; COLLINS, 2001; BEHR, COLLINS, 2010).

5 No estágio II, subclínico, a infecção progride, aumentam as concentrações de MAP nas
6 células intestinais, ainda não há perda de peso ou diarreia, mas pode haver diminuição da
7 produção de leite. Nesta fase a eliminação fecal da micobactéria se inicia lentamente assim
8 como a produção sérica de anticorpos. Animais nessa fase contribuem para a disseminação de
9 MAP, contaminando o ambiente e sendo fonte de infecção para outros. Conforme a infecção
10 progride os níveis de eliminação de MAP pelas fezes aumentam, e podem atingir a glândula
11 mamária e o feto (BEHR, COLLINS, 2010).

12 O estágio III, clínico, compreende o início dos sinais clínicos e ocorre principalmente
13 em bovinos com mais de 3 anos de idade. Nessa fase há perda de peso, mesmo com apetite
14 normal, e as eficiências produtiva e reprodutiva são comprometidas. (BEHRS; COLLINS,
15 2010)

16 O estágio IV é a fase clínica avançada da doença, quando ocorre diarreia crônica e
17 intermitente, emagrecimento progressivo, diminuição da produção de leite e infertilidade e os
18 animais acometidos tornam-se mais susceptíveis a outras infecções (FECTEAU, 2018; FISS et
19 al., 2015). Neste estágio, há infiltração granulomatosa intestinal que progride para síndrome de
20 má-absorção e enteropatia, e a doença torna-se evidente. Aproximadamente 95% dos animais
21 acometidos apresentam as formas subclínicas da doença, enquanto apenas 5% desenvolvem
22 sinais clínicos evidentes, o que facilita o diagnóstico positivo da enfermidade (FECTEAU,
23 2018).

24 O principal sinal clínico da doença é a diarreia, que deve ser cuidadosamente
25 diferenciada de fezes amolecidas causadas por alterações de dieta e outros patógenos. Outras
26 doenças que cursam com diarreia crônica em bovinos adultos, devem ser consideradas no
27 diagnóstico diferencial, como algumas formas clínicas da infecção por *Salmonella* spp. ou vírus
28 BVD, a deficiência secundária de cobre devido ao excesso de molibdênio (BEHR; COLLINS,
29 2010), a forma entérica da leucose e a tripanossomíase (COSTA et al., 2020). Além disso, a
30 diarreia é refratária a tratamentos com antibióticos. Os parâmetros fisiológicos (temperatura,
31 frequência cardíaca e respiratória) são dentro da normalidade e o apetite mantém-se sem
32 alterações (BEHRS; COLLINS, 2010; FECTEAU, 2018). Deve-se considerar que vacas
33 infectadas podem não desenvolver sinais clínicos durante toda vida produtiva, e ainda assim
34 serem capazes de eliminar MAP nas fezes, contribuindo com a transmissão da doença

1 (LOMBARD, 2011).

2 Com a evolução da doença pode ser relatada perda de peso, hipoproteïnemia, edema
3 submandibular, de barbela e ventral, anorexia e diminuição da produção. Em qualquer fase da
4 infecção, os bovinos infectados podem apresentar infertilidade, falha reprodutiva e aumento do
5 risco de desenvolvimento de metrite e mastite. Estágios avançados da doença são dificilmente
6 identificados no rebanho, uma vez que estes animais são retirados da propriedade devido à
7 queda da produção e perda de peso (BEHR; COLLINS, 2010).

8

9 2.5 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

10

11 Estabelecer o diagnóstico de paratuberculose é difícil e as técnicas disponíveis têm
12 diferentes aplicabilidades, e sensibilidade e especificidade distintas conforme a progressão da
13 doença; ainda podem ser utilizados testes imunológicos e testes de detecção do micro-
14 organismo (BEHR; COLLINS, 2010; FECTEAU, 2018).

15 Os testes de detecção de resposta imune incluem ELISA, teste de fixação de
16 complemento (FC), imunodifusão em gel de ágar (IDGA). O teste de ELISA apresenta melhor
17 sensibilidade e especificidade entre os testes disponíveis comercialmente, tem menor custo e é
18 rápido quando comparado a outros métodos. A sensibilidade dos testes de ELISA varia nas
19 diferentes fases de progressão da doença, sendo que em animais na fase clínica varia entre 50 e
20 87%. Na ausência de sinais clínicos a sensibilidade do teste pode ser de 7 a 22% se não houver
21 eliminação fecal de MAP, e aumenta para 24 a 94% caso haja a excreção de micobactéria. A
22 especificidade, no entanto, pode chegar a 100% no soro sanguíneo (NIELSEN; TOFT, 2008;
23 BRITTON et al., 2016). Os testes de IDGA e FC são menos eficientes na detecção de casos
24 subclínicos, por isso, o ELISA é o teste mais utilizado para triagem de rebanhos e programas
25 de controle, uma vez que oferece maior sensibilidade que os outros testes sorológicos e torna-
26 se mais eficiente para determinar a prevalência da infecção (GILARDONI et al., 2012;
27 FERREIRA; FONSECA; LILENBAUM, 2002). O teste intradérmico PPD já foi relatado para
28 detecção de imunidade celular, no entanto, tem como desvantagem a alta taxa de falsos-
29 positivos, devido às reações cruzadas com outras micobactérias (MANNING; COLLINS, 2001;
30 COLLINS et al., 2006)

31 Testes para detecção do agente etiológico, como o cultivo bacteriano e a reação em
32 cadeia da polimerase (PCR), têm a capacidade de identificar animais positivos de forma
33 definitiva. A identificação de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) pela coloração de Ziel-
34 Nielsen em amostras de fezes e tecido também podem ser utilizadas, porém, esse teste é pouco

1 específico já que não difere as espécies de micobactéria (BEHR, COLLINS, 2010;
2 LILENBAUM et al., 2007). Para a OIE (2019), o isolamento do agente etiológico a partir da
3 cultura fecal é o método padrão de diagnóstico, porém, as desvantagens da cultura estão
4 relacionadas ao alto custo, tempo prolongado de incubação das amostras, que varia entre 8 a 16
5 semanas, e alto risco de contaminação (BEHR; COLLINS, 2010). A cultura tem especificidade
6 próxima a 100%, e a sensibilidade pode variar entre 23 e 70%, sendo que esses valores
7 dependem do meio utilizado (líquido ou sólido) e da fase da infecção em que o animal se
8 encontra.

9 A PCR oferece um resultado rápido, com bom custo-benefício e pode ser realizado em
10 amostras de fezes, sangue, leite e tecidos. Em relação à PCR, o tipo do teste (convencional,
11 tempo real ou nested-PCR), o elemento utilizado para identificação (IS900, F57 ou IS*Mav*2) e
12 a quantidade de material genético disponível determinam valores de sensibilidade entre 29 e
13 99% e especificidade de 60 a 97% (CLARK et al., 2008; BEHR, COLLINS, 2010; BRITTON
14 et al., 2016).

15 Segundo Kawaji et al. (2007) a sensibilidade da PCR em amostras fecais é equivalente
16 à cultura e a técnica molecular seria mais específica devido à utilização dos *primers* que evitam
17 outras bactérias ambientais. A PCR em tempo real (qPCR) permite a quantificação da
18 eliminação de MAP nas fezes e tem correlação positiva com os resultados da cultura, e quando
19 comparado à PCR convencional é mais sensível e específico (MACKAY, 2004; KAWAJI et
20 al., 2007).

21 Segundo Nielsen e Toft (2008) as características biológicas de MAP são os principais
22 responsáveis pelo tempo de latência prolongado e à baixa sensibilidade dos testes diagnósticos
23 disponíveis. Além disso, a progressão da doença varia dependendo da resposta individual, por
24 isso, testes de diagnósticos únicos não podem ser aplicados para detectar a infecção em todos
25 os estágios e em todos os animais acometidos (MAROUDAM et al., 2015).

26 Magombedze, Ngonghala e Lanzas (2013) afirmam que a proporção estimada para a
27 interpretação da doença é, para cada animal na fase clínica avançada da doença, de um ou dois
28 animais na fase clínica, quatro a oito na fase subclínica e dez a quatorze no estágio silencioso
29 da infecção. Esse conceito é definido como “Fenômeno do Iceberg” e deve ser considerado na
30 avaliação da ocorrência da paratuberculose, pois ele reflete a dificuldade de afirmar,
31 precisamente, quantos animais estão infectados com MAP em um rebanho.

32 Segundo Stevenson (2015) o longo período de incubação da doença, a dificuldade de
33 identificar animais positivos sem sinais clínicos e a habilidade do micro-organismo sobreviver
34 no meio ambiente são as principais causas de insucesso no diagnóstico e na implementação de

1 programas de controle. McNees et al. (2015) ressaltam ainda, que, a baixa sensibilidade dos
2 métodos diagnósticos para identificação dos animais com infecção subclínica dificultam a
3 possibilidade de erradicação da doença.

4 No exame *post-mortem*, a lesão associada à paratuberculose é enterite granulomatosa
5 crônica que acomete principalmente a porção terminal do intestino delgado podendo progredir
6 até o intestino grosso. Em bovinos e bubalinos, classicamente, o íleo encontra-se ondulado e
7 espessado e ocorre edema em gânglios linfáticos mesentéricos. A parede intestinal se apresenta
8 espessada resultando em má-absorção e finalmente formação de extensos granulomas na
9 submucosa (ARSENAULT et al., 2014). À microscopia pode se identificar enterite, linfadenite,
10 linfangite granulomatosa com infiltrado composto por macrófagos, células gigantes de
11 Langhans e células epitelioides, com presença de bacilos álcool-ácido resistentes (MOTA et al.,
12 2010; MOTA et al., 2007).

14 2.6 TRATAMENTO

16 Raramente animais com diagnóstico de paratuberculose recebem tratamento, uma vez
17 que é oneroso, por tempo prolongado, nem sempre eficaz e não impede a eliminação de MAP
18 pelas fezes. Torna-se opção apenas em animais de alto valor zootécnico e afetivo (FECTEAU,
19 2018).

20 As opções de tratamento são a associação de: isoniazida (10mg/kg), rifampicina
21 (10mg/kg) e clofazimina (5mg/kg), administrados uma vez ao dia, por via oral. Estes
22 medicamentos não eliminam a infecção e, apenas controlam os sinais clínicos, que retornam se
23 o tratamento for descontinuado (BEHR; COLLINS, 2010).

25 2.7 PREVENÇÃO

27 As perdas econômicas, as implicações em bem-estar e saúde animal, e o provável
28 potencial zoonótico da enfermidade definem a importância que o controle da paratuberculose
29 tem (GARCIA; SHALLOO, 2015; ARSENAULT et al., 2014). Existem diferentes métodos
30 disponíveis para controle da paratuberculose, no entanto, não há consenso sobre qual ou quais
31 estratégias são eficientes e devem ser padronizadas (BASTIDA; JUSTE, 2011).

32 Estabelecer a prevalência da doença e os fatores de risco associados são essenciais para
33 o direcionamento de medidas sanitárias que previnam a disseminação do agente e,
34 consequentemente, os prejuízos econômicos. No entanto, para implementação de programas de

1 controle, a situação epidemiológica da doença no país deve estar definida, o que não ocorre no
2 Brasil, uma vez que os relatos da paratuberculose apresentam apenas os achados clínico-
3 patológicos e do diagnóstico laboratorial e os estudos de prevalência são locais (YAMASAKI
4 et al., 2013).

5 Pesquisadores de 48 países realizaram estudo retrospectivo sobre estratégias de controle
6 da paratuberculose, e concluíram que a doença atinge aproximadamente de 20% do rebanho
7 mundial (WHITTINGTON et al., 2019). E a dificuldade em controlar e erradicar a doença seria
8 devido ao tamanho da população de bovinos e sua ampla distribuição, e a presença de animais
9 silvestres infectados pela micobactéria. Nos 48 países incluídos no estudo de Whittington et al.
10 (2019) foi evidenciado que em 22 havia programas voluntários de controle da paratuberculose
11 e que o objetivo principal deles era reduzir a transmissão da doença.

12 Bastida e Juste (2011) afirmam que existem 3 focos para controle e erradicação da
13 paratuberculose: 1) controle de transmissão; 2) identificação e eliminação dos infectados; 3)
14 vacinação para aumentar resistência à infecção. A vacinação deve ser considerada com cautela
15 e os resultados são controversos, já que resulta em altos custos e pode interferir nos resultados
16 de sorologia e nos testes de tuberculização (BASTIDA; JUSTE, 2011). Segundo Park e Yoo
17 (2016) apesar das limitações, as vacinas são uma estratégia eficaz para controlar a doença, já
18 para Cho et al. (2012) tentativas de vacinação não são eficazes. No Brasil não existem vacinas
19 disponíveis comercialmente para a profilaxia da paratuberculose.

20 O Brasil não possui programa de controle contra a paratuberculose, no entanto, em 2013
21 o MAPA incluiu a doença na lista de doenças de notificação obrigatória ao serviço oficial, e
22 qualquer caso confirmado requer notificação imediata (MAPA, 2013). No entanto, mesmo sem
23 a prática de programas oficiais de prevenção existem cuidados de biossegurança que podem ser
24 instituídos para minimizar a disseminação de MAP entre os animais e os rebanhos. Algumas
25 medidas que podem ser adotadas nos rebanhos susceptíveis são: manter as áreas de maternidade
26 e manejo limpas, evitar o alojamento de vacas doentes no piquete de maternidade, minimizar o
27 contato entre vacas adultas e bezerras e novilhas, alimentação de bezerras com leite
28 pasteurizado ou substituto de boa qualidade e testar e separar animais suspeitos (AHA, 2015).

29 Além disso deve-se considerar a quarentena dos animais recém-adquiridos e realização
30 de testes de diagnóstico disponíveis, a vigilância contínua de animais adultos através de testes
31 sorológicos pelo menos semestralmente (por no mínimo 5 anos para pequenos ruminantes e 15
32 anos para bovinos e bubalinos) e eliminação dos animais infectado. Animais doentes ou
33 suspeitos não devem ser comercializados. Deve-se recomendar ainda que os nascimentos sejam
34 destinados em áreas com baixa contaminação por fezes e os bezerras devem receber colostro

1 pasteurizado ou sucedâneos. Os animais recém-nascidos devem ser mantidos separados dos
2 adultos por pelo menos um ano e animais jovens devem ser mantidos em áreas livres de esterco.
3 A limpeza das instalações deve ser rigorosa de modo a reduzir a contaminação fecal dentro de
4 áreas de alojamento dos animais (currais, salas de ordenha e outras dependências comunitárias)
5 e os comedouros e bebedouros poderão ser mantidos elevados para prevenir a contaminação
6 com as fezes (BRITO; MOTA; YAMASAKI, 2014).

7

8 2.8 RELAÇÃO COM A DOENÇA DE CROHN

9

10 A paratuberculose não é considerada uma zoonose (WHILEY et al., 2012). No entanto,
11 a importância da doença de Johne se estende à saúde pública, uma vez que existe possível
12 relação com a Doença de Crohn (DC) em humanos, que ainda não foi completamente
13 esclarecida. Sugere-se que MAP possa ser incluído na etiologia dessa enfermidade pela
14 similaridade da infecção pela micobactéria dos bovinos e a DC nos humanos (BEHR;
15 COLLINS, 2010; WHILEY et al., 2012).

16 A DC é uma doença inflamatória intestinal crônica de etiologia desconhecida, que
17 envolve fatores genéticos, ambientais e imunes associados à uma resposta inflamatória
18 intestinal inadequada. Mcnees et al. (2015) e Feller et al. (2007) afirmaram que MAP é
19 associado à Doença de Crohn. No entanto, o papel da micobactéria na ocorrência da DC é
20 altamente controverso e mundialmente debatido (WHILEY et al., 2012). A suspeita ocorre
21 devido à similaridade entre as duas doenças e acredita-se que os humanos seriam expostos ao
22 MAP por água, leite e alimentos contaminados, uma vez que a micobactéria persiste por longos
23 períodos no ambiente (BEHR; KAPUR, 2008; PIERCE, 2010). Produtos derivados de leite
24 seriam uma fonte provável de transmissão de MAP para o homem, no entanto, a pasteurização
25 e outros processos tecnológicos teriam a capacidade de reduzir a quantidade de MAP nos
26 produtos lácteos, e o problema de contaminação seria restrito ao leite cru. No entanto, a
27 eficiência dos processos de pasteurização da inativação e eliminação do MAP ainda são
28 controversos (OKURA; TOFT; NIELSEN, 2012).

29 Existem duas hipóteses para investigar a associação entre MAP e a doença de Crohn:
30 MAP poderia ser o agente etiológico da DC, ou pacientes com DC teriam maior prevalência de
31 MAP que indivíduos saudáveis, devido à deficiência do sistema imune dos pacientes doentes.
32 Pesquisadores do Irã investigaram a presença de MAP em biópsias intestinais de pacientes com
33 doença de Crohn e concluíram que 47% dos pacientes com DC foram positivos para MAP
34 (ZAREI-HORDSHOULI; GERAMIZADEH; KHODAKARAM-TAFTI, 2019). Resultados

1 semelhantes foram obtidos anteriormente por Mendoza et al. (2010) e Naser et al. (2004) que
2 concluíram que 50-100% dos humanos avaliados com DC foram positivos para a cultura ou
3 PCR de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Esses dados reforçam, porém não
4 confirmam, a possível relação etiológica entre a infecção pela micobactéria em humanos e o
5 desenvolvimento da doença inflamatória intestinal crônica que ainda deve ser investigado.

6 Considerando o exposto, a paratuberculose é uma doença relevante na sanidade animal
7 e que ainda possui lacunas a serem preenchidas sobre patogenia, diagnóstico e relação com a
8 saúde humana. Por isso o estudo contínuo sobre a doença e seu agente etiológico deve ser
9 incentivado.

1 **3 REFERÊNCIAS**

- 2 ACYPRESTE, C.S.; JULIANO, R.S.; RIVEIRA, F.E.B.; SILVA, L.A.F.; FIORAVANTI,
3 M.C.S.; FILHO, F.C.D. Uso da técnica do ELISA indireto na detecção de anticorpos anti-
4 *Mycobacterium paratuberculosis* em vacas em lactação. **Ciência Animal Brasileira**, v.6, n.1,
5 p.41-45, 2005.
6
- 7 AHA, Animal Health Australia 2015.
8 Disponível em: [www.animalhealthaustralia.com.au/what-we-do/endemic-disease/johnes-](http://www.animalhealthaustralia.com.au/what-we-do/endemic-disease/johnes-disease/)
9 [disease/](http://www.animalhealthaustralia.com.au/what-we-do/endemic-disease/johnes-disease/) (Acesso em 16.01.21).
10
- 11 ALEXANDER, D.C.; TURENNE, C.Y.; BEHR, M.A. Insertion and deletion events that define
12 the pathogen *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **Journal of Bacteriology**, v.191,
13 n.3, p.1018-1025, 2009.
14
- 15 ARSENAULT, R.J.; MAATTANEN, P.; DAIGLE, J.; POTTER, A.; GRIEBEL, P.; NAPPER,
16 S. From mouth to macrophage: mechanisms of innate immune subversion by *Mycobacterium avium*
17 subsp. *paratuberculosis*. **Veterinary Research**, v. 45, n.54, 2014.
18
- 19 BASTIDA, F.; JUSTE, R.A. Paratuberculosis control: a review with a focus on vaccination.
20 **Journal of Immune Based Therapies and Vaccines**, v.9, n.8, 2011.
21
- 22 BEHR, M.A.; KAPUR, V. The evidence for *Mycobacterium paratuberculosis* in Crohn's
23 disease. **Current opinion in gastroenterology**, v.24, n.1, p.17-21, 2008.
24
- 25 BEHR, M.A.; COLLINS, D.M. **Paratuberculosis: Organism, disease, control**. CAB
26 international, Cambridge. 375p, 2010.
27
- 28 BOLTON, M.W.; PILLARS, R.B.; KANEENE, J.B.; MAUER, W.A.; GROOMS, D.L.
29 Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in naturally exposed dairy
30 heifers and associated risk factors. **Journal of Dairy Science**, v.94, p.4669–4675, 2011.
31
- 32 BRASIL. Produção Pecuária Municipal de 2019. Rio de Janeiro. 47, 1-8, 2019.
33
- 34 BRITO, M.F.; MOTA, R.A.; YAMASAKI, E.M. **Paratuberculose: perguntas e respostas**.
35 Recife: EDUFRPE, 80 f., 2014.
36
- 37 BRITTON, L.E.; CASSIDY, J.P.; O'DONAVAN, J.; GORDON, S.V.; MARKEY, B. Potencial
38 application of emerging diagnostic techniques to the diagnosis of bovine Johne's disease
39 (paratuberculosis). **The Veterinary Journal**, v.209, p.32-39, 2016.
40
- 41 BYRNE, A.W.; GRAHAM, J.; MILNE, G.; GUELBENZU-GONZALO, M.; STRAIN, S. Is
42 There a Relationship Between Bovine Tuberculosis (bTB) Herd Breakdown Risk and
43 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Status? An Investigation in Btb Chronically and
44 Non-chronically Infected Herds. **Frontiers in Veterinary Science**, v.6, n.30, 2019.
45
- 46 CHIODINI, R.J.; VAN KRUININGEN, H.J.; MERKAL, R.S. Ruminant paratuberculosis
47 (Johne's disease): the current status and future prospects. **The Cornell Veterinarian**, v.74, n.3,
48 p.218-62, 1984.

- 1
2 CHO, J.; TAUER, L.W.; SCHUKKEN, Y.H.; GÓMEZ, M.I.; SMITH, R.L.; LU, Z.; GRÖHN,
3 Y.T. Economic analysis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* vaccines in
4 dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v.95, p.1855–1872, 2012.
5
6 CLARK, D. L.; KOZICZKOWSKI, J. J.; RADCLIFF, R. P.; CARLSON, R. A.; ELLINGSON,
7 J.L. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: Comparing fecal culture
8 versus sérum enzyme-linked immunosorbent assay and direct fecal polymerase chain reaction.
9 **Journal of Dairy Science**, v.91, 2620–2627, 2008.
10
11 COLLINS, M.T. Update on paratuberculosis: Epidemiology of Johne's disease and the biology
12 of *Mycobacterium paratuberculosis*. **Irish Veterinary Journal**, v.56, n.11, p.565-574, 2003.
13
14 COLLINS, D.M.; GABRIC, D.M.; LISLE, G.W. Identification of a repetitive DNA sequence
15 specific to *Mycobacterium paratuberculosis*. **FEMS Microbiology Letters**, v.60, n.2, p.175–
16 178, 1990.
17
18 COLLINS, M.T.; GARDNER, I.A.; GARRY, F.B.; ROUSSEL, A.J.; WELLS, S.J. Consensus
19 recommendations on diagnostic testing for the detection of paratuberculosis in cattle in the
20 United States. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.229, n.12,
21 p.1912-1919, 2006.
22
23 CORREA-VALENCIA, N.M.; RAMÍREZ, N.F.; ARANGO-SABOGAL, J.C.; FECTEAU, G.;
24 FERNÁNDEZ-SILVA, J.A. Prevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*
25 infection in dairy herds in Northern Antioquia (Colombia) and associated risk factors using
26 environmental sampling. **Preventive Veterinary Medicine**, v.170, 104739, 2019.
27
28 COSTA, R.V.C.; ABREU, A.P.M.; THOMÉ, S.M.G.; MASSARD, C.L.; SANTOS, H.A.;
29 UBIALI, D.G.; BRITO, M.F. Parasitological and clinical-pathological findings in twelve
30 outbreaks of acute trypanosomiasis in dairy cattle in Rio de Janeiro state, Brazil. **Veterinary**
31 **Parasitology: Regional Studies and Reports**, v.22, n.1, 2020.
32
33 COSTA, J.C.M.; PIERI, F.A.; SOUZA, C.F.; ESPESCHIT, I.F.; FELIPPE, A.G.; SANTOS,
34 G.M.; TOBIA, F.L.; SILVA JUNIOR, A.; MOREIRA, M.A.S. Levantamento sorológico de
35 *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis* em bovinos leiteiros no estado do Espírito
36 Santo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.6, p.1491-1494,
37 2010.
38
39 CUNHA, M.F.; BALLUS, C.A. *Mycobacterium avium* subesp. *Paratuberculosis*: uma
40 preocupação para a indústria de laticínios. **Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes**,
41 v. 366, n.64, p.3-11, jan./2009.
42
43 DACORSO FILHO, P.; CAMPOS, I.O.N.; FARIA, J.F.; LANGENEGGER, J. Doença de
44 Johne (Paratuberculose) em bovinos nacionais. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.3, p.129–
45 139, 1960.
46
47 DALTON, A.C.; BANDARRA, P.M.; PAVARINI, S.P.; BOABAID, F.M.; BITENCOURT,
48 A.P.G.; GOMÊS, M.P.; CHIES, J.; DRIEMEIER, D.; CRUZ, C.E.F. Clinical and pathological
49 insights into Johne's disease in buffaloes. **Tropical Animal Health and Production**, v. 44,
50 p.1-5, 2012.

- 1
2 DRIEMEIER, D.; CRUZ, C.E.F.; GOMES, M.J.P.; CORBELLINI, L.G.; LORETTI, A.P.;
3 COLODEL, E.M. Aspectos clínicos e patológicos da paratuberculose em bovinos no Rio
4 Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.19, n.3-4, p.109-115, 1999.
5
6 DUPONT, O. Primeiro relato da doença de Johne's no Brasil [Nota] do **Jornal do Commercio**,
7 (Rio de Janeiro), de 5 de novembro, 1915.
8
9 ESPESCHIT, I.F.; SCHWARZ, D.G.; FARIA, A.C.S.; SOUZA, M.C.C.; PAOLICCHI, F.A.;
10 JUSTE, R.A.; CARVALHO, I.A.; MOREIRA, M.A.S. Paratuberculosis in Latin America: a
11 systematic review. **Tropical Animal Health and Production**, v. 49, n.8, p.1557-1576, 2017.
12
13 FAO - Food and Agriculture Organization. Food Outlook – Biannual Report on Global Food
14 Markers. Rome, 2020.
15
16 FECTEAU, M.E. Paratuberculosis in cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food
17 Animal Practice**, v.34, n.1, p.209-222, 2018.
18
19 FELLER, M.; HUWILER, K.; STEPHAN, R.; ALTPETER, E.; SHANG, A.; FURRER, H.;
20 PFYFFER, G.E.; JEMMI, T.; BAUMGARTNER, A.; EGGER, M. Mycobacterium avium
21 subspecies paratuberculosis and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. **The
22 Lancet. Infectious diseases**, v.7, n.9, p.607-6013, 2007.
23
24 FERNÁNDEZ, M., BENAVIDES, J., SEVILLA, I.A.; FUERTES, M.; CASTAÑO, P.;
25 DELGADO, L.; MARÍN, J.F.G.; GARRIDO, J.M.; FERRERAS, M.C.; PÉREZ, V.
26 Experimental infection of lambs with C and S-type strains of *Mycobacterium avium* subspecies
27 *paratuberculosis*: immunological and pathological findings. **Veterinary Research**, v.45, n.5,
28 2014.
29
30 FERREIRA, R., FONSECA, L., LILENBAUM, W. Detecção de anticorpos contra
31 *Mycobacterium paratuberculosis* em rebanhos bovinos do estado do Rio de Janeiro, Brasil.
32 **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.23, p.166-171, 2001.
33
34 FERREIRA, R.; FONSECA, L. S.; LILENBAUM, W. Agar gel immunodiffusion test (AGID)
35 evaluation for detection of bovine paratuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Letters in
36 Applied Microbiology**, v.35, n.3, p.173-175, 2002.
37
38 FERREIRA, R.; RISTOW, P.; MARASSI, C.D.; ROCHA, F.; OELEMANN, W.M.R.;
39 RODRIGUES, A.B.F.; SANTOS, A.S.O.; CARVALHO, E.C.Q.; CARVALHO, C.B.;
40 FONSECA, L.S.; LILENBAUM, W. Paratuberculose bovina em fazenda de produção leiteira
41 em Resende, Rio de Janeiro, Brasil. **22º Congresso Brasileiro de Microbiologia**,
42 Florianópolis, SC, 2003. (CD-Rom)
43
44 FISS, L.; SANTOS, B.L.; ALBUQUERQUE, P.P.F.; MOTA, R.A.; PEREIRA, C.M.;
45 ADRIEN, M.L.; SOARES, M.P.; SCHILD, A.L. Paratuberculose em bovinos de corte na região
46 Sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.35, n.5, p.437-442, 2015.
47
48 FONSECA, L.F.L.; OLIVAL, A.A.; PEREIRA, C.C.; HEINEMANN, M.B.;
49 RICHTZENHAIN, L.J.; SANTOS, M.V. Identificação de anticorpos anti-*Mycobacterium*
50 *paratuberculosis* em rebanhos bovinos leiteiros do Estado de São Paulo. **Arquivos da**

- 1 **Faculdade de Veterinária UFRGS**, v.28, n.1, p.51-56, 2000.
- 2
- 3 GARCIA, A. B.; SHALLOO, L. The economic impact and control of paratuberculosis in cattle.
- 4 **Journal of Dairy Science**, v.98, n.1, 2015.
- 5
- 6 GERRARD, Z.E.; SWIFT, B.M.C.; BOTSARIS, G.; DAVIDSON, R.S.; HUTCHINGS, M.R.;
- 7 HUXLEY, J.N.; REES, C.E.D. Survival of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*
- 8 in retail pasteurised milk. **Food Microbiology**, v.74, p.57-63, 2018.
- 9
- 10 GILARDONI, L.R.; PAOLICCHI, F.A.; MUNDO, S.L. Cattle Paratuberculosis: A Review of
- 11 the Advantages and Disadvantages of Different Diagnostic Tests, **Revista Argentina de**
- 12 **Microbiología**, v.44, p.201–215, 2012.
- 13
- 14 GOMES, M.J.P.; DRIEMEIER, D.; RIBEIRO, V.R.; WUNDER, JR. E.A.; ASANOME, W.;
- 15 LANZON, L.F.; WALD, V.B., Doença de Johne: Isolamento do *Mycobacterium avium* subsp.
- 16 *paratuberculosis* (Map) em um rebanho leiteiro infectado na região Sul do Brasil. **Acta**
- 17 **Scientiae Veterinariae**, v.30, p.113-118, 2002.
- 18
- 19 GREEN, E. P.; TIZARD, M. L. V.; MOSS, M. T.; THOMPSON, J.; INTERBOURNE, D. J.;
- 20 MCFADDEN, J. J.; HERMON-TAYLOR, J. Sequence and characteristics of IS900, an
- 21 insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium*
- 22 *paratuberculosis*. **Nucleic Acids Research**, v.17, p.9063–9073, 1989.
- 23
- 24 HARRIS, N.B., BARLETTA, R.G. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in
- 25 Veterinary Medicine. **Clinical Microbiology**, v.14, n.6, p. 489 -512, 2001.
- 26
- 27 HOLTH, H. Reinzeichnung des bacillus der spezifischen chronischen darmentzündung des
- 28 rindes (paratuberkelbazillus). **Zeitung Infect Krankheiten**, v.11, p.378–387, 1912.
- 29
- 30 JANAGAMA, H.K.; JEONG, K.I.; KAPUR V, COUSSENS P, SREEVATSAN S. Cytokine
- 31 responses of bovine macrophages to diverse clinical *Mycobacterium avium* subspecies
- 32 *paratuberculosis* strains. **BMC Microbiology**, v.6, n.10, 2006.
- 33
- 34 JOHNE, H.A.; FROTHINGHAM, L. Ein eigenthümlicher Fall von Tuberculose beim Rind.
- 35 **Deutsche Zeitschrift für Tiermedizin und Vergleichend Pathologie**, v.21, p.438-454, 1895.
- 36
- 37 JOHNSON-IFEARULUNDU, Y.; KANEENE, J.B. Distribution and environmental risk
- 38 factors for paratuberculosis in dairy cattle herds in Michigan. **American Journal of Veterinary**
- 39 **Research**, v.60, n.5, p.589-596, 1999.
- 40
- 41 KAWAJI, S.; TAYLOR, D.L.; MORI, Y. Detection of *Mycobacterium avium* subsp.
- 42 *paratuberculosis* in ovine faeces by direct quantitative PCR has similar or greater sensitivity
- 43 compared to radiometric culture. **Veterinary Microbiology**, v.125, p.36-48, 2007.
- 44
- 45 KOETS, A.P.; EDA, S.; SREEVATSAN, S. The within host dynamics of *Mycobacterium*
- 46 *avium* ssp. *paratuberculosis* infection in cattle: where time and place matter. **Veterinary**
- 47 **Research**, v.46, n.61, 2015.
- 48
- 49 LAMONT, E.A.; BANNANTINE, J.P.; ARMIÉN, A.; ARIYAKUMAR, D.S.;
- 50 SREEVATSAN, S. Identification and Characterization of a Spore-Like Morphotype in

- 1 Chronically Starved *Mycobacterium avium* Subsp. *Paratuberculosis* Cultures. PLOS ONE, v.7,
2 n.1, e30648, 2012.
3
- 4 LILENBAUM, W.; MARASSI, C.D.; OELEMANN, W.M.R. Paratuberculosis: na update.
5 **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, n.4, p.580-590, 2007.
6
- 7 LOMBARD, J. E. Epidemiology and economics of paratuberculosis. **Veterinary Clinics of**
8 **North America: Food Animal Practice**, v.27, p.525–535, 2011.
9
- 10 MAGOMBEDZE, G.; NGONGHALA, C.N.; LANZAS, C. Evaluation of the “Iceberg
11 Phenomenon” in Johne's Disease through Mathematical Modelling. **Plos one**, v. 8, n.11, 2013.
12
- 13 MACKAY, I.M. Real-time PCR in the microbiology laboratory. **Clinical Microbiology and**
14 **Infection**, v.10, p.190–212, 2004.
15
- 16 MAPA, Ministério de agricultura, pecuária e abastecimento. Instrução Normativa nº 50, de 24
17 de setembro de 2013. Brasil, 2013.
18
- 19 MANNING, E.J.B.; COLLINS, M.T. *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*: pathogen,
20 pathogenesis and diagnosis. *Revue Scientifique et Technique*, v.20, p.133-150, 2001.
21
- 22 MAROUDAM, V.; MOHANA SUBRAMANIAN, B.; PRAVEEN KUMAR, P.; DHINAKAR
23 RAJ, G. Paratuberculosis: Diagnostic Methods and their Constraints. **Journal of Veterinary**
24 **Science & Technology**, v.6, 2592015, 2015.
25
- 26 MCALOON, C.G.; DOHERTY, M.L.; WHYTE, P.; MORE, S.J.; O’GRADY, L.; CITER, L.;
27 GREEN, M.J. Relative importance of herd-level risk factors for probability of infection with
28 paratuberculosis in Irish dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v.100, p.1–13, 2017.
29
- 30 MCALOON, C.G.; ROCHE, S.; RITTER, C.; BARKEMA, H.W.; WHYTE, P.; MORE, S.J.;
31 O’GRADY, L.; GREEN, M.J.; DOHERTY, M.L. A review of paratuberculosis in dairy herds –
32 Part 1: Epidemiology. **The Veterinary Journal**, 246, 59-65, 2019.
33
- 34 MCNEES, A.L.; MARKESICH, D.; ZAYYANI, N.R.; GRAHAM, D.Y. *Mycobacterium*
35 *paratuberculosis* as a cause of Crohn’s disease. **Expert Review of Gastroenterology &**
36 **Hepatology**, v.9, p.1523-1534, 2015.
37
- 38 MEDEIROS, J.M.A.; JUNIOR, F.G.; MATOS, R.A.T.; COSTA, V.M.M.; RIET-CORREA, F.
39 Frequência de anticorpos para paratuberculose em bovinos no semi-árido paraibano. **Pesquisa**
40 **Veterinária Brasileira**, v.32, p.697-700, 2012.
41
- 42 MENDOZA, J.L.; SAN-PEDRO, A.; CULEBRAS, E.; CIES, R.; TAXONERA, C.; LANA, R.;
43 URCELAY, E.; TORRE, F.; PICAZO, J.J.; DIAZ-RUBIO, M. High prevalence of viable
44 *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Crohn’s disease. **World Journal of**
45 **Gastroenterology**, v. 16, n.36, p.4558-63, 2010.
46
- 47 MORTIER, R.A.R.; BARKEMA, H.W.; BYSTROM, J.M.; ILLANES, O.; ORSEL, K.;
48 WOLF, R.; ATKINS, G.; DE BUCK, J. Evaluation of age-dependent susceptibility in calves
49 infected with two doses of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* using pathology
50 and tissue culture. **Veterinary Research**, v. 44, n.94, 2013.

- 1
2 MOTA, R.A.; PEIXOTO, P.V.; YAMASAKI, E.M.; MEDEIROS, E.S.; COSTA, M.M.;
3 PEIXOTO, R.M.; BRITO, M.F. Ocorrência de paratuberculose em búfalos (*Bubalus bubalis*)
4 em Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.3, p.237-242, 2010.
5
6 MOTA, R.A.; PINHEIRO-JUNIOR, J.W.; GOMES, M.J.P.; PEIXOTO, R.M.; MAIA, C.L.;
7 BRITO, M.F.; CHIES, J.A.B.; SNEL, G.G.M.; BERCHT, S.; JUFFO, G.D. Paratuberculose em
8 um rebanho leiteiro no Estado de Pernambuco, PE. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.74,
9 p.73-79, 2007.
10
11 NASER, S.A.; GHOBRIAL, G.; ROMERO, C.; VALENTINE, J.F. Culture of *Mycobacterium*
12 *avium* subspecies *paratuberculosis* from the blood of patients with Crohn's disease. **The**
13 **Lancet**, v.364, p.1039-1044, 2004.
14
15 NIELSEN, S.S.; TOFT, N. *Ante mortem* diagnosis of paratuberculosis: a review of accuracies
16 of ELISA, interferon- γ assay and faecal culture techniques. **Veterinary Microbiology**, v. 129,
17 n.1, p.217-235, 2008.
18
19 O'BRIEN, R.; MACKINTOSH, C. G.; BAKKER, D.; KOPECNA, M.; PAVLIK, I.; GRIFFIN,
20 J. F.T. Immunological and Molecular Characterization of Susceptibility in Relationship to
21 Bacterial Strain Differences in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Infection in the
22 Red Deer (*Cervus elaphus*). **Infection and Immunity**, v.74, n.6, p. 3530–3537, 2010.
23
24 OIE. The Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 544-559, 2019.
25
26 OKURA, H.; TOFT, N.; NIELSEN, S.S. Occurrence of *Mycobacterium avium* subsp.
27 *paratuberculosis* in milk at dairy cattle farms: A systematic review and meta-analysis,
28 **Veterinary Microbiology**, v.157, n.3-4, p.253-263, 2012.
29
30 PARK, H.T.; YOO, H.S. Development of vaccines to *Mycobacterium avium* subsp.
31 *paratuberculosis* infection. **Clinical and Experimental Vaccine Research**, v.5, n.2, p.108-
32 116, 2016.
33
34
35 PIERCE, E.S. Ulcerative colitis and Crohn's disease: is *Mycobacterium avium* subspecies
paratuberculosis the common villain? **Gut Pathogens**, v.2, n.1, 2010.
36
37 POESTER, F.P.; RAMOS, E.T. Infecção experimental em caprinos com *Mycobacterium*
38 *paratuberculosis* de origem bovina. **Ciência Rural**, v.24, p.333- 337, 1994.
39
40 PORTUGAL, M.A.S.C.; PIMENTEL, J.N.; SALIBA, A.M.; BALDASSI, L.; SANDOVAL,
41 E.F.D. Ocorrência de paratuberculose no Estado de Santa Catarina. **O Biológico**, v.4, p.19-24,
42 1979.
43
44 POUPART, P.; COENE, M.; HEUVERSWYN, H. V.; COCITOI, C. Preparation of a Specific
45 RNA Probe for Detection of *Mycobacterium paratuberculosis* and Diagnosis of Johne's
46 Disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, n.6, p.1601-1605, 1993.
47
48 RAMOS, E.T.; POESTER, F.P.; CORREA, B.L.; OLIVEIRA, S.J.; RODRIGUES, N.C.;
49 CANABARRO, C.E. Paratuberculose em bovinos no estado do Rio Grande do Sul. **A hora**
50 **Veterinária**, v.6, n.34, p.28-32, 1986.

- 1
2 RANGEL, S.J.; PARÉ, J.; DORÉ, E.; ARANGO, J.C.; CÔTÉ, G.; BUCZINSKI, S.;
3 LABRECQUE, O.; FAIRBROTHER, J.H.; ROY, J.P.; WELLEMANS, V.; FECTEAU, G. A
4 systematic review of risk factors associated with the introduction of *Mycobacterium avium* spp.
5 *paratuberculosis* (MAP) into dairy herds. **The Canadian veterinary journal**, v.56, n.2, p.169–
6 177, 2015.
- 7
8 RISTOW, P.; MARASSI, C.D.; RODRIGUES, A.B.F.; OELEMANN, W.M.; ROCHA, F.;
9 SANTOS, A.S.O.; CARVALHO, E.C.Q.; CARVALHO, C.B.; FERREIRA, R.; FONSECA,
10 L.S.; LILENBAUM, W. Diagnosis of paratuberculosis in a dairy herd native to Brazil. **The**
11 **Veterinary Journal**, v.174, n.2, p.432-434, 2007.
- 12
13 RIVEIRA, F.E.B. Levantamento sorológico utilizando-se a técnica ELISA em rebanhos
14 apresentando problemas reprodutivos. I. Enterite paratuberculose. **Anais Encontro de**
15 **Laboratórios de Diagnóstico Veterinário do Cone Sul**. Campo Grande, MS, p.20-22, 1996.
- 16
17 SÁ, L.M.; OLIVEIRA, J.M.B.; SANTOS, G.R.; BRANDESPIM, D.F.; SILVA JÚNIOR, J.L.;
18 MOTA, R.A.; PINHEIRO JÚNIOR, E.J.W.; Avaliação sorológica e de fatores de risco para a
19 infecção por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* em rebanhos leiteiros da
20 Microrregião de Garanhuns, Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n.3, p.310-
21 313, 2013.
- 22
23 SANTOS, J.A.; SILVA, N.I. Sobre a 1ª observação de paratuberculose no Brasil. **Boletim da**
24 **Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária**, v.24, n.5-14, 1956.
- 25
26 STABEL, J.R.; PALMER, M.V.; WHITLOCK, R.H. Immune responses after oral inoculation
27 of weanling bison or beef calves with a bison or cattle isolate of *Mycobacterium avium* subsp.
28 *paratuberculosis*. **Journal of Wildlife Disease**, v.39, n.3, p.545-555, 2003.
- 29
30 STABEL, J.R.; PALMER, M.V.; HARRIS, B., PLATTNER, B., HOSTETTER, J., ROBBE-
31 AUSTERMAN, S. Pathogenesis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in neonatal
32 calves after oral or intraperitoneal experimental infection. **Veterinary Microbiology**, v.136,
33 n.3–4, p. 306-313, 2009.
- 34
35 STEVENSON, K. Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and
36 the influence of strain type on infection and pathogenesis: a review. **Veterinary research**, v.
37 46, n.1, p. 64, 2015.
- 38
39 STROMMINGER, B.; STEVENSON, K.; GERLACH, G.F. Isolation and diagnostic potential
40 of ISMav2, a novel insertion sequence-like element from *Mycobacterium avium* subspecies
41 *paratuberculosis*. **FEMS Microbiology Letters**, v.196, n.1, p.31–37, 2001.
- 42
43 SWEENEY, R.W. Pathogenesis of Paratuberculosis. **Veterinary Clinics: Food Animal**
44 **Practice**, v.27, p.537–546, 2011.
- 45
46 THIBAUT, V.; BRYANT, J.; HARRIS, S.; BENTLEY, S.; SMITH, D.; MC LUCKIE, J.;
47 PARKHILL, J.; STEVENSON, K. Genome sequencing to identify phylogenetic diversity and
48 single nucleotide polymorphisms in *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. In:
49 **Proceedings of the Eleventh International Colloquium on Paratuberculosis**, International
50 Association for Paratuberculosis: Sydney, 2012.

- 1
2 TWORT F.W.; INGRAM G.L. A Method for Isolating and Cultivating the Mycobacterium
3 enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis Johne and some Experiments on the Preparation
4 of a Diagnostic Vaccine for Pseudo-tuberculous Enteritis of Bovines. **Proceedings of The**
5 **Royal Society of London**, v.84, p.517-543, 1912.
6
- 7 VERDUGO, C.; VALDES, M.F.; SALGADO, M. Herd level risk factors for Mycobacterium
8 avium subsp. paratuberculosis infection and clinical incidence in dairy herds in Chile.
9 **Preventive Veterinary Medicine**, v.176, 104888, 2020.
10
- 11 VERNA, A.E.; GARCIA-PARIENTE, C.; MUÑOZ, M.; MORENO, O.; GARCÍA-MARIN,
12 J.F.; ROMANO, M.I.; PAOLICCHI, F.; PÉREZ, V. Variation in the immuno-pathological
13 responses of lambs after experimental infection with different strains of *Mycobacterium avium*
14 subsp. *paratuberculosis*. **Zoonoses and Public Health**, v.54, p.243–252, 2007.
15
- 16 VILAR, A.L.T.; SANTOS, C.S.A.B.; PIMENTA, C.L.R.M.; FREITAS, T.D.; BRASIL,
17 A.W.L.; CLEMENTINO, I.J.; ALVES, C.J.; BEZERRA, C.S.; F. RIET-CORREA,
18 OLIVEIRA, T.S.; AZEVEDO, S.S. Herd-level prevalence and associated risk factors for
19 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cattle in the State of Paraíba, Northeastern
20 Brazil. **Preventive Veterinary Medicina**, v.121, n.1, p.49-55, 2015.
21
- 22 WINDSOR, P.A.; WHITTINGTON, R.J. Evidence for age susceptibility of cattle to Johne's
23 disease. **The Veterinary Journal**, v.184, p.37-44, 2010.
24
- 25 WHILEY, H.; KEEGAN, A.; GIGLIO, S.; BENTHAM, R. *Mycobacterium avium* complex –
26 the role of potable water in disease transmission. **Journal of Applied Microbiology**, v.113,
27 p.223–232, 2012.
28
- 29 WHITTINGTON, R.; MARSH, I.; CHOY, E.; COUSINS, D. Polymorphisms in IS1311, an
30 insertion sequence common to *Mycobacterium avium* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*,
31 can be used to distinguish between and within these species. **Molecular and Cellular Probes**,
32 v.12, n.6, p.349-358, 1998.
33
- 34 WHITTINGTON, R.J.; MARSH, I.B.; WHITLOCK, R.H. Typing of IS 1311 polymorphisms
35 confirms that bison (*Bison bison*) with paratuberculosis in Montana are infected with a strain
36 of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* distinct from that occurring in cattle and other
37 domesticated livestock. **Molecular and Cellular Probes**, v.15, n.3, p.139-145, 2001.
38
- 39 WHITTINGTON, R.; DONAT, K.; WEBER, M.F.; KELTON, D.; NIELSEN, S.S.;
40 EISENBERG, S. *et al.* Control of paratuberculosis: who, why and how. A review of 48
41 countries. **BMC Veterinary Research**, v.15, n.198, 2019.
42
- 43 YAMASAKI, E.M.; TOKARNIA, C.H.; GALVÃO, A.; GOMES, M.J.P.; CHIES, J.A.B.;
44 VEIT, T.D.; ARAGÃO, A.P.; BRITO, M.F. Aspectos clínicos patológicos e controle da
45 paratuberculose em rebanho bovino leiteiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, p.921-932,
46 2010.
47
- 48 YAMASAKI, E.M.; BRITO, M.F.; MOTA, R.A.; MCINTOSH, D.; TOKARNIA, C.H.
49 Paratuberculose em ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n.2, p.127-
50 140, 2013.

- 1
2 ZAREI-KORDSHOULI, F.; GERAMIZADEH, B.; KHODAKARAM-TAFTI, A. Prevalence
3 of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* IS 900 DNA in biopsy tissues from
4 patients with Crohn's disease: histopathological and molecular comparison with Johne's
5 disease in Fars province of Iran. **BMC Infectious disease**, v.19, n.23, 2019.
6
7 ZAREI-KORDSHOULI, F.; GERAMIZADEH, B.; KHODAKARAM-TAFTI, A. Prevalence
8 of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* IS 900 DNA in biopsy tissues from
9 patients with Crohn's disease: histopathological and molecular comparison with Johne's
10 disease in Fars province of Iran. **BMC Infectious disease**, v.19, n.23, 2019.

1 4 HIPÓTESE

2 Há vacas com anticorpos contra o *Mycobacterium avium* subsp.
3 *paratuberculosis* e com infecção ativa e eliminação fecal da micobactéria, em fazendas leiteiras
4 da bacia leiteira dos Campos Gerais, no estado do Paraná, Brasil.

5

6

1 **5 OBJETIVOS**

2

3 5.1 OBJETIVO GERAL

4

5 Investigar as formas de ocorrência e os fatores de risco associados à
6 paratuberculose em vacas da bacia leiteira dos Campos Gerais, Paraná, Brasil.

7

8 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

9

10 Avaliar a presença de anticorpos anti-MAP em amostras de soro de vacas
11 leiteiras utilizando o teste de ELISA

12

13 Avaliar a presença do MAP em amostras de fezes de vacas previamente
14 positivas no teste de ELISA pelo método de PCR quantitativo

15

16 Identificar os fatores associados à ocorrência da paratuberculose em rebanhos
17 na bacia leiteira dos Campos Gerais, Paraná, Brasil.

1 6 ARTIGO

2

3 **Ocorrência de paratuberculose em vacas leiteiras de alta produção no Paraná, Brasil**

4 **Occurrence of paratuberculosis in high-producing dairy cows in Paraná, Brazil**

5

6 **Resumo**

7 Este é o primeiro estudo observacional transversal sobre paratuberculose em vacas leiteiras de
8 alta produção do estado do Paraná, Brasil. O objetivo foi identificar rebanhos com vacas
9 sororreagentes contra *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), com ou sem
10 eliminação fecal da micobactéria, e os fatores de risco associados com a doença. Antes das
11 coletas, foi aplicado um questionário epidemiológico contendo questões sobre o rebanho e
12 manejo das propriedades para identificação dos fatores associados à paratuberculose. Amostras
13 de sangue e de fezes foram coletadas de 708 vacas, maiores do que 2 anos, em 54 rebanhos
14 distribuídos em cinco municípios da bacia leiteira dos Campos Gerais, Paraná, Brasil, entre
15 outubro de 2019 e janeiro de 2020. As amostras de soro foram submetidas ao Ensaio
16 Imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos contra MAP. As vacas positivas no teste
17 de ELISA, e 31 vacas negativas, tiveram as fezes analisadas por PCR em tempo real (qPCR).
18 Os rebanhos foram considerados positivos com a presença de pelo menos uma vaca
19 sororreagente. A soroprevalência em rebanhos foi de 61,1% (33/54; IC 95%: 46,88 - 74,08%),
20 variando entre 12,5% e 80% entre os municípios. A prevalência de vacas sororreagentes foi de
21 9,8% (69/708; IC 95%: 7,77 - 12,15%) e a frequência variou de 5% e 87,5% entre os rebanhos.
22 Apenas uma amostra de fezes foi positiva no qPCR e representou 1,45% (1/69) das vacas
23 sororreagentes, concluindo que a concordância entre os resultados dos dois métodos foi baixa.
24 A introdução de animais oriundos de outras propriedades leiteiras foi considerado o único fator
25 de risco (OR: 2,45; IC 95%: 1,03 – 5,85) para a ocorrência de paratuberculose. Os resultados
26 obtidos permitem sugerir que o MAP está presente entre os rebanhos da bacia leiteira dos
27 Campos Gerais, Paraná, Brasil e possui baixa prevalência de infecção ativa entre as vacas.

28 *Palavras-chave:* doença de Johne, diarreia crônica, ELISA, qPCR, *Mycobacterium avium*
29 subsp. *paratuberculosis*.

30

31 **Abstract**

32 This is the first cross-sectional study about paratuberculosis in high-producing dairy cows in
33 the state of Paraná, Brazil. The objective was to identify herds with sororreagent dairy cows
34 against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), with or without fecal

1 elimination of mycobacteria, and the risk factors associated with the disease. An
2 epidemiological questionnaire was applied before the collections, containing questions about
3 the herd and management of the properties to identify the factors associated with
4 paratuberculosis. Blood and feces samples were collected from 708 dairy cows, older than 2
5 years, in 54 herds distributed in five cities of Campos Gerais dairy basin, Paraná, Brazil between
6 october of 2019 and january of 2020. The serum samples were analyzed by Enzyme-linked
7 immunosorbant assay (ELISA) to detect antibody against MAP. The positive cows in ELISA,
8 and thirty negative cows, had their feces analyzed by real-time PCR (qPCR). One herd was
9 considered positive with the presence of at least one serorreagent cow. The herd-level
10 prevalence was 61.1% (33/54; 95%CI = 46.88 - 74.08%), ranged from 12.5% to 80% among
11 the cities. The animal-level prevalence was 9.8% (69/708; 95%CI: 7.77 - 12.15%) and the
12 frequency per herds ranged from 5% to 87.5%. Only one feces sample was positive in qPCR,
13 representing 1.45% (1/69) of the sororreagent dairy cows, concluding that the agreement
14 between the results of the two methods was low. The introduction of animals from other dairy
15 farms was identified as the only risk factor (OR = 2.45; CI95%: 1,03-5,85) for the occurrence
16 of paratuberculosis. These results suggest that MAP is present among herds in the dairy basin
17 of Campos Gerais, Paraná, Brazil and has low level of active infection in cows.

18 *Keywords:* Johne's disease, chronic diarrhea, ELISA, qPCR, *Mycobacterium avium* subsp.
19 *paratuberculosis*.

20

21 **Introdução**

22 A paratuberculose (doença de Johne) é uma doença infectocontagiosa, incurável,
23 caracterizada por enterite granulomatosa que acomete, de forma crônica, ruminantes e outros
24 mamíferos domésticos e selvagens, sendo muito relevante em bovinos leiteiros (Behr e Collins,
25 2010; Fecteau, 2018). É causada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP),
26 um bacilo álcool-ácido resistente, que tem a capacidade de sobreviver em macrófagos (Fecteau,
27 2018). A principal via de transmissão é a oro-fecal em ambientes contaminados com MAP e a
28 idade torna os bovinos mais resistentes à infecção (Windsor e Whittington, 2010). Os sinais
29 clínicos variam com a progressão da doença e são classicamente, diarréia crônica,
30 emagrecimento progressivo e diminuição na produção leiteira (Fecteau, 2018). A
31 paratuberculose tem longo período de latência, e os sinais clínicos podem não ocorrer ou
32 desenvolvem-se a partir dos 3 anos de idade (Behr; Collins, 2010).

33 Os métodos diagnósticos disponíveis variam de acordo com a fase clínica ou subclínica
34 da infecção. Nos bovinos doentes, pode-se realizar a detecção do agente nas fezes ou em tecidos

1 coletados no exame necroscópico, empregando-se isolamento por meio de cultura ou detecção
2 do DNA por meio da reação em cadeia de polimerase (PCR). Os testes sorológicos são
3 indicados para a identificação de animais na fase subclínica da paratuberculose, e os métodos
4 disponíveis são o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), a imunodifusão em gel de ágar
5 e o teste de fixação de complemento (OIE, 2019; Nielsen e Toft, 2008).

6 A paratuberculose tem distribuição mundial (OIE, 2019) e causa prejuízos econômicos
7 significantes, seja pela redução da produção leiteira ou pelo descarte das vacas (Raizman et al.,
8 2007), e nos Estados Unidos considera-se que os prejuízos para a indústria leiteira variam entre
9 200 e 1500 milhões de dólares por ano (Garcia e Shalloo, 2015). Não é uma zoonose
10 comprovada (OIE, 2019), no entanto, existem evidências de que MAP pode estar relacionado
11 com a ocorrência da doença de Crohn nos humanos, o que reforça a importância dos estudos
12 sobre a paratuberculose (Mcneese et al., 2015).

13 As taxas de soroprevalência em bovinos leiteiros dos Estados Unidos e do Canadá
14 variaram entre 1,3% e 17,1% (Tiwari et al., 2006), enquanto, em países europeus a prevalência
15 média foi de 20% (Nielsen e Toft, 2008). Nos países da América Latina, entre os anos de 1994
16 e 2012, a prevalência de vacas sororreagentes contra MAP variou entre 2,7% e 72,1%
17 (Fernández-Silva et al., 2014; Espeschit et al., 2017). Levantamentos sobre distribuição e
18 frequência de paratuberculose no Brasil vêm sendo realizados em maior número nas últimas
19 duas décadas e abrangeram 12 dos 39 estados da federação (Yamasaki et al., 2013; Villar et al.,
20 2015). Nos estudos brasileiros a soroprevalência da paratuberculose, em bovinos leiteiros,
21 variou entre 2,7% (Sá et al., 2013) e 60,4% (Acypreste et al., 2005).

22 A bovinocultura leiteira é uma atividade comercial importante no Brasil, e o país é o
23 quinto maior produtor de leite do mundo (FAO, 2020). O estado do Paraná é o segundo maior
24 produtor de leite do país (Brasil, 2019a) e possui algumas bacias leiteiras relevantes,
25 destacando-se a dos Campos Gerais que apresenta propriedades leiteiras altamente tecnificadas
26 e vacas com índices de produtividade marcadamente elevados. Apesar de sua relevância
27 econômica, não há informações sobre a ocorrência e a situação epidemiológica da
28 paratuberculose neste estado. Este estudo teve como objetivo, portanto, identificar a presença
29 de animais sororreagentes, com ou sem eliminação fecal de MAP, e os fatores de risco
30 associados à ocorrência da paratuberculose em vacas criadas na bacia leiteira dos Campos
31 Gerais do estado do Paraná, Brasil.

33 **Material e métodos**

34 Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade

1 Estadual de Londrina (CEUA/UUEL), sob o processo de nº 11021.2019.33.

2

3 *Caracterização da área de estudo*

4 As vacas incluídas no estudo eram criadas em propriedades leiteiras localizadas na
5 mesorregião centro-oriental do Paraná, nos municípios de Arapoti (24°09'28"S, 49°49'37"O),
6 Castro (24°47'32"S, 50°0'42"O), Carambeí (24°55'04"S, 50°05'50"O) , Palmeira (25°25'44" S,
7 50°0'21"O) e Ponta Grossa (25°5'40"S, 50°9'48"O), os quais compõem a bacia leiteira dos
8 Campos Gerais, estado do Paraná, Brasil.

9

10 *Amostragem*

11 O número de amostras avaliadas foi calculado com o programa computacional EpiInfo
12 7.4.2.0 (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Geórgia, EUA). Para o cálculo
13 amostral, admitiu-se o total de vacas ordenhadas dos municípios de Arapoti, Castro, Carambeí,
14 Palmeira e Ponta Grossa (63,5 mil animais), segundo informação do Censo Agropecuário de
15 2017 (Brasil, 2019b). Estimou-se a prevalência da paratuberculose em 50%, pois, não havia
16 dados sobre a ocorrência da doença no estado do Paraná, considerou-se o Design Effect de 1,5,
17 e admitiu-se o nível de significância de 95% (Thrusfield, 2018). Com base no resultado e
18 garantindo uma margem de segurança, foram coletadas amostras de 708 vacas.

19 A Tabela 1 apresenta a distribuição dos rebanhos, das vacas ordenhadas e das vacas
20 coletadas para o estudo de acordo com os municípios. O número de rebanhos estudados foi 54,
21 correspondendo a aproximadamente 3% do total de rebanhos, e a escolha deles foi por
22 conveniência. O número de coletas em cada município foi definido pelo método de alocação
23 proporcional (Thrusfield, 2018) considerando-se o total de vacas ordenhadas, o que
24 correspondeu a aproximadamente 1% do total. O número de vacas estudadas por rebanho variou
25 de acordo com o município e foi condicionado ao número de propriedades em que foi possível
26 realizar coletas. Dentro de cada município, o número de vacas coletadas por rebanho foi
27 idêntico. Os critérios de inclusão das vacas foram estar aparentemente saudáveis, com idade
28 superior a 24 meses, lactantes ou não, e fora do período de transição. Vacas que tivessem
29 histórico de diarreia crônica e/ou emagrecimento progressivo deveriam ser incluídas. Vacas que
30 estivessem apresentando diarreia no dia da coleta ou que tivessem apresentado na semana
31 anterior também foram incluídas.

Tabela 1

Tamanho da amostra de rebanhos e vacas de alta produção coletados para o estudo da paratuberculose em municípios da bacia leiteira dos Campos Gerais, estado do Paraná, Brasil, realizado entre outubro de 2019 e janeiro de 2020.

Município	Total de rebanhos*	Rebanhos estudados	% do total de rebanhos	Vacas*		Vacas amostradas		%†	Vacas/rebanho
				n	%	n	%		
Arapoti	204	11	5,4	7791	12,3	120	16,9	1,5	10 a 11
Carambeí	139	10	7,2	14654	23,0	191	27,0	1,3	19 a 20
Castro	769	15	2,0	31184	49,1	293	41,4	0,9	17 a 20
Palmeira	357	10	2,8	7662	12,1	80	11,3	1,0	8
Ponta Grossa	160	8	5,0	2240	3,5	24	3,4	1,1	3
Total	1629	54	3,3	63531	100	708	100	1,1	

* Censo Agropecuário de 2017 (Brasil, 2019b)

† Percentual de vacas amostradas em relação ao total de vacas no município.

1 Coleta de fezes e sangue

2 O período de realização das coletas foi de outubro de 2019 até janeiro de 2020. Antes
3 da realização das coletas aplicou-se um questionário epidemiológico padronizado, em cada um
4 dos rebanhos visitados, contendo questões sobre o rebanho e o manejo e sobre a ocorrência de
5 manifestações compatíveis com a doença. As vacas foram contidas em canzils para facilitar a
6 coleta das amostras de fezes (100g) e de sangue.

7 As amostras de sangue foram coletadas da veia caudal com agulha hipodérmica à vácuo
8 (30x0,8mm) em tubos sem anticoagulante. Após a coleta, os tubos foram mantidos na posição
9 vertical até a retração total do coágulo, e posteriormente centrifugados por 10 minutos (1500 ×
10 g) para obtenção do soro sanguíneo, os quais foram armazenados em microtubos do tipo
11 *Eppendorf*. Após a obtenção do soro as amostras foram conservadas a -20° C até o momento da
12 realização das análises laboratoriais. As amostras de fezes foram coletadas diretamente da
13 ampola retal, armazenadas e identificadas em microtubos do tipo *Eppendorf* e conservadas a -
14 20° C.

15

16 Diagnóstico sorológico

17 As amostras de soro foram submetidas à realização de teste de ELISA utilizando-se o
18 *kit* para detecção de anticorpos contra o MAP (IDEXX Paratuberculosis Screening, IDEXX
19 Laboratories, Inc., Westbrook, Maine, EUA) conforme orientações do fabricante. As reações
20 foram consideradas válidas quando a média dos controles positivos (CPx) apresentou valor
21 mínimo médio de 0,350 e quando a relação entre o CPx e o controle negativo foi igual ou maior
22 que 3. Os valores de densidade óptica das amostras e dos controles foram substituídos na

1 fórmula definida pelo fabricante e os resultados classificaram as amostras em negativas e
2 positivas. As amostras com resultado de percentagem menor que 55% para a presença de
3 anticorpos contra MAP foram consideradas negativas e as com resultados maiores ou iguais a
4 55% foram definidas como positivas. As amostras positivas e as que tiveram resultado próximo
5 de 55% foram analisadas em duplicata.

6

7 *PCR em tempo real (qPCR)*

8 As vacas positivas no teste de ELISA (n=69) e negativas (n=31) selecionadas por sorteio
9 tiveram as fezes analisadas por PCR em tempo real (qPCR) para detecção da sequência de
10 inserção 900 (IS900) do genoma do MAP. A extração do DNA das fezes foi realizada por meio
11 do *kit* de extração Qiamp DNA Stool Mini-Kit (Qiagen, Hilden, Mettmann, Alemanha),
12 conforme instruções do fabricante.

13 Após as extrações do DNA, as reações de amplificação do qPCR foram realizadas em
14 volume final total de 25 μ L, sendo 2,5 μ L de DNA extraído, 12,5 μ L de Platinum SYBR®
15 Green qPCR SuperMix (Invitrogen Corporation, Carlsbad, Califórnia, EUA), 0,125 μ L de 100
16 pMol de *primers* específicos para IS900 (DF: 5'-ATGCGCCACGACTTGCAGCCT-3' e o DR:
17 5'-GGCACGGCTCTTGTTGTAGTCG-3') e 9,75 μ L de água ultrapura estéril (Kawaji et al.,
18 2007). As reações foram feitas em triplicada no equipamento 7500 Real time PCR System
19 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). As etapas da reação consistiram
20 em desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95°C
21 por 30 segundos e anelamento e extensão a 68°C por 1 minuto, seguidos pela curva de
22 desnaturação (*melting curve*). O controle positivo utilizado foi gentilmente fornecido pelo
23 pesquisador Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota, do Laboratório de Medicina Veterinária
24 Preventiva da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Para o controle negativo foi utilizada
25 água ultrapura estéril.

26

27 *Questionário epidemiológico*

28 Os dados obtidos no questionário epidemiológico foram utilizados para análise dos
29 fatores associados à presença de animais sororreagentes nos rebanhos analisados. Os fatores
30 analisados e as categorias respectivas foram: número de ordenhas diárias (duas ou três), tipo de
31 manejo (intensivo, semi-intensivo e extensivo), raças (Holandesa ou Jersey), introdução de
32 animais no rebanho provenientes de outras propriedades rurais (sim ou não), utilização de
33 piquete de maternidade (coletivo ou individual), uso de esterqueira (sim ou não), contato dos
34 animais com as fezes (sim ou não), ocorrência de diarreia nas vacas (sim ou não), uso de

1 *compost barn* (sim ou não), tipo de cama (areia, maravalha, *compost* ou colchão de borracha e
2 espuma), fornecimento do colostro (mamadeira ou mamada natural), tempo de permanência do
3 bezerro com a mãe após o nascimento (<1 hora, 1-12 horas e >12 horas), número total de
4 animais no rebanho (<200, 200 a 500 e >500), número de vacas em lactação (<100, 100 a 300
5 e >300), e produção diária de leite por vaca (>30 litros ou <30 litros).

6

7 *Análise estatística*

8 Um rebanho foi considerado positivo quando confirmada a presença de anticorpos em
9 pelo menos uma vaca testada. A prevalência e intervalo de confiança foram calculados. A
10 análise estatística foi realizada considerando-se rebanhos (n=54) e vacas (n=708) em separado.
11 Para a análise univariada utilizou-se o teste do Qui-quadrado ou o teste de Fischer para verificar
12 que fatores estavam associados à presença de sororreagentes, empregando-se o programa
13 SigmaPlot for Windows 13.0 (Systat Software Inc., San Jose, California, EUA). As variáveis
14 com o $P \leq 0,20$ foram submetidas à regressão logística multinomial para definição dos fatores
15 de risco ou de proteção, empregando-se o programa SPSS (International Business Machines
16 Corporation, Armonk, Nova York, EUA) e admitindo-se nível de significância de 95%.

17

18 **Resultados**

19 Os rebanhos estudados eram compostos por números medianos de 251 animais (33 a
20 3.773) e de 133 vacas lactantes (19 a 1771), e por bovinos das raças Holandesa (83,3%; 45/54)
21 e Jersey (12,9%; 7/54) ou mestiços (3,7%; 2/54). A produção diária de leite variava entre 308
22 e 72.256 litros, com mediana de 4.038 litros, o que representava variação de 14 a 42 litros de
23 leite por vaca, com mediana de 32 litros ($30,9 \pm 7,1$ L/vaca/dia). A maioria das propriedades
24 realizava duas ordenhas diárias (75,9%; 41/54) e o restante realizava três ordenhas (24,1%;
25 13/54). O manejo intensivo em sistemas de *free stall* ou de *compost barn* era adotado em,
26 respectivamente, 46,3% (25/54) e 12,9% (7/54) das propriedades. O sistema de manejo semi-
27 intensivo, caracterizado por confinamento em barracões durante o dia e permanência a pasto
28 durante a noite, era adotado em 33,4% (18/54) das propriedades. Somente em quatro
29 propriedades as vacas eram mantidas exclusivamente em pastagens.

30 Em todas as fazendas, a limpeza das instalações era realizada diariamente e o uso de
31 esterqueira para recolhimento das fezes era praticado na maioria delas (90,7%; 49/54). Em
32 81,5% (44/54) das propriedades as vacas não tinham contato com as fezes acumuladas após a
33 limpeza. Exceto em uma fazenda, as vacas eram separadas em piquetes de maternidade próximo
34 ao parto, os quais eram coletivos (79,2%; 42/53) ou individuais (20,7%; 11/53). O tempo de

1 permanência do bezerro recém-nascido junto à mãe era de até uma hora em 19 fazendas
2 (35,2%), entre 1 e 12 horas em 27 fazendas (50%), e acima de 12 horas em apenas 8 fazendas
3 (14,8%). A maioria dos rebanhos era fechado e a introdução de animais comprados de outras
4 propriedades rurais ocorria em somente 16,7% (9/54) das fazendas.

5 A ocorrência de pelo menos um caso mensal de diarreia transitória em vacas adultas foi
6 relatado em oito propriedades (17,8%). Todos os proprietários negaram a existência atual ou
7 passada de vacas com sinais clínicos clássicos de paratuberculose, tais como diarreia crônica
8 intermitente e queda da produção de leite acompanhados por emagrecimento progressivo.
9 Somente cinco das vacas incluídas no estudo, todas de propriedades diferentes, apresentavam
10 diarreia no dia da coleta.

11 Vacas sororreagentes para o MAP foram observadas em 61,1% dos rebanhos,
12 distribuídos por todos os cinco municípios e houve diferença estatística entre eles ($p = 0,034$),
13 sendo a taxa de prevalência distintamente menor nas propriedades de Ponta Grossa. A
14 prevalência de anticorpos contra o MAP entre as vacas foi de 9,8% (69/708), houve diferença
15 entre os municípios ($p = 0,018$) destacando-se a taxa mais elevada no município de Palmeira
16 (Tabela 2). Nos rebanhos positivos as taxas de sororreagentes dentre as vacas avaliadas
17 variaram de 5 a 10% (60,6%; 20/33) e de 11 a 37% (36,4%; 12/33). Em uma fazenda, localizada
18 no município de Palmeira, a taxa de sororreagentes foi marcadamente elevada (87,5%).
19 Nenhuma das cinco vacas que apresentavam diarreia no dia da coleta foi positiva. Apenas uma
20 vaca sororreagente (1,45%; 1/69) apresentou DNA do MAP nas fezes, proveniente do
21 município de Arapoti. As vacas sorologicamente negativas cujas fezes foram analisadas
22 também apresentaram resultado negativo no qPCR.

23 Considerando os rebanhos, os fatores associados com a presença de vacas
24 sororreagentes para o MAP foram o uso de sistema *compost barn* e o tipo de cama adotado nas
25 propriedades (Tabela 3). Em relação às vacas estudadas, a ocorrência de sororreagentes esteve
26 associada com o tipo de cama adotado nas propriedades (Tabela 4). Quando analisados os
27 rebanhos, nenhum dos fatores associados à presença de sororreagentes foi confirmado como
28 fator de risco ou de proteção. Quanto às vacas estudadas, o único fator de risco comprovado foi
29 a introdução de animais oriundos de outras propriedades rurais (Tabela 5).

Tabela 2

Prevalência de rebanhos positivos e de vacas sororreagentes para *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* na bacia leiteira dos Campos Gerais do estado do Paraná, Brasil, entre outubro de 2019 e janeiro de 2020

Município	Testados	Positivos	Prevalência (%)	IC (95%)
Rebanhos				
Arapoti	11	7	63,6	30,79 - 89,07
Castro	15	11	73,3	44,90 - 92,21
Carambeí	10	8	80,0	44,39 - 97,48
Palmeira	10	6	60,0	26,24 - 87,84
Ponta Grossa	8	1	12,5	0,32 - 52,35
Total	54	33	61,1	46,88 - 74,08
Vacas				
Arapoti	120	8	6,7	2,92 - 12,71
Castro	293	32	10,9	3,67 - 11,36
Carambeí	191	13	6,8	7,59 - 15,07
Palmeira	80	15	18,8	10,89 - 29,03
Ponta Grossa	24	1	4,2	0,11 - 21,12
Total	708	69	9,8	7,77 - 12,15

Tabela 3

Análise univariada dos fatores associados à ocorrência de rebanhos com animais sororreagentes para *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* na bacia leiteira dos Campos Gerais, estado do Paraná, Brasil, entre outubro de 2019 e janeiro de 2020.

Fatores	Positivo		Negativo		P
	n	%	n	%	
Número de ordenhas					
2	25	61,0	16	39,0	0,772
3	8	61,5	5	38,5	
Tipo de manejo					
Intensivo	22	68,8	10	31,2	0,381
Semi-intensivo	9	50,0	9	50,0	
Extensivo	2	50,0	2	50,0	
Raças* ^a					
Holandesa	28	62,2	17	37,8	1,000
Jersey	4	57,1	3	42,9	
Introdução de animais no rebanho ^a					
Sim	4	44,4	5	55,6	0,287
Não	29	64,4	16	35,6	
Piquete de maternidade ^{†a}					
Coletivo	27	64,3	15	35,7	0,310
Individual	5	45,5	5	54,6	
Uso de esterqueira ^a					
Sim	32	65,3	17	34,7	0,069
Não	1	20,0	4	80,0	
Contato dos animais com fezes ^{‡a}					
Sim	6	60,0	4	40,0	1,000
Não	27	61,4	17	38,6	
Diarreia nas vacas ^a					
Sim	6	75,0	2	25,0	0,461
Não	27	58,7	19	41,3	
<i>Compost barn</i> ^a					
Sim	7	100,0	0	0,0	0,035
Não	26	55,3	21	44,7	
Tipo de cama ^a					
Colchão	1	25,0	3	75,0	0,034
<i>Compost</i>	7	100,0	0	0,0	
Areia	8	80,0	2	20,0	
Maravalha	16	55,2	13	44,8	
Fornecimento do colostro					
Mamadeira	27	60,0	18	40,0	1,000
Mamada natural	6	66,7	3	33,3	
Separação do bezerro neonato					
< 1 hora	13	68,4	6	31,6	0,310
1 a 12 horas	17	63,0	10	37,0	
> 12 horas	3	37,5	5	62,5	
Total de animais no rebanho					
< 200	11	55,0	9	45,0	0,388
200 a 500	14	58,3	10	41,7	
> 500	8	80,0	2	20,0	
Vacas em lactação					
< 100	11	52,4	10	47,6	0,552
100 a 300	17	65,4	9	34,6	
> 300	5	71,4	2	28,6	
Produção de leite (vaca/dia)					
> 30 L	19	59,4	13	40,6	0,975
< 30 L	14	63,6	8	36,4	

*Exclusão de dois rebanhos que criavam vacas mestiças. †Exclusão de um rebanho por não utilizar piquete de maternidade.

‡Contato com as fezes acumuladas após a limpeza das instalações. *Teste de Fisher.

Tabela 4

Análise univariada dos fatores associados à ocorrência de vacas sororreagentes para *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* na bacia leiteira dos Campos Gerais, estado do Paraná, Brasil, entre outubro de 2019 e janeiro de 2020.

Fatores	Positivo		Negativo		P
	n	%	n	%	
Número de ordenhas					
2	54	10,9	441	89,1	0,146
3	15	7,0	198	93,0	
Tipo de manejo					
Intensivo	41	8,5	441	91,5	0,094
Semi-intensivo	25	13,8	156	86,2	
Extensivo	3	6,7	42	93,3	
Raças*					
Holandesa	60	10,0	538	90,0	0,737
Jersey	8	8,3	88	91,7	
Introdução de animais no rebanho					
Sim	11	16,7	55	83,3	0,076
Não	58	9,0	584	91,0	
Piquete de maternidade†					
Coletivo	62	10,6	525	89,4	0,120
Individual	6	5,3	107	94,7	
Uso de esterqueira					
Sim	68	9,8	625	90,2	0,973
Não	1	6,7	14	93,3	
Contato dos animais com fezes‡					
Sim	20	13,4	129	86,6	0,122
Não	49	8,8	510	91,2	
Diarreia nas vacas					
Sim	15	11,3	118	88,7	0,618
Não	54	9,4	521	90,6	
Compost barn					
Sim	14	14,4	83	85,6	0,137
Não	55	9,0	556	91,0	
Tipo de cama					
Colchão	3	3,3	87	96,7	0,042
Compost	14	14,4	83	85,6	
Areia	13	7,9	151	92,1	
Maravalha	36	11,5	276	88,5	
Fornecimento do colostro					
Mamadeira	57	10,2	504	89,8	0,568
Mamada natural	12	8,2	135	91,8	
Separação do bezerro neonato					
< 1 hora	28	10,6	236	89,4	0,444
1 a 12 horas	36	10,0	324	90,0	
> 12 horas	5	6,0	79	94,1	
Total de animais no rebanho					
< 200	22	11,1	176	88,9	0,718
200 a 500	31	9,0	315	91,0	
> 500	16	9,8	148	90,2	
Vacas em lactação					
< 100	11	5,3	195	94,7	0,524
100 a 300	17	4,8	336	95,2	
> 300	5	4,4	108	95,6	
Produção de leite (vaca/dia)					
> 30 L	37	8,2	412	91,8	0,100
< 30 L	32	12,4	227	87,6	

*Exclusão das vacas mestiças (n=14). †Exclusão das vacas do rebanho em que não era utilizado piquete de maternidade (n=8).

‡Contato com as fezes acumuladas após a limpeza das instalações.

Tabela 5

Análise multivariada dos fatores de risco associados à ocorrência de animais sororreagentes para *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* em rebanhos e vacas da bacia leiteira dos Campos Gerais, estado do Paraná, Brasil, entre outubro de 2019 e janeiro de 2020.

Fatores	OR	IC 95%	Coefficiente	S.E.	P
Rebanhos					
Uso de esterqueira	0,67	0,05 - 9,47	-0,405	1,354	0,765
Cama de areia	1,25	0,28 - 43,16	1,253	1,282	0,328
Cama de colchão	0,67	0,11 - 3,98	-0,405	0,912	0,657
Cama de maravalha	1,07	0,13 - 8,67	0,069	1,067	0,948
Vacas					
Realização de 3 ordenhas	1,28	0,59 - 2,75	0,246	0,390	0,528
Sistema intensivo	0,80	0,31 - 2,06	-0,224	0,483	0,643
Introdução de animais	2,45	1,03 - 5,85	0,897	0,443	0,043
Maternidade individual	0,39	0,14 - 1,11	-0,940	0,535	0,079
Contato com fezes	1,50	0,79 - 2,83	0,403	0,325	0,215
Compost barn	3,91	0,85 - 18,00	1,364	0,779	0,080
Cama de colchão	0,93	0,14 - 5,96	-0,071	0,947	0,940
Cama de areia	2,32	0,48 - 11,23	0,841	0,805	0,296
Cama de maravalha	2,39	0,68 - 8,39	0,870	0,642	0,175
Produção de leite elevada*	0,78	0,37 - 1,66	-0,246	0,385	0,522

OR: Odds ratio (Razão de chances). IC: Intervalo de confiança de 95%. S.E.: erro padrão de estimativa. * > 30 L de leite/vaca/dia.

1

2 Discussão

3 Este é o primeiro estudo observacional transversal realizado sobre a paratuberculose no
4 estado do Paraná. A bacia leiteira dos Campos Gerais, escolhida como local do estudo, está
5 localizada na região Centro-oriental do estado e destaca-se pela criação de vacas com alta
6 produtividade e utilização de alto nível de tecnologia na pecuária leiteira (Bazotti et al., 2012),
7 por isso, a relevância do estudo.

8 A prevalência de rebanhos com vacas sororreagentes contra MAP foi de 61,1%, sendo
9 que o município de Carambeí apresentou 80% dos rebanhos com animais reagentes, enquanto
10 Ponta Grossa apresentou 12,5%. O número de amostras coletadas em cada município,
11 proporcional ao total de vacas ordenhadas, pode justificar as diferenças acentuadas entre estes
12 municípios, pois, Ponta Grossa contém menor quantidade de vacas ordenhadas e rebanhos
13 menores. Rebanhos maiores têm taxas de soroprevalência superiores às de propriedades
14 menores (Woodbine et al., 2009; Vilar et al., 2015; Donat et al., 2016), o que poderia justificar
15 a taxa elevada de propriedades positivas no município de Carambeí (Tabela 1).

16 A prevalência de rebanhos brasileiros positivos foi variável entre 34,5% (Vilar et al.,
17 2015) e 100% (Acypreste et al., 2005). Medeiros et al. (2012) e Sá et al. (2013) encontraram
18 prevalência parecida com a do presente estudo, com 58,3% e 47,4% dos rebanhos positivos,

1 respectivamente. Valores de prevalência superiores à do presente estudo foram relatados em
2 trabalhos conduzidos com número menor de rebanhos (Fonseca et al., 2000; Ferreira et al.,
3 2001; Acypreste et al., 2005; Costa et al., 2010). Além disso, Fonseca et al. (2000) incluíram
4 apenas vacas maiores do que 3 anos, o que poderia aumentar o número de animais
5 sororreagentes, já que a idade favorece a ocorrência da doença (Nielsen et al., 2013).

6 Países da Europa e América do Norte, possuem taxas de soroprevalência entre rebanhos
7 variando entre 31% e 73% (Tiwari et al., 2006; Mee e Richardson, 2008) e na América do Sul
8 admite-se valores elevados entre 71% e 100% (Fernandéz-Silva et al., 2011; Verdugo et al.,
9 2020). Esses dados, assim como os do presente estudo, podem sugerir que o MAP é amplamente
10 distribuído e circulante nos rebanhos leiteiros, já que foi comprovada a presença de animais em
11 diferentes países, com raças de bovinos, sistemas de criação, condições climáticas e geográficas
12 distintas.

13 A prevalência de vacas sororreagentes contra MAP na bacia leiteira dos Campos Gerais
14 foi de 9,8% e resultados semelhantes já foram relatados no Brasil (Costa et al., 2010; Medeiros
15 et al, 2012; Vilar et al., 2015). Porém, Medeiros et al. (2012), incluíram vacas de propriedades
16 com diagnóstico prévio de paratuberculose, o que poderia resultar em prevalência maior. Por
17 outro lado, Sá et al. (2013) relataram taxa inferior (2,7% de soroprevalência) em estudo
18 conduzido em 19 rebanhos, avaliando-se 408 vacas. Valores superiores de prevalência de
19 anticorpos contra MAP foram identificados no Brasil (Fonseca et al., 2000; Ferreira et al., 2001;
20 Acypreste et al., 2005) com soroprevalência variando entre 18% e 60,2%. As diferenças entre
21 os resultados podem também estar relacionadas com o método empregado para o diagnóstico
22 sorológico, uma vez que os testes comerciais de ELISA disponíveis possuem sensibilidade e
23 especificidade distintas, variando entre 31,3% e 41,5% de sensibilidade e 85% e 99,42% de
24 especificidade (Fry et al., 2008; Aly et al., 2014).

25 Nos Estados Unidos as taxas de soroprevalência foram parecidas com as do presente
26 estudo, com valores entre 7,3% e 9,5% (Tiwari et al., 2006), assim como na Inglaterra, com
27 10,1% (Woodbine et al., 2009), e nesses países, existem programas oficiais voluntários de
28 controle da doença. Levantamentos sorológicos realizados na América Latina relataram valores
29 semelhantes. Na Colômbia 10% das 307 vacas foram positivas (Fernandez-Silva et al., 2011),
30 e no Chile 6,3% das 4963 vacas estudadas possuíam anticorpos contra MAP (Verdugo et al.,
31 2020). Taxas de prevalência superiores às identificadas no presente estudo foram relatadas no
32 Equador (25%) (Fernandez-Silva et al., 2011) e na Índia (29,8%) (Singh et al., 2008), países
33 que não possuem programa de controle e erradicação da paratuberculose. Ao contrário,
34 frequências reduzidas de sororreagentes foram observadas em países que possuem programas

1 oficiais de controle da doença (Whittington et al., 2019), como Canadá, com valores entre 1,3%
2 e 7% (Tiwari et al., 2006), Bélgica com 1,1% (Boalaert et al., 2000) e Holanda com 2,5%
3 (Muskens et al., 2000). A baixa prevalência de vacas com anticorpos contra MAP indica o
4 resultado positivo das medidas preventivas estabelecidas nos programas oficiais.

5 Todas as vacas positivas no diagnóstico sorológico, e 31 vacas negativas selecionadas
6 aleatoriamente, tiveram suas fezes submetidas ao qPCR e apenas uma delas foi positiva,
7 representando 1,45% do total das vacas sororreagentes. Esses resultados são muito inferiores
8 aos de Selim et al. (2019), que, em 700 vacas estudadas, observaram 13,8% de sororreagentes
9 no ELISA e 38,1% delas também foram positivas no qPCR. No entanto, estes pesquisadores
10 incluíram vacas com diarreia o que explica o maior número de amostras de fezes positivas no
11 teste molecular. Clark et al. (2008) avaliaram 250 vacas sem sinais clínicos em duas
12 propriedades sem informações prévias sobre a ocorrência de paratuberculose, e obtiveram 74
13 vacas (29,6%) positivas no PCR convencional e 25 (10%) no teste de ELISA, sendo que a
14 concordância entre os métodos foi considerada leve pelo teste de Kappa (0,35).

15 Segundo Khol et al. (2012) e O'Brien et al. (2013), existe baixa correlação entre a
16 soropositividade do ELISA e a eliminação fecal de MAP, provavelmente pelo caráter
17 intermitente de eliminação da micobactéria, o que corrobora os resultados do presente estudo.
18 Pode-se admitir que as vacas sororreagentes estudadas eram infectadas, mas não eliminavam
19 MAP no momento da coleta, o que é a situação mais provável (Koets et al., 2015; Smith et al.,
20 2015). Por outro lado, não é possível descartar que tenham se infectado anteriormente e
21 conseguido se livrar da infecção, o que é menos provável (Arsenault et al., 2014). Com relação
22 à vaca positiva no ELISA e no qPCR, deve-se assumir que fosse infectada e, diferente das
23 demais, eliminasse MAP nas fezes, embora não apresentasse sinais da doença. Vacas nesta
24 condição possuem importância epidemiológica destacada porque disseminam a infecção no
25 rebanho (McNees et al., 2015).

26 Outro fator que pode ter interferido com a ausência de concordância entre os resultados
27 dos métodos diagnósticos nas vacas sororreagentes é a idade das mesmas, uma vez que animais
28 com idade superior a 4 anos têm chance maior de ser positivos no PCR das fezes (Nielsen e
29 Ersboll, 2006). A longevidade média das vacas da bacia leiteira em que o presente estudo foi
30 realizado é de 3,8 anos e, apenas 37% dos rebanhos possuem vacas com mais de três lactações
31 (Paula, 2018). Como o critério empregado foi a seleção de vacas com idade superior a 2 anos
32 ao invés das vacas mais velhas dos rebanhos, a idade pode ter contribuído para os resultados
33 obtidos.

34 A introdução de animais oriundos de outras propriedades foi o único fator de risco para

1 a infecção com MAP comprovado no presente estudo. Vacas criadas em fazendas que
2 realizavam compra (fazendas abertas) tiveram 2,45 vezes mais chances de ser positivas do que
3 aquelas criadas em propriedades fechadas. Esse resultado está de acordo com outros estudos.
4 Houve associação entre a positividade do rebanho para paratuberculose e a entrada de animais
5 em levantamentos realizados na Europa e nos Estados Unidos (Rangel et al., 2015), no Chile
6 (Verdugo et al., 2020), no Canadá (Puerto-Parada et al., 2018) e na Itália (Wolf et al., 2016).
7 Nos estudos brasileiros em que foi realizada a análise dos fatores de risco, não houve associação
8 com a compra de animais (Sá et al., 2013; Vilar et al., 2015). Admite-se então que, a entrada de
9 MAP em um rebanho ocorre frequentemente com a chegada de novos animais (MacAloon et
10 al., 2019).

11 Os resultados obtidos permitem inferir que MAP é amplamente circulante entre os
12 rebanhos da bacia leiteira dos Campos Gerais e possui baixa prevalência entre as vacas. A
13 importância da paratuberculose para a região pode ser limitada, contudo, considerando a curta
14 longevidade das vacas criadas na bacia leiteira estudada. Uma vez que os sinais clínicos
15 costumam aparecer após os três anos de idade em vacas com paratuberculose e que a eliminação
16 de MAP é maior nos animais com diarreia, é possível admitir que a disseminação da infecção
17 não seja crítica em rebanhos compostos por vacas mais jovens. Apesar disso, a informação de
18 que MAP está presente na região indica que o clínico deve considerar a paratuberculose como
19 um diagnóstico diferencial relevante nos casos de diarreia crônica e de emagrecimento
20 progressivo acompanhados por queda na produção leiteira.

21

22 Referências

23 Acypreste, C.S., Juliano, R.S., Riveira, F.E.B., Silva, L.A.F., Fioravanti, M.C.S., Filho, F.C.D.,
24 2005. Uso da técnica do ELISA indireto na detecção de anticorpos anti-*Mycobacterium*
25 *paratuberculosis* em vacas em lactação. Cienc. Anim. Bras. 6, 41-45.

26

27 Aly, S. S., Anderson, R. J., Whitlock, R. H., Adaska, J. M., 2014. Sensitivity and Specificity of
28 Two Enzyme-linked Immunosorbent Assays and a Quantitative Real-time Polymerase Chain
29 Reaction for Bovine Paratuberculosis Testing of a Large Dairy Herd. Intern. J. Appl. Res. Vet.
30 Med. 12, 1-7.

31

32 Arsenault, R.J., Maattanen, P., Daigle, J., Potter, A., Griebel, P., Napper, S., 2014. From mouth
33 to macrophage: mechanisms of innate immune subversion by *Mycobacterium avium* subsp.
34 *paratuberculosis*. Vet. Res. 45, 54.

35 <https://doi.org/10.1186/1297-9716-45-54>

36

37 Bazotti, A., Nazareno, L. R., Sugamoto, M. 2012. Caracterização socioeconômica e técnica da
38 atividade leiteira do Paraná. Rev. Parana. Desenvolv. 123, 213-234.

39

- 1 Behr, M.A., Collins, D.M., 2010. Paratuberculosis: Organism, disease, control, first ed. CAB
2 international, Cambridge.
3
- 4 Boelaert, F., Walravens, K., Biront, P., Vermeersch, J.P., Berkvens, D., Godfroid, J., 2000.
5 Prevalence of paratuberculosis (Johne's disease) in the Belgian cattle population. *Vet.*
6 *Microbiol.* 77, 269–281.
7 [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00312-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00312-6)
8
- 9 Brasil, 2019a. Produção Pecuária Municipal de 2019. Rio de Janeiro. 47, 1-8.
10
- 11 Brasil, 2019b. Censo Agropecuário – resultados definitivos 2017. Rio de Janeiro. 8, 1-105.
12
- 13 Clark, D. L., Koziczkowski, J. J., Radcliff, R. P., Carlson, R. A., Ellingson. J.L., 2008.
14 Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: Comparing fecal culture
15 versus sérum enzyme-linked immunosorbent assay and direct fecal polymerase chain reaction.
16 *J. Dairy Sci.* 91, 2620–2627.
17 <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0902>
18
- 19 Correa-Valencia, N.M., Ramírez, N.F., Arango-Sabogal, J.C., Fecteau, G., Fernández-Silva,
20 J.A., 2019. Prevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in dairy
21 herds in Northern Antioquia (Colombia) and associated risk factors using environmental
22 sampling. *Prev. Vet. Med.* 170, 104739.
23 <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.104739>
24
- 25 Costa, J.C.M., Pieri, F.A., Souza, C.F., Espescht, I.F., Felipe, A.G., Santos, G.M., Tobia, F.L.,
26 Silva Junior, A., Moreira, M.A.S., 2010. Levantamento sorológico de *Mycobacterium avium*
27 subsp. *paratuberculosis* em bovinos leiteiros no estado do Espírito Santo. *Arqui. Bras. Med.*
28 *Vet. Zoo.* 62, 1491-1494.
29 <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352010000600028>
30
- 31 Donat, K., Schmidt, M., Köhler, H., Sauter-Louis, K., 2016. Management of the calving pen is
32 a crucial factor for paratuberculosis control in large dairy herds. *J. Dairy Sci.* 99, 3744-3752.
33 <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10625>
34
- 35 Espescht, I.F., Schwarz, D.G., Faria, A.C.S., Souza, M.C.C., Paolicchi, F.A., Juste, R.A.,
36 Carvalho, I.A., Moreira, M.A.S., 2017. Paratuberculosis in Latin America: a systematic review.
37 *Trop. Anim. Health. Prod.* 49, 1557-1576.
38 <https://doi.org/10.1007/s11250-017-1385-6>
39
- 40 FAO, 2020. Food Outlook – Biannual Report on Global Food Markets. Rome.
41
- 42 Fecteau, M.E., 2018. Paratuberculosis in cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Ani. Pract.* 34, 209-
43 222.
44 <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2017.10.011>
45
- 46 Fernández-Silva, J.A., Abdulmawjood, A., B'ulte M. 2011. Diagnosis andMolecular
47 Characterization of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from Dairy Cows in
48 Colombia. *Vet. Med. Int.* 2011, 2, 352561.
49 <https://doi.org/10.4061/2011/352561>
50

- 1 Fernández-Silva, J.A., Correa-Valencia, N.M., Ramírez, N.F., 2014. Systematic review of the
2 prevalence of paratuberculosis in cattle, sheep, and goats in Latin America and the Caribbean.
3 Trop. Anim. Health. Prod. 46,1321–1340.
4 <https://doi.org/10.1007/s11250-014-0656-8>
5
- 6 Ferreira, R., Fonseca, L., Lilenbaum, W., 2001. Detecção de anticorpos contra *Mycobacterium*
7 *paratuberculosis* em rebanhos bovinos do estado do Rio de Janeiro, Brasil. Rev. Bras. Med.
8 Vet. 23, 166-171.
9
- 10 Fonseca, L.F.L., Olival, A.A., Pereira, C.C., Heinemann, M.B., Richtzenhain, L.J., Santos,
11 M.V., 2000. Identificação de anticorpos anti-*Mycobacterium paratuberculosis* em rebanhos
12 bovinos leiteiros do Estado de São Paulo. Acta sci. vet. 28, 51-56.
13
- 14 Fry, M.P., Kruze, J., Collins, M.T., 2008. Evaluation of four commercial enzyme-linked
15 immunosorbent assays for the diagnosis of bovine paratuberculosis in Chilean dairy herds. J.
16 Vet. Diagn. Invest. 20, 329-332
17 <https://doi.org/10.1177/104063870802000311>.
18
- 19 Garcia, A. B. Shalloo, L., 2015. The economic impact and control of paratuberculosis in cattle.
20 J. Dairy Sci. 98, 1–21
21 <https://doi.org/10.3168/jds.2014-9241>
22
- 23 Kawaji, S., Taylor, D.L., Mori, Y., 2007. Detection of *Mycobacterium avium* subsp.
24 *paratuberculosis* in ovine faeces by direct quantitative PCR has similar or greater sensitivity
25 compared to radiometric culture. Vet. Microbiol. 125, 36-48.
26 <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.05.002>
27
- 28 Khol, J. L., Baumgartner, W., 2012. Examples and suggestions for the control of
29 paratuberculosis in European cattle. Jpn. J. Vet. Res. 60, 7.
30
- 31 Koets, A.P., Eda, S., Sreevatsan, S., 2015. The within host dynamics of *Mycobacterium avium*
32 ssp. *paratuberculosis* infection in cattle: where time and place matter. Vet. Res. 46.
33 <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0185-0>
34
- 35 Lombard, J. E., 2011. Epidemiology and economics of paratuberculosis. Vet. Clin. North Am.
36 Food Anim. Pract. 27, 525–535.
37 <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2011.07.012>
38
- 39 McAloon, C.G., Doherty, M.L., Whyte, P., More, S.J., O’Grady, L., Citer, L., Green, M.J.,
40 2017. Relative importance of herd-level risk factors for probability of infection with
41 paratuberculosis in Irish dairy herds. J. Dairy Sci. 100, 1–13.
42 <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12985>
43
- 44 McAloon, C.G., Roche, S., Ritter, C., Barkema, H.W., Whyte, P., More, S.J., O’Grady, L.,
45 Green, M.J., Doherty, M.L., 2019. A review of paratuberculosis in dairy herds – Part 1:
46 Epidemiology. Vet. J. 246, 59-65.
47 <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2019.01.010>
48
- 49 McNees, A.L., Markesich, D., Zayyani, N.R., Graham, D.Y., 2015. *Mycobacterium*
50 paratuberculosis as a cause of Crohn’s disease. Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol. 9, 1523-

- 1 1534.
2 <https://doi.org/10.1586/17474124.2015.1093931>
3
- 4 Mee, J. F., Richardson, D., 2008. Epidemiology and economic impact of Johne's disease in
5 Irish dairy herds. Final Report. Teagasc Moorepark Dairy Production Research Centre, Ireland.
6 Accessed Jan. 13, 2021.
7 <http://www.teagasc.ie/research/reports/dairyproduction/5405/eopr-5405.pdf>
8
- 9 Medeiros, J.M.A., Junior, F.G., Matos, R.A.T., Costa, V.M.M., Riet-Correa, F., 2012.
10 Frequência de anticorpos para paratuberculose em bovinos no semi-arido paraibano. Pesq. Vet.
11 Bras. 32, 697-700.
12 <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2012000800003>
13
- 14 Muskens, J., Barkema, H. W., Russchen, E., Van Maanen, K., Schukken, Y.H., Bakker, D.,
15 2000. Prevalence and regional distribution of paratuberculosis in dairy herds in the Netherlands.
16 Vet. Microbiol. 77, 253–261.
17 [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00310-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00310-2)
18
- 19 Nielsen, S.S., Ersboll, A.K., 2006. Age at occurrence of *Mycobacterium avium* subspecies
20 *paratuberculosis* in naturally infected dairy cows. J. Dairy Sci. 89,4557–4566.
21 [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72505-X](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72505-X).
22
- 23 Nielsen, S.S., Toft, N., 2008. *Ante mortem* diagnosis of paratuberculosis: a review of accuracies
24 of ELISA, interferon- γ assay and faecal culture techniques. Vet. Microbiol. 129, 217-235.
25 <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.12.011>
26
- 27 Nielsen, S. S., Toft, N., Okura. H., 2013. Dynamics of specific anti-*Mycobacterium avium* ssp.
28 *paratuberculosis* antibody respons through age. PLoS ONE. 8:e63009.
29 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063009>
30
- 31 O'Brien, R., Hughes, A., Liggett, S., Griffin, F., 2013. Composite testing for *ante-mortem*
32 diagnosis of Johne's disease in farmed New Zealand deer: correlations between bacteriological
33 culture, histopathology, serological reactivity and faecal shedding as determined by quantitative
34 PCR. BMC Vet. Res. 9, 72.
35 <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-72>
36
- 37 OIE, 2019. The Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 544-559.
38
- 39 Paula, S., 2018. Longevidade e descarte de vacas leiteiras em rebanhos de Arapoti, Curitiba -
40 Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós- Graduação em
41 Zootecnia 57 f. (Dissertação)
42
- 43 Puerto-Parada, M., Arango-Sabogal, J.C., Paré, J., Doré, E., Côté, G., Wellemans, V.,
44 Buczinski, S., Roy, J., Labrecque, O., Fecteau, G., 2018 Risk factors associated with
45 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* herd status in Québec dairy herds. Prev. Vet.
46 Med. 152, 74-80.
47 <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.02.010>
48
- 49 Raizman, E. A., Fetrow, J., Wells, S. J., Godden, S. M., Oakes, M. J., Vazquez, G., 2007. The
50 association between *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* fecal shedding or clinical

- 1 Johne's disease and lactation performance on two Minnesota, USA dairy farms. *Prev. Vet. Med.*
2 78, 179–195.
3 <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2006.10.006>
4
- 5 Rangel, S. J., Paré, J., Doré, E., Arango, J. C., Côté, G., Buczinski, S., Labrecque, O.,
6 Fairbrother, J. H., Roy, J. P., Wellemans, V., Fecteau, G., 2015. A systematic review of risk
7 factors associated with the introduction of *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* (MAP)
8 into dairy herds. *Can. Vet. J.* 56, 169–177.
9
- 10 Sá, L.M., Oliveira, J.M.B., Santos, G.R., Brandespim, D.F., Silva Júnior, J.L., Mota, R.A.,
11 Pinheiro Júnior, E.J.W., 2013. Avaliação sorológica e de fatores de risco para a infecção por
12 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* em rebanhos leiteiros da Microrregião de
13 Garanhuns, Pernambuco. *Pesq. Vet. Br.* 33, 310-313.
14 <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2013000300006>
15
- 16 Selim, A., Ali, A., Ramadan, E., 2019. Prevalence and molecular epidemiology of Johne's
17 disease in Egyptian cattle. *Acta Tropica.* 195, 1-5.
18 <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.04.019>
19
- 20 Singh, S.V., Singh, A.V., Singh, R., Sharma, S., Shukla, N., Misra, S., Singh, P.K., Sohal, J.S.,
21 Kumar, H., Patil, P.K., Misra, P., Sandhu, K.S., 2008. Sero-prevalence of Bovine Johne's
22 disease in buffaloes and cattle population of North India using indigenous ELISA kit based on
23 native *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* 'Bison type' genotype of goat origin.
24 *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 31, 419-433.
25 <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2007.06.002>
26
- 27 Smith, R. L., Schukken, Y.H., Gröhnca, Y.T., 2015. A new compartmental model of
28 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection dynamics in cattle. *Prev. Vet. Med.*
29 <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.10.008>
30
- 31 Tiwari, A., Vanleeuwen, J.A., Mckenna, S.L.B., Keefe, G.P., Barkema, H.W., 2006. Johne's
32 disease in Canada: Part I: Clinical symptoms, pathophysiology, diagnosis, and prevalence in
33 dairy herds. *Can. Vet. J.* 47, 874-883.
34
- 35 Thrusfield, M., 2018. *Veterinary Epidemiology*, 4th ed. Wiley-Blackwell, Oxford, 888 pp.
36
- 37 Verdugo, C., Valdes, M.F., Salgado, M., 2020. Herd level risk factors for *Mycobacterium avium*
38 subsp. *paratuberculosis* infection and clinical incidence in dairy herds in Chile. *Prev. Vet. Med.*
39 176, 104888.
40 <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.104888>
41
- 42 Vilar, A.L.T., Santos, C.S.A.B., Pimenta, C.L.R.M., Freitas, T.D., Brasil, A.W.L., Alves, C.J.,
43 Bezerra, C.S., F. Riet-Correa, Oliveira, T.S., Azevedo, S.S., 2015. Herd-level prevalence and
44 associated risk factors for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cattle in the State
45 of Paraíba, Northeastern Brazil. *Prev. Vet. Med.* 121, 49-55.
46 <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.06.003>
47
- 48 Whittington, R., Donat, K., Weber, M.F. *et al.* 2019. Control of paratuberculosis: who, why and
49 how. A review of 48 countries. *BMC Vet Res.* 15, 198.
50 <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1943-4>

- 1
2 Windsor, P.A., Whittington, R.J., 2010. Evidence for age susceptibility of cattle to Johne's
3 disease. *Vet J.* 184, 37-44.
4 <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.01.007>
5
- 6 Wolf, R., Barkema, H.W., Buck, J., Orsel, K., 2016. Dairy farms testing positive for
7 *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* have poorer hygiene practices and are less
8 cautious when purchasing cattle than test-negative herds. *J. Dairy Sci.* 99, 4526-4536.
9 <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10478>
10
- 11 Woodbine, K. A., Schukken, Y. H, Green, L.A., Ramirez-Villaescusa, A., Mason, S., Moore,
12 S. J., Bilbao, B., Swann, N., Medley, G.F., 2009. Seroprevalence and epidemiological
13 characteristics of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* on 114 cattle farms in south
14 west England. *Prev. Vet. Med.* 89, 102–109.
15 <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2009.02.005>
16
- 17 Yamasaki, E.M., Brito, M.F., Mota, R.A., Mcintosh, D., Tokarnia, C.H., 2013. Paratuberculose
18 em ruminantes no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.*, 33, 127-140.
19 <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2013000200001>

1 7 CONCLUSÕES

2 A partir dos resultados do presente estudo pode-se afirmar que o MAP é
3 circulante entre os rebanhos da bacia leiteira dos Campos Gerais do Paraná, Brasil e que
4 prevalência de vacas com infecção ativa é baixa. O único fator de risco associado à ocorrência
5 da paratuberculose é a introdução de novos animais no rebanho que deve ser evitada para
6 prevenir a disseminação da micobactéria.

1 **8 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PESPECTIVAS FUTURAS**

2 As informações apresentadas permitem admitir que MAP está presente no
3 estado do Paraná, na microrregião Centro-oriental, e que a paratuberculose deve ser considerada
4 como possível diagnóstico em casos de emagrecimento progressivo e diarreia crônica. Apesar
5 de relevante, devido ao número limitado de informações sobre a situação da doença no Brasil,
6 a implementação de programas de controle e erradicação não deve ocorrer a curto prazo. Ainda
7 assim, medidas profiláticas aplicadas no manejo dos rebanhos, tais como a rigidez na limpeza
8 das instalações e descarte das fezes, e a quarentena de novos animais introduzidos na
9 propriedade, devem ser consideradas para reduzir a transmissão de MAP entre vacas e
10 rebanhos.

11 Este é o primeiro estudo sobre paratuberculose no estado do Paraná, portanto,
12 sugere-se que novos levantamentos epidemiológicos sejam realizados nas outras regiões
13 produtoras de leite no estado, e que neles, sejam incluídas as vacas mais velhas dos rebanhos.
14 Além disso, deve-se considerar a possibilidade de um estudo direcionado para avaliar a
15 interferência do sistema *Compost barn* para a ocorrência de vacas sororreagentes. Outro viés a
16 ser considerado é o leite como forma de transmissão de MAP para humanos, por isso, estudos
17 direcionados para detecção da micobactéria em produtos lácteos seriam importantes.

APÊNDICE

APÊNDICE A

Questionário epidemiológico para investigação dos fatores de risco de paratuberculose

Data: ____ / ____ / ____

Nº ____

QUESTIONÁRIO PARATUBERCULOSE

Proprietário: _____

Propriedade: _____

Endereço: _____

Município: _____ E-mail: _____

Telefone: () _____ / () _____

Coordenadas geográficas: _____

1. Número de animais: _____

a) Vacas em lactação: _____

b) Novilhas: _____

c) Bezermos: _____

d) Touros: _____

2. Número de ordenhas:

() 1 () 2 () 3

3. Tipo de Manejo:

) Intensivo () Semi-intensivo () Extensivo

4. Raça predominante:

) Holandesa () Jersey () Girolando () Outras

5. Produção média diária: _____ litros

6. Há compra de animais?) Sim () Não

7. Há piquete maternidade:) Sim () Não

) Individual () Grupo

8. Há assistência veterinária regular:) Sim () Não

9. Faz uso de inseminação artificial:) Sim () Não

10. Uso de esterqueira:) Sim () Não

11. Há contato dos animais com a esterqueira?) Sim () Não

12. Tempo de permanência da mãe com o bezerro (em horas)? _____

13. Como é o fornecimento de colostro aos bezermos

) Diretamente da mãe () Mamadeira

14. Tipo de cama? _____

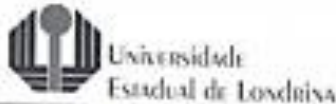
15. Frequência de troca de cama? _____

16. Há vacas com diarreia na propriedade? _____

Anotações:

ANEXOS

ANEXO A
Aprovação e Registro da Comissão de Ética no uso de animais



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA N° 109/2019

Londrina, 15 de Agosto de 2019.

Prezado (a) professor (a),

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado: "Ocorrência da paratuberculose em bovinos leiteiros da região Centro-oriental do estado do Paraná" protocolo CEUA n° 11021.2019.35 sob a responsabilidade de **Júlio Augusto Naylor Lisboa**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (in-ensim), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n° 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n° 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL), em **15/08/2019**.

Este projeto tem por objetivo investigar a ocorrência da paratuberculose em bovinos leiteiros na mesoregião centro-oriental do estado do Paraná. Grau de inviabilidade: GI

Finalidade	1.1.1.1.1 Pesquisa científica
Vigência da autorização	15/08/2019 à 20/02/2021
Especie, linhagem, raça	Bovino: Holandesa Jersey
N° de animais	575
Peso, idade	500 Kg / Acima de 2 anos
Sexo	Fêmeas
Origem	Fazendas criadoras de bovinos leiteiros localizadas na região Centro Oriental do Paraná.
Amostras a serem coletadas	Feces e sangue

Cumprir orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL, anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me a disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo-me, cordalmente.

Maria Fernanda R. Graziano
Prof.ª Dr.ª Maria Fernanda Rodrigues Graziano
Coordenadora da CEUA/UEL

Prof.ª Dr.ª Maria Fernanda
Rodrigues Graziano
Coordenadora do Conselho de
Ética no Uso de Animais
Universidade Estadual de Londrina
Cidade de Londrina - Paraná - Brasil
Telefone: (41) 3375-3454

Ilmo. (a) Sr. (a)

Prof. (a) Dr. (a) Júlio Augusto Naylor Lisboa

Responsável pelo projeto

Departamento de Clínicas Veterinárias/CCA

C/C para a Chefia do Depto. de Clínicas Veterinárias/CCA

C/C para a Direção de Centro do CCA