



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**Seroprevalência de Paratuberculose  
em Ovinos e Caprinos na Região do  
Baixo Alentejo**

André Filipe Fernandes Matado

**Évora 2011**



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

# **Seroprevalência de Paratuberculose em Ovinos e Caprinos na Região do Baixo Alentejo**

Dissertação apresentada para obtenção do grau  
de Mestre em Medicina Veterinária do Curso de  
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária  
conferido pela Universidade de Évora.

**Orientador:** Professor Doutor Hélder Cortes

Universidade de Évora

**Co-Orientador:** Professor Adjunto José Costa Mira

André Filipe Fernandes Matado

**Évora 2011**

As imagens, gráficos ou tabelas da presente dissertação que não possuem referência bibliográfica são de autoria do autor da dissertação.

## A. Agradecimentos

- Ao Professor Doutor Helder Cortes, meu orientador científico do estágio da Universidade de Évora, por ter aceite partilhar comigo esta caminhada, por toda a dedicação e disponibilidade sempre demonstradas e pela amizade.
- Ao Dr. José da Costa Mira, co-orientador científico do estágio, por ter aceitado receber-me, pelo exemplo de Homem e de profissional que é e que procurou sempre transmitir-me. Pela paciência, apoio, amizade e confiança que em mim depositou, por todos os seus sábios ensinamentos e pelas vivências que me permitiu ao longo destes cinco meses, que guardarei para sempre.
- À Intervet/Schering-Plough Portugal, e ao Dr. André Preto por todo o apoio prestado no decorrer deste trabalho e por ter acreditado neste estudo. Sem esse tão importante auxílio, a realização deste, estaria fortemente comprometida.
- Ao Professor Telmo Nunes, por toda a ajuda no processamento dos dados estatísticos e esclarecimentos na interpretação dos resultados deles obtidos.
- Ao Luís, companheiro de sempre, pela enorme amizade, por cinco anos de partilha, pelas palavras certas na altura oportuna e por todas as aventuras passadas juntos.
- Ao Pedro, ao Álvaro, ao Hélio, ao Nuno e ao Diogo pela amizade e vivências que com eles partilhei durante os cinco anos de curso.
- A todos os meus amigos de Moura que estiveram mais próximos, nos altos e baixos da minha vida e que me incentivaram nas alturas mais complicadas.
- Ao Sr. Godinho e ao Rui, pelo auxílio fundamental no decorrer do estágio.
- Ao meu colega de estágio Miguel, pela convivência e ajuda.
- Aos restantes colegas de curso nos caminhos de estudo veterinário, pelos últimos 5 anos de aprendizagem e convivência.



- Aos meus pais, pelo apoio e dedicação que fizeram de mim a pessoa que sou hoje.
- Ao meu irmão João que sempre me apoiou e ajudou nas alturas complicadas.
- Aos meus avós, por sempre terem acreditado em mim e me incentivado nos estudos.
- À minha tia e madrinha Géninha por sempre me ter tentado proteger de tudo e todos.
- À Patrícia pela cumplicidade e carinho.

## **Seroprevalência de Paratuberculose em Ovinos e Caprinos na Região do Baixo Alentejo**

### **B. Resumo**

No presente trabalho verificámos se existia circulação do agente da paratuberculose nas explorações de pequenos ruminantes no distrito de Beja. Avaliou-se a variação da circulação do agente em função das raças, localização geográfica, coabitação com outras espécies e dimensão das explorações. O estudo consistiu na pesquisa serológica que incidiu em 27 explorações de regime semi-extensivo utilizando um teste ELISA em animais com idade superior a 2 anos. Foram analisadas 25 explorações de ovinos de aptidão carne e duas de caprinos. Foram rastreados no total 187 animais, 172 ovinos e 15 caprinos. A seroprevalência aparente de rebanho encontrada foi 14,8%, com intervalo de confiança 5,9 a 32,5%. Na estimativa da seroprevalência real de rebanho este valor sobe para 41,2%, com intervalo de confiança 16,4 a 90,2%. Apenas o factor coabitação dos rebanhos rastreados com rebanhos de bovinos revelou ter significância, podendo ser considerado factor de risco nos rebanhos de pequenos ruminantes.

**Palavras-chave:** Paratuberculose, seroprevalência, pequenos ruminantes.

## **Paratuberculosis Seroprevalence in Sheep and Goats in Baixo Alentejo Region**

### **C. Abstract**

In this study we tested the circulation of Paratuberculosis in small ruminant flocks in the district of Beja. We evaluated the variation of the agent circulation with race, geographic location, cohabitation with other species and flocks size. The study consisted of a serological survey in 27 semi-extensive farms using an ELISA test in animals older than 2 years. We surveyed 25 sheep flocks designed for meat production and two goats flocks. We screened a total of 187 animals, 172 sheep and 15 goats. The apparent herd prevalence found was 14.8% with a confidence limit from 5.9 to 32.5%. In estimating the real herd prevalence this figure rises to 41.2% with a confidence limit from 16.4 to 90.2%. Only the cohabitation flocks factor with cattle flocks seems to be significant and can be considered a risk factor in small ruminants.

**Keywords:** Paratuberculosis, seroprevalence, small ruminants.



## D. Índice

A. Agradecimentos.....	I
B. Resumo.....	III
C. Abstract.....	IV
E. Índice de tabelas.....	VIII
F. Índice de gráficos.....	IX
G. Índice de figuras.....	X
H. Índice de anexos.....	XI
I. Abreviaturas e siglas.....	XII
1. Introdução.....	1
1.1. Paratuberculose.....	1
2. Classificação e caracterização do agente etiológico.....	4
2.1. Agente etiológico.....	4
2.2. Epidemiologia e transmissão.....	8
2.3. Resistência no ambiente e factores ambientais.....	11
2.4. Fisiopatogenia.....	13
2.5. Resistência dentro dos macrófagos.....	15
2.6. Resposta imunitária do hospedeiro.....	16
2.7. Sinais clínicos.....	18
2.8. <i>Post-mortem</i> .....	21
2.9. Diagnóstico.....	23
2.9.1. Métodos directos.....	24
2.9.1.1. Coloração de esfregaços.....	24
2.9.1.2. Cultura.....	24
2.9.1.3. PCR.....	25
2.9.2. Métodos indirectos.....	27
2.9.2.1. Fixação do Complemento.....	27
2.9.2.2. Prova alérgica cutânea.....	27
2.9.2.3. ELISA.....	28
2.9.2.4. Teste de imunodifusão em gel (AGID).....	29
2.9.2.5. Teste Gama-Interferão ( $\gamma$ -IFN).....	29
2.9.2.6. Bioquímica do soro e hematologia.....	30
2.10. Diagnósticos diferenciais.....	32

2.11.	Tratamento .....	33
2.12.	Prevenção e controlo .....	34
2.13.	Impacto económico .....	38
2.14.	Implicações zoonóticas.....	40
3.	Rastreio serológico .....	43
3.1.	Objectivos.....	43
3.2.	Material e métodos.....	44
3.2.1.	Caracterização da área de incidência do estudo .....	44
3.2.2.	Seleção do número de amostras a recolher por exploração.....	47
3.2.3.	Recolha e envio de amostras .....	49
3.2.4.	Técnica laboratorial utilizada .....	49
3.2.5.	Protocolo da técnica.....	50
3.2.6.	Validação e cálculos dos resultados do teste.....	51
3.2.7.	Classificação dos resultados das amostras no teste .....	52
3.2.8.	Análise estatística .....	52
3.3.	Resultados .....	53
3.3.1.	Raça dos animais sujeitos a estudo.....	56
3.3.2.	Relação dos resultados com a dimensão dos efectivos.....	57
3.3.3.	Coabitação dos rebanhos estudados com outras espécies.....	58
3.3.4.	Distribuição geográfica das explorações.....	59
4.	Discussão.....	61
5.	Conclusão .....	63
6.	Bibliografia.....	64
7.	Anexos .....	78

## E. Índice de tabelas

<b>Tabela 1:</b> Importância Clínica, características de crescimento e diferenciação bioquímica das diferentes micobactérias patogénicas (Adaptado de Quinn <i>et al.</i> , 2002)	6
<b>Tabela 2:</b> Efeito iceberg numa exploração de bovinos (Adaptado de Whitlock, 2009)	11
<b>Tabela 3:</b> Relação entre os estados da doença, presença de doença clínica e resultados dos testes de diagnóstico (Adaptado de Radostits <i>et al.</i> , 2002).....	13
<b>Tabela 4:</b> Distribuição das amostras obtidas e população representada por localidade do distrito de Beja. ....	44
<b>Tabela 5:</b> Distribuição da população e amostras estudadas por espécie. ....	44
<b>Tabela 6:</b> Número de animais rastreados de cada espécie e raça. ....	46
<b>Tabela 7:</b> Classificação dos resultados das amostras no teste. ....	52
<b>Tabela 8:</b> Variáveis da sensibilidade de rebanho para 5 amostras.....	54
<b>Tabela 9:</b> Variáveis da sensibilidade de rebanho para 7 amostras.....	54
<b>Tabela 10:</b> Variáveis da sensibilidade de rebanho para 10 amostras.....	54
<b>Tabela 11:</b> Estimativa da prevalência de rebanho real e variáveis associadas. ....	55

## F. Índice de gráficos

<b>Gráfico 1:</b> Distribuição dos rebanhos analisados por espécie. ....	45
<b>Gráfico 2:</b> Distribuição dos rebanhos analisados entre animais de raças puras e de raças cruzadas. ....	45
<b>Gráfico 3:</b> Distribuição da percentagem de amostras de sangue analisadas por espécie e raça. ....	46
<b>Gráfico 4:</b> Distribuição das explorações pelas 3 diferentes amostragens feitas nos rebanhos. ....	48
<b>Gráfico 5:</b> Distribuição das explorações em função da classificação. ....	53
<b>Gráfico 6:</b> Valores de prevalência aparente e real. ....	56
<b>Gráfico 7:</b> Distribuição dos rebanhos positivos e negativos pelas correspondentes raças. ....	57
<b>Gráfico 8:</b> Distribuição dos rebanhos positivos e negativos em função da amostragem. ....	58
<b>Gráfico 9:</b> Distribuição dos rebanhos positivos e negativos em função da coabitação com bovinos. ....	58
<b>Gráfico 10:</b> Distribuição dos rebanhos pelas localidades do distrito de Beja. ....	59



## G. Índice de figuras

<b>Figura 1:</b> Colónias de <i>M. paratuberculosis</i> crescidas em meio agar (Adaptado de <a href="http://www.johnes.org/beef/_Colony7H11.html">http://www.johnes.org/beef/_Colony7H11.html</a> ) (Collins & Manning, 2011).....	7
<b>Figura 2:</b> Micrografia electrónica de varredura de <i>M. paratuberculosis</i> (Adaptado de <a href="http://www.johnes.org/beef/_EM_scanning.html">http://www.johnes.org/beef/_EM_scanning.html</a> ) (Collins & Manning, 2011) .....	7
<b>Figura 3:</b> Paratuberculose bovina: caquexia (Adaptado de <a href="http://www.lab9dejulio.com.ar/fotos/signos-clinicos_a233">http://www.lab9dejulio.com.ar/fotos/signos-clinicos_a233</a> ) (Laboratorio 9 de Julio - Diagnóstico Veterinario, 2011) .....	20
<b>Figura 4:</b> Paratuberculose ovina: animal emaciado e com afundamento da fossa paralombar (Adaptado de Scott, 2007) .....	20
<b>Figura 5:</b> Linfangiectasia intestinal (Foto de João Marques, 2011) .....	22
<b>Figura 6:</b> Linfangiectasia intestinal (Foto de João Marques, 2011) .....	22
<b>Figura 7:</b> Diferentes testes que podem ser utilizados no diagnóstico da paratuberculose (Adaptado de Buergelt <i>et al.</i> , 2004).....	31
<b>Figura 8:</b> Potenciais fontes de infecção humana (Adaptado de Chacon <i>et al.</i> , 2004) ...	41
<b>Figura 9:</b> Histologia do cólon humano e de animais em condições normais e de doença. a) Apresentação histológica normal de cólon humano. b) Cólon humano com doença de Crohn. Apresenta granulomas e processo transmural. c) Colon de bovino em estado avançado de paratuberculose, com inflamação da lâmina própria, granulomas e processo transmural (Adaptado de Chacon <i>et al.</i> , 2004).....	42
<b>Figura 10:</b> Distribuição geográfica das explorações.....	60

## H. Índice de anexos

<b>Anexo I:</b> Requerimento para Autorização de Utilização Especial de Medicamento Veterinário.....	79
--	----

## I. Abreviaturas e siglas

AGID – Teste de imunodifusão em gel (*Agar Gel Immunodiffusion*)

BVD – Diarreia bovina virus

DGV – Direcção Geral de Veterinária

ADN – Ácido desoxirribonucleico

DRAAL - Direcção Regional de Agricultura do Alentejo

ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay

ELISPOT – Enzyme-linked immunosorbent spot assay

FC – Fixação do complemento

HRPO – Horseradish peroxidase

HSx – Proteína de choque térmico (*Heat shock protein*)

IC – Intervalo de confiança

IL – Interleucina

Map – *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis*

PCR – Reacção em cadeia pela Taq polimerase (*Polymerase chain reaction*)

PFGE – Electroforese em campo pulsado (*Pulsed-field gel electrophoresis*)

PPD – Derivado proteico purificado

qPCR – PCR quantitativo

RFLP – Polimorfismo de comprimento de fragmentos de ADN (*Restriction fragment length polymorphism*)

Se – Sensibilidade

TCH – Hidrazida do ácido 2-tiofenocarboxílico (*Thiophen-2-carboxylic acid hydrazine*)

TNF – Factor de necrose tumoral

ZN – Ziehl-Neelsen

$\gamma$ -IFN – Gama-Interferão



## 1. Introdução

### 1.1. Paratuberculose

A paratuberculose, também conhecida por *Johne's Disease* ou Doença de Johne, foi relatada pela primeira vez na Alemanha em 1894, por H.A. Johne e L. Frothingham (citado por Manning & Collins, 2010). No entanto, os primeiros relatos associados a uma “doença de desperdício” em bovinos reportam a datas bastante mais antigas como 1807, por Eduard Skellet, e duas décadas mais tarde por W.A. Cartwright (1829). Durante a primeira década de 1900, a “enterite pseudotuberculosa”, como era conhecida na altura, foi reconhecida como uma nova doença (Manning & Collins, 2010). Apenas em 1912 F.W. Trowt consegue cultivar e isolar o agente, chamando-lhe inicialmente “*Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis, Johne*”, e reproduzir a doença em bovinos experimentalmente infectados em 1914 (Cocito *et al.*, 1994, Harris & Barletta, 2001, Manning & Collins, 2010).

De acordo com Juste (Juste & Perez, 2011), e Chiodini (Chiodini, 1993), os primeiros relatos de paratuberculose em pequenos ruminantes foram referidos por Stockman em ovinos, em 1911, e 13 anos mais tarde, em 1924, em caprinos.

A paratuberculose é causada pelo actualmente conhecido bacilo *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* (Map), dando origem a uma enterite granulomatosa crónica caracterizada por diarreia profusa e severa perda de condição corporal do animal. A doença distribui-se mundialmente e é responsável por significativas perdas económicas na produção animal e nas suas indústrias associadas (Stevenson *et al.*, 2009, Uzoigwe *et al.*, 2007).

É basicamente uma doença dos ruminantes domésticos, incluindo bovinos, ovinos, caprinos e veados de criação cinegética, contudo a abrangência de hospedeiros silvestres pode considerar-se muito ampla. Inclui espécies ruminantes silvestres, como veados e muflões (Boadella *et al.*, 2010, Pribylova *et al.*, 2011), bem como não-ruminantes, como coelhos selvagens e lebres e seus predadores, incluindo raposas, doninhas e lobos. Foi também identificada em porcos selvagens, aves e primatas (Alvarez *et al.*, 2005, Beard *et al.*, 2001, Deutz *et al.*, 2005, Florou *et al.*, 2008, Maio *et al.*, 2011, Uzoigwe *et al.*, 2007).

A paratuberculose têm também especial atenção devido às investigações sobre a Doença de Crohn, onde crescem evidências do envolvimento do *Mycobacterium avium*

subespécie *paratuberculosis* com a síndrome entérica granulomatosa de humanos e consequente impacto na Saúde Pública Mundial, tal como referido nos recentes trabalhos que indicam uma associação entre *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* e a Doença de Crohn (Eltholth *et al.*, 2009, Grant *et al.*, 2001, Mendoza *et al.*, 2009, Sechi *et al.*, 2007, Uzoigwe *et al.*, 2007).

Já em 1975, segundo Julian, na Inglaterra e País de Gales a doença era considerada de grande importância económica e a mais importante em determinadas áreas para o gado bovino. Segundo um relatório inglês de 1959 (Withers, 1959), com base na cultura de linfonodos mesentéricos de bovinos abatidos entre 1947 e 1959, indicou que 11% de todos os animais estavam infectados. Outros trabalhos revelaram que 20-30% dos bovinos enviados para abate eram portadores da doença de Johne (Julian, 1975). Já nesta altura a doença era considerada enzoótica em muitos países da Europa, tais como Holanda, Bélgica, França, Dinamarca e Rússia (Julian, 1975).

Tendo por base estudos actuais, a paratuberculose é endémica por toda a Europa com apenas a Suécia a manter estatuto de indemne de paratuberculose (Stevenson *et al.*, 2009). No entanto esta afirmação pode-se considerar controversa, pois estudos separados por meses, afirmam que nenhum país Europeu tenha publicado informações suficientes para se afirmar livre de *M. paratuberculosis* ou, apenas com uma prevalência próxima de zero (Nielsen & Toft, 2009). Segundo este estudo, devido a limitações dos trabalhos desenvolvidos, apenas estimativas da prevalência e não conclusões sobre a prevalência real da doença podem ser consideradas ao nível de toda a Europa. A estimativa para uma verdadeira prevalência entre os bovinos dentro dos rebanhos aproxima-se a 20%, a qual era considerada de pelo menos 3 a 5% em vários países. A prevalência estimada entre os rebanhos bovinos parece ser 50% ou mais. Em relação as prevalências estimadas dentro dos efectivos de pequenos ruminantes não existem informações, e a prevalência estimada entre os rebanhos foi 20%, com apenas informações referentes a Espanha e Suíça (Nielsen & Toft, 2009). Noutros trabalhos realizados em Espanha na região de Madrid, a prevalência estimada nos rebanhos de pequenos ruminantes, essencialmente ovelhas, foi de 44% (Mainar-Jaime & Vazquez-Boland, 1998, Muskens *et al.*, 2001).

Nos Estados Unidos, estima-se que as perdas devidas à paratuberculose sejam de 1,5 biliões de dólares americanos por ano no sector agrícola, sendo esta considerada uma das mais graves doenças que afectam os bovinos leiteiros. No entanto a avaliação

precisa das perdas de produtividades e lucros num efectivo ou num país são difíceis de calcular, o que pode dar origem a que o impacto da doença seja subestimado (Harris & Barletta, 2001).

Estudos do ministério da agricultura dos Estados Unidos estimam que 22% das explorações de bovinos leiteiros e 8% das explorações de bovinos de carne sejam positivas para o *M. paratuberculosis*. Contudo especialistas na área reconhecem que esses números são subestimados, e a maioria acredita que a prevalência das explorações de bovinos leiteiros dos Estados Unidos ronde os 80%, e embora nas explorações de carne a prevalência possa ser menor, esta, baseada na sua experiência clínica, afirmam ser perturbadoramente mais alta que a apresentada (Collins, 2009).

No continente Africano a doença também é considerada endémica, existindo relatos da doença de países como a Mauritânia, Sudão, Etiópia, Quênia, Uganda, Tanzânia, Zaire, Ghana, Nigéria, Gabão, Zimbabué, Suazilândia, Zâmbia, e África do Sul (Buergelt *et al.*, 2004, Pandey *et al.*, 1987).

O primeiro caso na África do Sul foi diagnosticado num bovino em 1923, e entre 1976 e 1990, foram confirmados 42 novos casos individuais em bovinos. Em ovinos, o primeiro caso foi em 1967, num carneiro Merino importado da Alemanha, sendo o primeiro rebanho positivo relatado em 1988 numa propriedade do estado na província de Mpumalanga. Entre 1996 e 1999, foram identificados mais 52 rebanhos como positivos, podendo-se considerar esta, uma doença emergente na região (Michel & Bastianello, 2000), o que levou a que esta passasse a ser uma doença de notificação obrigatória na África do Sul desde 1997 (Buergelt *et al.*, 2004).

Na Austrália existe um programa nacional de controlo para a doença nos ovinos, lançado em 1997 (Allworth & Kennedy, 2000). No início da década de 90 estimava-se que a prevalência nos rebanhos de ovinos variava de 9 a 23% e de bovinos de 4 a 40%, com perdas anuais de 92 milhões e 7,5 milhões de dólares australianos respectivamente (Allworth & Kennedy, 2000, Buergelt *et al.*, 2004).

Relativamente a Portugal, pouca informação existe publicada sobre a situação do país, quer ao nível de grandes ou pequenos ruminantes. Segundo um estudo de Mendes, na região da grande Lisboa em pequenos ruminantes, a seroprevalência de rebanhos infectados na região foi de 27% (Mendes *et al.*, 2004). Numa outra região um outro trabalho de 2007, realizado na região da Serra da Estrela apresenta uma seroprevalência de rebanho em ovinos da região de aproximadamente 84% (Vala *et al.*, 2007).

## 2. Classificação e caracterização do agente etiológico

### 2.1. Agente etiológico

A paratuberculose é causada pela bactéria *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* (Map), bactéria intracelular facultativa (Buergelt *et al.*, 2004), pertencente à família *Mycobacteriaceae* e actualmente classificada como um clone patogénico do complexo *Mycobacterium avium* (Turenne & Alexander, 2010).

Estas são bactérias aeróbias, não esporuladoras, sem motilidade e ácido-resistentes (Quinn *et al.*, 2002), cuja morfologia se apresenta muito semelhante ao bacilo de Koch (Ferreira & Ferreira, 1990), possuindo entre espécies diferenças individuais de tamanho, podendo nalguns casos atingir 4 µm de comprimento, enquanto o *M. paratuberculosis* geralmente possui 0,3 a 0,5 µm de largura e 1 a 2 µm de comprimento (Ferreira & Ferreira, 1990, Quinn *et al.*, 2002).

É um bacilo rectilíneo ou ligeiramente encurvado (Figura 2), com as extremidades afiladas ou arredondadas, Gram-positivo, que se apresenta isolado ou em pequenos grupos nos esfregaços. O elevado teor lipídico e de ácidos micólicos da sua parede celular dificulta a absorção dos corantes utilizados e a consequente coloração pelo Gram (Ferreira & Ferreira, 1990, Quinn *et al.*, 2002).

A técnica de Ziehl-Neelsen (ZN) é uma técnica de coloração de bactérias mais agressiva que a técnica de Gram, e é usada para diferenciar as micobactérias de outras bactérias. Devido ao elevado teor lipídico da parede celular destas, a fucsina não é removida pelo diferenciador ácido-alcoólico e as micobactérias permanecem coradas de vermelho, e são chamadas ácido-resistentes ou ZN-positivas (Quinn *et al.*, 2002).

As micobactérias incluem espécies que variam desde saprófitas ambientais, invasoras oportunistas e patogénicas obrigatórias. A classificação e diferenciação destas assentam nas diferenças de cultura *in-vitro*, testes bioquímicos, inoculação animal, cromatografia e técnicas moleculares (Quinn *et al.*, 2002).

As colónias primárias de *M. paratuberculosis* são geralmente pequenas, 1 a 5 mm de diâmetro, húmidas, convexas e normalmente brancas sem pigmentação, contudo algumas estirpes também formam colónias pigmentadas de amarelo (Figura 1) (Buergelt *et al.*, 2004).

De modo geral as colónias de micobactérias patogénicas tem um crescimento lento, não sendo evidentes até a cultura ter pelo menos 3 semanas de incubação. Por



outro lado, as colónias de micobactérias saprófitas têm um crescimento rápido e são visíveis logo ao fim de alguns dias. As temperaturas óptimas de crescimento são de 37 °C com excepção das micobactérias pertencentes ao complexo *Mycobacterium avium* que tem um intervalo de temperaturas entre 37 e 43 °C (Quinn *et al.*, 2002).

As duas principais características de diferenciação cultural para o *M. paratuberculosis* são o seu lento crescimento (mais lento que as restantes micobactérias) de 16 semanas no mínimo, e a dependência em micobactina exógena (Harris & Barletta, 2001), a qual a bactéria usa na sua actividade respiratória (Tabela 1) (Buergelt *et al.*, 2004).

Genotipicamente apesar de ter 99% de ADN homólogo a *Mycobacterium avium* subespécie *avium*, *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* pode ser distinguido pela presença de múltiplas cópias do elemento de inserção IS900, específico deste (Chacon *et al.*, 2004), ou da cópia única de ADN que expressa uma proteína de choque térmico (HSx), entre outros marcadores de ADN (Whitlock, 2009).

Inicialmente foram criados dois grupos de estirpes para o *M. paratuberculosis* de acordo com as espécies onde foram primeiro isolados, designando-os “S” (*sheep*) para o grupo das ovelhas e “C” (*cattle*) para o grupo dos bovinos. No entanto veio posteriormente a concluir-se que *M. paratuberculosis* podia ser isolado a partir de uma ampla gama de espécies e que as espécies de origem não eram necessariamente um indicador preciso do tipo de estirpe (Stevenson, 2010).

Recentes avanços na biologia molecular permitiram aprofundar os métodos tipificação e diferenciação das estirpes. Actualmente continua a haver dois grandes grupos, o Grupo I e o Grupo II, anteriormente chamados “S” e “C” respectivamente. Classifica-se ainda um subgrupo do Grupo I como Grupo III ou “intermediário”, devido a proximidade fenotípica e de hospedeiros preferenciais, sendo principalmente isolado em ovelhas e cabras (Stevenson *et al.*, 2009, Stevenson, 2010). Estes três grupos de estirpes podem ser diferenciados pelas técnicas de IS900-RFLP, PFGE e PCR (Stevenson *et al.*, 2009). Paralelamente, também para o grupo II foi proposta uma divisão, onde foi criado um Grupo “B” (*bison*), o qual ainda não é definido como grupo mas sim subgrupo do Grupo II (Stevenson *et al.*, 2009, Stevenson, 2010).

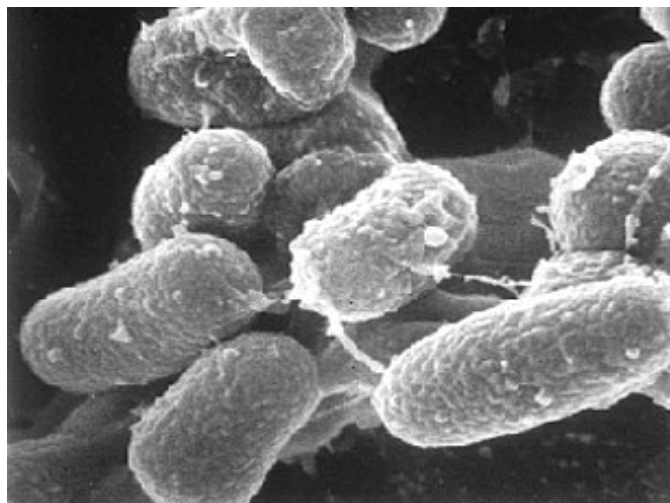
**Tabela 1:** Importância Clínica, características de crescimento e diferenciação bioquímica das diferentes micobactérias patogénicas (Adaptado de Quinn *et al.*, 2002).

	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. avium complex</i>	<i>M. avium subsp. paratuberculosis</i>
<b>Importância da Infecção</b>	Importante no homem e ocasionalmente em cães	Importante em bovinos e ocasionalmente noutros animais domésticos e homem	Importante nas aves domésticas. Infecções oportunistas no homem e nos animais domésticos podem também acontecer	Importante nos bovinos e outros ruminantes
<b>Condições e Características de Cultura</b>				
Taxa de crescimento	Lento (3 – 8 semanas)	Lento (3 – 8 semanas)	Lento (2 – 6 semanas)	Muito Lento (+ de 16 semanas)
Temperatura óptima de incubação	37 °C	37 °C	37 – 43 °C	37 °C
Condições atmosféricas	Aeróbio	Aeróbio	Aeróbio	Aeróbio
Características das colónias	Rugosa, brilhante, difícil de separar	Coloração Creme, rugosa na zona central, fácil de separar	Pegajosa, esbranquiçada e fácil de separar	Pequena, hemisférica, podendo ser pigmentada em alguns casos
Suplementos essenciais para o crescimento	Nenhum	Nenhum	Nenhum	Micobactina
Efeito da adição de glicerol	Estimula o crescimento	Inibe o crescimento	Estimula o crescimento	
Efeito da adição de piruvato de sódio	Nenhum efeito	Estimula o crescimento	Nenhum efeito	
<b>Diferenciação Bioquímica</b>				
Acumulação de Niacina	+	-	-	
Produção de Pirazinamidase	+	-	+	
Redução dos Nitratos	+	-	-	
Susceptibilidade ao TCH (10µg/ml) <sup>1</sup>	Resistente	Susceptível	Resistente	

<sup>1</sup> TCH, Hidrazida do ácido 2-tiofenocarboxílico



**Figura 1:** Colónias de *M. paratuberculosis* cultivadas em meio agar (Adaptado de [http://www.johnes.org/beef/\\_Colony7H11.html](http://www.johnes.org/beef/_Colony7H11.html)) (Collins & Manning, 2011).



**Figura 2:** Micrografia electrónica de varrimento de *M. paratuberculosis* (Adaptado de [http://www.johnes.org/beef/\\_EM\\_scanning.html](http://www.johnes.org/beef/_EM_scanning.html)) (Collins & Manning, 2011).

## 2.2. Epidemiologia e transmissão

É uma doença mundialmente difundida, afectando grande variedade de espécies animais. Dentro das espécies domésticas ocorre mais comumente em bovinos e em menor proporção em ovinos e caprinos (Radostits *et al.*, 2002), podendo no entanto afectar os mais variados artiodáctilos de cativeiro e ruminantes selvagens, como búfalos de água, o bisonte-americano, cervídeos (Boadella *et al.*, 2010, Fawcett *et al.*, 1995, Pribylova *et al.*, 2011), carneiros selvagens e caprinos das Montanhas Rochosas, ovinos da Berbéria, carneiros selvagens da Córsega e Sardenha, camelos, renas (Manning *et al.*, 1998), antílopes e lamas (Buergelt *et al.*, 2004, Radostits *et al.*, 2002). Em 2009, o isolamento de uma estirpe de *M. paratuberculosis* pertencente ao grupo II foi publicado pela primeira vez também numa girafa (Stevenson *et al.*, 2009).

Espécies não ruminantes podem também ser afectadas. Sendo hospedeiras e disseminadoras do agente, estas podem ter um grande contributo para a propagação e dificuldade de controlo da doença. Segundo vários autores, foram identificadas como portadoras da doença espécies selvagens tais como coelhos, lebres, ratos, raposas, lobos, javalis, aves e primatas (Alvarez *et al.*, 2005, Beard *et al.*, 2001, Deutz, *et al.*, 2005, Florou *et al.*, 2008, Maio *et al.*, 2011, Uzoigwe *et al.*, 2007).

O principal meio de infecção e transmissão é feco-oral, e faz-se através da ingestão do agente etiológico juntamente com o alimento e água. As fezes de animais doentes ou portadores, que estejam na fase de eliminação, são ricas em bacilos e facilmente conspurcam os pastos, pastagens e águas (Ferreira & Ferreira, 1990). Os animais podem também infectar-se aquando da sua própria higienização ao lambar um local contaminado (Kahn *et al.*, 2007).

Os animais mais susceptíveis à infecção são os neonatos. A transmissão para animais jovens ocorre principalmente através da amamentação com leite de uma progenitora portadora do microrganismo, ou que apresente os tetos conspurcados com este. Transmissão congénita pode ocorrer, acreditando-se que mais de 20% das infecções se dêem no útero das mães (Buergelt *et al.*, 2004). Contudo, a infecção no útero ocorre particularmente quando animais gestantes se encontram em estados finais de infecção e a bactéria se dissemina infectando múltiplos órgãos internos (Collins, 2009, Rohde & Shulaw, 1990). Segundo Radostits, a prevalência de infecção fetal em vacas com sinais clínicos da doença chega a 37% e em vacas sem sinais clínicos é de

8,6% (Radostits *et al.*, 2002). O agente *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* tem também sido isolado de sémen de touros (Larsen *et al.*, 1981) e embriões (Rohde *et al.*, 1990).

Existem animais que podem apresentar resistência à infecção, e mesmo em contacto com um ambiente contaminado e ingestão do agente, não desenvolvem a doença nem se tornam portadores desta (Buergelt *et al.*, 2004). Factores como a carga de microrganismos infectantes e a reacção do hospedeiro devem ser contabilizados nestas situações. Também é referido para os ovinos, espécie facilmente infectada experimentalmente, que posteriormente eliminam grandes quantidades de microrganismos, tendo-se observado que muitos destes recuperam espontaneamente (Radostits *et al.*, 2002). Em animais portadores assintomáticos, situações de stress como os partos, transportes, carências nutricionais ou outros factores imunossupressores (outras doenças por exemplo) podem converter a situação subclínica em doença clínica (Buergelt, *et al.*, 2004, Radostits *et al.*, 2002). A hipocalcémia é um dos principais factores pré-disponentes, e nos pequenos ruminantes a deficiência em cobalto também tem sido referida (Ferreira & Ferreira, 1990).

Informações sobre a incidência da doença nas diferentes raças são controversas, contudo, a frequência da doença em qualquer raça é proporcional ao número de animais dessa raça, sendo que a paratuberculose ocorre com maior frequência nas raças mais predominantes, o que pode variar de país para país, e isso pode ser atribuído a maior exposição dos animais à infecção do que a uma maior susceptibilidade das raças. Em relação aos bovinos leiteiros os bovinos de carne pastoreiam geralmente em áreas maiores, tendo menos contacto com outros bovinos e as suas fezes, sendo por isso a prevalência em bovinos leiteiros maior (Radostits *et al.*, 2002).

Na Europa, a doença tem-se difundido pelos vários países através das exportações e importações de animais de raça pura, clinicamente normais, porem infectados. A incidência da doença em climas temperados e tropicais húmidos, assim como em animais que são mantidos em condições pecuárias de confinamento e elevada densidade populacional, tem tendência a aumentar. Na Islândia, por exemplo, a doença em ovinos foi introduzida por um pequeno grupo de carneiros reprodutores importados da Alemanha (Radostits *et al.*, 2002). Em caprinos, a doença tem sido identificada com crescente frequência, e estes podem ser uma importante fonte de infecção quando

criados juntamente com ovinos. Esta prática é apontada como causa de elevado número de casos clínicos em alguns rebanhos de ovinos (Radostits *et al.*, 2002, Scott, 2007).

No caso de um bovino adulto entrar em contacto com o agente, é pouco provável que ele contraía a doença clínica e chegue a demonstrar os sinais clínicos pelos quais são identificados e removidos das explorações. Um bovino adulto pode, no entanto, tornar-se portador e eliminar o agente nas fezes, tornando-se vector da doença (Buergelt *et al.*, 2004). Em ovinos infectados, assim como nos restantes animais, o grau de eliminação fecal do *M. paratuberculosis* torna-se cada vez maior com a evolução do estado da doença, estes libertam pequenas quantidades de microrganismos para o ambiente até apresentarem sinais clínicos. Contudo, nos últimos estados, com o aparecimento da doença clínica, inicia-se uma fase de grande libertação de microrganismos (Radostits *et al.*, 2002, Sargison, 2008).

Vários factores que contribuem para uma maior susceptibilidade dos animais jovens podem ser enumerados. Animais em amamentação apresentam uma acidez intestinal superior aos adultos, o que favorece a sobrevivência do microrganismo (Richards, 1981). As presenças de lactoferrina e transferrina presentes no colostro, favorecem a sobrevivência e crescimento da bactéria, servindo-lhe de fonte de ferro para a produção de micobactina. Também a presença de anticorpos maternos no leite, como as opsoninas, facilitam a entrada do *M. paratuberculosis* nas células M das placas de Peyer e enterocitos dos animais (Buergelt *et al.*, 2004).

A paratuberculose progride através de quatro estados de evolução, sendo mais evidente nos bovinos. Sem descrever pormenorizadamente esses estados – a qual será descrita no capítulo sinais clínicos – é importante realçar as diferentes fases de eliminação do agente. No estado I, conhecido como silencioso, em animais jovens com até 2 anos de idade, a eliminação fecal não acontece, assim como os restantes sinais clínicos. No estado II, doença subclínica, em animais adultos portadores, podem ocorrer algumas manifestações da patologia e 15 a 25% dos animais apresentam cultura de fezes positiva. No estado III, doença clínica, mais comum em animais de 2 a 6 anos de idade, a eliminação fecal caracteriza-se por descargas contínuas ou intermitentes de microrganismos. No estado IV, doença clínica avançada, os animais apresentam o máximo da sintomatologia clínica, assim como de descargas fecais do agente. Em número total de animais infectados num rebanho, a doença clínica representa a ponta do “iceberg” (Tabela 2) (Buergelt *et al.*, 2004, Radostits *et al.*, 2002).

**Tabela 2: Efeito iceberg numa exploração de bovinos (Adaptado de Whitlock, 2009).**

Estado IV	Doença clínica avançada	1 animal
Estado III	Doença clínica	1 – 2 animais
Estado II	Adultos portadores assintomáticos	6 – 8 animais
Estado I	Infecções silenciosas em animais jovens	10 – 15 animais
<b>Total</b>		<b>15 – 25 animais</b>

### 2.3. Resistência no ambiente e factores ambientais

Uma vez no ambiente, o *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* resiste no solo por um longo período de tempo. A sua sobrevivência no solo com fezes parece ser superior a 13,5 meses (Pribylovak *et al.*, 2011) segundo alguns autores, e de 11 meses (Ferreira & Ferreira, 1990) segundo outros, e no estrume de bovino e suíno resiste entre 3 a 8,5 meses. Em águas presas no ambiente consegue sobreviver tempos superiores a 12 meses (Pribylova *et al.*, 2011), em água estéril 7 meses e congelado mantêm-se activo por o período de 1 ano (Ferreira & Ferreira, 1990).

Apresenta grande resistência à dessecação, suportando a acção directa do sol por 10 meses e dessecado e conservado a 38 °C resiste 17 meses. Porém, na urina não se mantêm activo por um período superior a 7 dias, em formol a 5% por 10 minutos e em creolina a 5% por 2 horas (Ferreira & Ferreira, 1990).

Estudos sobre a sobrevivência nas plantas são limitados, e de acordo com o estudo de Whittington, a sobrevivência em partes aéreas dos pastos foi até 6 meses no máximo. Em silagens infectadas artificialmente, o crescimento microbiano não se verificou (Pribylova *et al.*, 2011, Whittington *et al.*, 2004).

Segundo um recente estudo publicado em 2011, pretendendo uma avaliação da presença de *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* nos solos e plantas, 15 semanas após contaminação por fezes de muflões infectados, não foi demonstrada a presença de células viáveis do microrganismo no meio. No entanto, quase todas as amostras colhidas foram positivas ao teste de PCR quantitativo (qPCR) com pesquisa do elemento IS900 do agente. O elemento IS900 não só foi encontrado nas partes aéreas



das plantas, mas também nas raízes e amostras de solos. O nível de contaminação dos solos e plantas foi influenciado pela humidade e percentagem de argila, assim como pela profundidade de onde foram recolhidas as amostras, e não pelas concentrações iniciais de contaminação (Pribylova *et al.*, 2011). No meio ambiente as características dos solos também podem influenciar as prevalências da doença nas explorações assim como a sobrevivência do microrganismo nestas.

A espécie *M. paratuberculosis* necessita de ferro para a sua sobrevivência e multiplicação, contudo pode apresentar dificuldade em utilizá-lo. Com pH baixo a solubilidade do ferro aumenta e favorece a sua absorção por parte do microrganismo, o que leva a crer que solos com pH baixo e elevadas percentagens de ferro estão associados a uma maior sobrevivência do agente e prevalência da doença (Dhand *et al.*, 2009).

Estudos publicados nos Estados Unidos em bovinos leiteiros e na África do Sul em ovinos descrevem uma maior prevalência da doença em solos ácidos (Johnson-Ifearulundu & Kaneene, 1999, Michel & Bastianello, 2000). Em contraste, na Holanda, o pH do solo não foi relevante nas explorações de bovinos de leite avaliadas e na Austrália a aplicação de cal nos solos para subir o pH não obteve resultados diferentes na sobrevivência do *M. paratuberculosis* (Muskens *et al.*, 2003, Whittington *et al.*, 2004).

Segundo Dhand, solos com altas percentagens de matéria orgânica e argila apresentam maiores prevalências de paratuberculose nos ovinos, e solos com maior percentagem de areia e azoto menores prevalências. O aumento do conteúdo em ferro nos solos também favorece o agente, no entanto a associação com o pH não foi comprovada (Dhand *et al.*, 2009).

A maior prevalência de *M. paratuberculosis* em solos argilosos e com mais matéria orgânica assenta na teoria de maior quantidade de nutrientes disponíveis e facilidade de aderência às partículas argilosas por parte da bactéria e à sua retenção na superfície dos solos (Dhand *et al.*, 2009).



## 2.4.Fisiopatogenia

A paratuberculose é caracterizada por uma enterite granulomatosa crónica, progressiva, principalmente de ruminantes. O *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* é capaz de produzir uma infecção subclínica, que se pode estender por 3-5 anos, sendo a ingestão a principal via de infecção dos animais e as superfícies mucosas, a primeira porta de entrada do agente (Stabel, 2010).

Após a ingestão, o microrganismo localiza-se na mucosa do intestino delgado e tecido linfóide associado a ele, e, em menor extensão, nas tonsilas e linfonodos retrofaríngeos.

O local primário de multiplicação da bactéria é a porção final do intestino delgado e o intestino grosso, estando relatados pelo menos 3 diferentes grupos de animais de acordo com a relação bactéria-hospedeiro (Tabela 3).

Num grupo, enquadram-se os animais resistentes, que rapidamente desenvolvem resistência a bactéria, e controlam a infecção, não sendo eliminadores de *Mycobacterium*. Noutro grupo, a infecção não é completamente controlada, apresentando animais que irão controlar parcialmente a infecção e onde ocorrem eliminações intermitentes de bactérias nas fezes, e outros animais considerados intermediários, que incubam o agente e são eliminadores de elevada carga microbiana para o ambiente. Por último, o grupo de doença clínica avançada, em que o microrganismo persiste na mucosa intestinal e os animais desenvolvem o quadro clínico (Radostits *et al.*,2002).

**Tabela 3:** Relação entre os estados da doença, presença de doença clínica e resultados dos testes de diagnóstico (Adaptado de Radostits *et al.*, 2002).

	Animais resistentes	Intermediários (período de incubação)	Doença clínica avançada
Sinais clínicos presentes	-	+	+++
Eliminação fecal	+ (-)	++	+++
Resposta de anticorpos	-	++	+++
Teste cutâneo	+ (-)	+ (-)	+ (-)
Transformação linfocítica	+++	+++	+ (-)

Segundo descrito em 2001 por Sigurdardottir, a entrada do *M. paratuberculosis* na parede intestinal, acontece principalmente através das células M associadas às placas de Peyer (Sigur-Dardottir *et al.*, 2001). Em 2005, segundo este mesmo autor (Sigurdardottir *et al.*, 2005), foram utilizadas pequenas porções intestinais de cabritos, preparadas a partir de áreas com e sem placas de Peyer, e foram incubadas com solução bacteriana, o que permitiu mais tarde observar que as bactérias penetraram na mucosa intestinal do jejuno, em ambas áreas, com e sem placas. Um estudo mais recente efectuado em ratos, obteve o mesmo resultado, confirmando que o *M. paratuberculosis* não era dependente das placas de Peyer para infectar o organismo (Bermudez *et al.*, 2010). Podemos concluir, portanto, que *M. paratuberculosis* não só entra na mucosa intestinal através das células M, mas também através dos enterócitos. A densa localização apical de integrinas, que são proteínas de adesão das células M, pode no entanto, eventualmente explicar a preferência de entrada da bactéria através dessas mesmas células (Sigurdardottir *et al.*, 2005).

Depois de atravessar a barreira epitelial do intestino, as bactérias são fagocitadas por macrófagos ou células dendríticas (Stabel, 2010), que são as células-alvo para este microrganismo, e uma vez no interior destas resistem à degradação enzimática e tóxica multiplicando-se e levando à ruptura das células infectadas (Tessema *et al.*, 2001).

A resistência intracelular das micobactérias deve-se em grande parte a sua espessa parede celular rica em lípidos, que apresenta um elevado efeito de barreira e vários componentes biologicamente activos que diminuem a função bactericida dos macrófagos (Tessema *et al.*, 2001).

Uma vez dentro dos macrófagos, o microrganismo continua a multiplicar-se, provocando o aumento de volume das células e deslocamento do núcleo destas para os pólos. Com isto, os macrófagos dispõem-se em agregados celulares, adoptando o carácter de células epitelióides. Com a continuada multiplicação, estas células acabam por morrer, libertando as bactérias, que são novamente fagocitadas por novos macrófagos. Regista-se assim, um enorme acumulado de macrófagos carregados de bactérias, primeiro nas vilosidades e posteriormente também nas camadas profundas da lâmina própria, resultando um aumento de volume da parede intestinal (Seffner, 1999).

Como resposta imunitária do hospedeiro, ocorre um aumento da produção de factor de necrose tumoral (TNF), que aumenta a reacção inflamatória e promove o

desenvolvimento de lesões granulomatosas que, juntamente com o espessamento das vilosidades e lâmina própria resultam no início do quadro clínico da doença (Buergelt *et al.*, 2004).

Pensa-se, que estes granulomas representam uma forma de resposta tardia por parte do hospedeiro, na tentativa de controlar e isolar a bactéria, impedindo-a de se espalhar pelo intestino e linfonodos (Coussens *et al.*, 2010). Contudo, já foi referido que as micobactérias podem tirar partido dos granulomas benéficamente, apresentando nestes um crescimento bacteriano antecipado e recrutando novos macrófagos ao local de infecção, permitindo-as migrar através do granuloma (Davis & Ramakrishnan, 2009) e usá-los como pontes para infectar novas porções intestinais, assim como outros órgãos incluindo linfonodos mesentéricos e glândula mamária (Coussens *et al.*, 2010).

## 2.5. Resistência dentro dos macrófagos

Actualmente não se tem total conhecimento de como organismos como *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis*, ou outras espécies de micobactérias, sobrevivem dentro dos macrófagos. Também não está claro quais os seus efeitos sobre macrófagos infectados e as interacções com outras células imunitárias dos hospedeiros.

Os macrófagos são células destinadas a destruir bactérias invasoras e apresentar antígenos para outras células imunitárias efectoras, tais como os linfócitos T. Uma vez no interior do macrófago, a micobactéria parece permanecer sem ser reconhecida para o resto do sistema imunitário e, particularmente para as células T (Coussens *et al.*, 2010).

Pensa-se que estes microrganismos conseguem sobreviver dentro dos macrófagos através vários mecanismos de resistência. Procuram o uso selectivo de vias de entrada que inibam o ataque oxidativo, através da ligação a receptores específicos, promovem a inibição da maturação e acidificação dos fagossomas e modulam a cooperação entre a imunidade inata e específica, modulando a produção de citocinas e apresentação de antígenos (Sigurethardottir *et al.*, 2004, Tessema *et al.*, 2001).

Inicialmente, aquando da entrada nos macrófagos, há uma simultânea replicação e morte bacteriana, o que reflecte uma resposta inicial por parte do hospedeiro. Este facto pode dever-se a uma rápida resposta de acidificação do fagossoma que permite que em

algumas células se funda o fagossoma-lisossoma. Como resultado final desta fusão ocorre destruição da micobactéria e apresentação antigénica aos linfócitos T. Contudo, a maioria dos fagossomas que contem o agente falham na sua maturação, não conseguindo acabar por destruir o invasor (Coussens *et al.*, 2010).

Os glicolípidos estruturais presentes na parede bacteriana, tais como fosfoglicolípidos, estimulam a produção de linfócitos B, que actuam na fixação de radicais de oxigénio e azoto e auxiliam na fixação do complemento C3, que promove a fagocitose e permite evitar mecanismos microbicidas dos macrófagos. Os lipoarabinomanos inibem a proliferação de linfócitos e a actividade do Interferon-gama ( $\gamma$ -IFN), e estimulam a produção de TNF, que como descrito anteriormente favorece a viabilidade e desenvolvimento da micobactéria (Buergelt *et al.*, 2004).

Estudos de interacções entre lipoarabinomanos de micobactérias e macrófagos indicam que estes são indispensáveis para bloquear a maturação do fagossoma (Coussens *et al.*, 2010).

## 2.6. Resposta imunitária do hospedeiro

Após atravessar a camada epitelial da mucosa do intestino, *M. paratuberculosis* é fagocitado por macrófagos subepiteliais, onde se consegue multiplicar e evitar os mecanismos de destruição das células ou, onde é processado e apresentado como antígenos aos linfócitos T (Sigurethardottir *et al.*, 2004).

A batalha entre o hospedeiro e o agente patogénico envolve uma complexa interacção entre macrófagos e linfócitos. Esta promove a secreção de uma cascata de citocinas e o recrutamento de células imunitárias para o local de infecção, promovendo a sua activação e proliferação. Na infecção por micobactérias são envolvidas, tanto a imunidade humoral como a mediada por células, embora a última se revele mais importante (Sigurethardottir *et al.*, 2004).

A activação dos macrófagos após a ingestão de *M. paratuberculosis* é provavelmente dependente da interacção do agente patogénico com os receptores de superfície dos macrófagos, como receptores de reconhecimento padrão, presentes em macrófagos e células dendríticas (Stabel, 2010). Esta activação é essencial para tornar os macrófagos efectivos na destruição da micobactéria, onde a citocina  $\gamma$ -IFN,

principalmente secretada por linfócitos T-auxiliares CD4 + é considerada o mais importante factor de activação de macrófagos. Os macrófagos activados iniciam a produção de várias citocinas como a interleucina-1 (IL-1), IL-6, IL-12 e TNF- $\alpha$ , que vão desencadear nova activação de células T, B e macrófagos, e induzir nova produção de citocinas (Sigurethardottir *et al.*, 2004).

Linfócitos T activos produzem IL-2, que auxilia na sua expansão clónica em linfócitos T-auxiliares CD4+ e T-citotóxicos CD8+. Após a activação, os linfócitos T CD4+ diferenciam-se em subconjunto Th1 ou Th2, com base na natureza do antigénio que lhe é apresentado (Stabel, 2010).

A manipulação das células auxiliares Th1 e Th2 está sob influência da IL-12. Enquanto as células Th1 produzem predominantemente IL-2, TNF, e  $\gamma$ -IFN, os quais estão directamente relacionados com a resposta imunitária celular, por sua vez, as células Th2, produzem IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, que estão relacionadas com a resposta imunitária humoral (Buergelt *et al.*, 2004).

Os linfócitos B são muitas vezes ignorados nas discussões sobre a imunidade protectora contra as micobactérias, pois de facto, a presença de anticorpos para *M. paratuberculosis* parece apresentar indicação da doença e não apresentar protecção para os animais infectados (Stabel, 2000).

A paratuberculose pode ser considerada uma doença dinâmica, que flutua entre períodos de imunidade celular, em que o hospedeiro é bem-sucedido no controlo do agente, e períodos de imunidade humoral, em que perde capacidade imunitária contra este. A doença clínica é uma consequência desta perda de imunidade, a qual apresenta períodos de remissão e agudização durante o curso da infecção (Buergelt *et al.*, 2004).

Nos ovinos, encontram-se dois tipos de patologia que estão correlacionados com o tipo de resposta imunitária do hospedeiro (Sharp, 2007). A forma mais comum, conhecida como multibacilar ou lepromatosa, corresponde a uma forte resposta imunitária humoral e fraca ou ausente resposta celular (Gillan *et al.*, 2010), onde predominantemente encontramos citocinas produzidas por linfócitos Th2, como IL-4 e IL-10 (Sharp, 2007).

Uma outra forma menos comum, conhecida como paucibacilar ou tuberculoide, mostra uma forte resposta imunitária celular (Gillan *et al.*, 2010) e uma ausente ou muito fraca presença de anticorpos. Temos predominantemente presença de citocinas produzidas por linfócitos Th1, como IL2 e  $\gamma$ -IFN, e as bactérias parecem ter degenerado

no interior dos macrófagos presentes nas lesões. Esta forma tuberculoide reflecte a eficiente resposta imunitária do hospedeiro perante a bactéria, controlando a infecção e impedindo que esta se alastre para outras porções intestinais (Sharp, 2007).

No entanto, um recente trabalho (de Silva *et al.*, 2011) refere que a IL-10 pode ser detectada no sangue e linfonodos ilíaco e do jejuno, 4 meses após o contacto com o agente. Nesse estudo foram acompanhados três grupos de ovinos, um de controlo, sem nunca ter entrado em contacto com a doença, outro infectado experimentalmente e outro exposto a infecção natural, com o objectivo de medir a secreção de IL-10 quatro meses após a exposição. A secreção de IL-10 foi significativamente maior nos animais expostos, sem lesões ou com lesões paucibacilares, quando comparados com animais com lesões multibacilares. Estes resultados demonstram que a resposta imune precoce não é puramente tipo linfócitos Th1 e um predomínio de  $\gamma$ -IFN, e que a IL-10 aumenta a sua actividade logo após a exposição ao *Mycobacterium* e pode vir a desempenhar um importante papel diagnóstico precoce da doença (de Silva *et al.*, 2011).

## 2.7. Sinais clínicos

Num rebanho, a grande maioria dos animais infectados apresenta-se clinicamente normal e não manifesta qualquer diferença em relação aos seus companheiros. Permanecem assintomáticos durante o período de incubação da doença, que se pode estender por tempos tão longos como de 2 a 10 anos.

Com o avançar nos estados da doença, os animais evidenciam sinais como uma gradual perda de condição corporal e brilho no pelo, com alterações na consistência das fezes e diminuição nas produções de leite e uma normal condição de apetite e alimentação (Whitlock, 2009).

No caso dos bovinos, uma diarreia persistente, não responsiva a tratamentos, e rápida perda de condição corporal com manutenção do apetite e ausência de febre, são sinais característicos de paratuberculose. A doença clínica é detectada com maior frequência em explorações leiteiras, em animais com idades compreendidas entre 3 a 5 anos de idade. Contudo, em explorações com elevado grau de infecção e prevalência, animais mais jovens e expostos a grandes doses infectantes também podem apresentar sinais clínicos (Collins, 2009).

Nos bovinos a doença progride através de quatro estados, sendo que no I e II os animais não apresentam sinais de doença. No estado III, a doença clínica instala-se nos animais, apresentando uma diarreia crónica e gradual perda de peso. No entanto, durante todo o curso da doença o animal alimenta-se normalmente mas apresenta um aumento na ingestão de água. A temperatura, respiração e batimentos cardíacos apresentam valores normais. Inicialmente a diarreia apresenta-se intermitente com períodos normais de fezes. No estado IV, os animais demonstram sinais de doença avançada e agravamento dos sinais clínicos, apresentando-se fracos, letárgicos, emaciados e com uma diarreia profusa (Figura 3). Nesta fase, a condição dos animais deteriora-se rapidamente e com a acentuada diarreia os animais perdem grandes quantidades de água, podem apresentar edema submandibular devido a hipoproteinémia, entrando em estado de desidratação e caquexia, que os leva a morte (Radostits *et al.*, 2002, Whitlock, 2009).

Nos ovinos e caprinos, a perda de peso e emaciação crónica aparece normalmente entre 2 a 5 anos de idade e nem sempre é acompanhada por diarreia (Collins, 2009, Sargison, 2008). Estes animais apresentam dentição normal e conseguem alimentar-se adequadamente (Scott, 2007).

A maioria dos casos são detectados durante o inverno, em ovelhas em fases avançadas de gestação e associadas a outros factores de stress. Nestes animais, as fezes podem perder a consistência e a sua forma normal, mas não têm que apresentar diarreia necessariamente (Sargison, 2008).

Os animais afectados mostram-se alerta podendo, no entanto, encontrar-se fracos devido ao estado de emaciação. Apesar do normal apetite os animais apresentam o rúmen vazio, e afundamento das fossas paralombares (Figura 4). Alterações na pelagem também são características, assim como edema submandibular em estados avançados da doença (Scott, 2007).





**Figura 3:** Paratuberculose bovina: caquexia (Adaptado de [http://www.lab9dejulio.com.ar/fotos/signos-clinicos\\_a233](http://www.lab9dejulio.com.ar/fotos/signos-clinicos_a233)) (Laboratório 9 de Julio - Diagnóstico Veterinário, 2011).



**Figura 4:** Paratuberculose ovina: animal emaciado e com afundamento da fossa paralombar (Adaptado de Scott, 2007).



## 2.8. Post-mortem

Os animais que morrem com paratuberculose apresentam um emagrecimento extremo e grande perda de tonús dos tecidos (Ferreira & Ferreira, 1990).

No quadro anátomo-patológico de animais infectados podem-se observar diversas lesões macroscópicas, que podem variar desde a ausência completa de lesões a um marcado espessamento intestinal, com pregueamento da mucosa e linfonodos regionais aumentados e edematosos. No entanto, parece não haver correlação entre a gravidade dos sinais clínicos e a gravidade das lesões anatómicas, podendo observar-se casos de elevada gravidade nos quais o intestino se apresenta quase normal (Kahn *et al.*, 2007).

As lesões concentram-se principalmente na região do jejuno e íleo com espeçamento e congestão da mucosa, a qual pode atingir 4 a 5 vezes a sua espessura normal, com formação de pregas longitudinais e transversais que não se desfazem com estiramento da mucosa e podem apresentar-se cobertas por muco cinzento, esbranquiçado ou esverdeado (Ferreira & Ferreira, 1990).

Geralmente observa-se edema do mesentério, linfangiectasia (Figuras 5 e 6) e aumento dos linfonodos mesentéricos e ilíacos. Nos pequenos ruminantes, ao contrário dos bovinos, podem-se ainda desenvolver focos de caseificação com calcificação na parede intestinal e linfonodos (Kahn *et al.*, 2007, Seffner, 1999).

Do ponto de vista histológico, produz-se uma enterite granulomatosa difusa, caracterizada por uma progressiva acumulação de células epitelioides e macrófagos gigantes na mucosa intestinal (Kahn *et al.*, 2007).

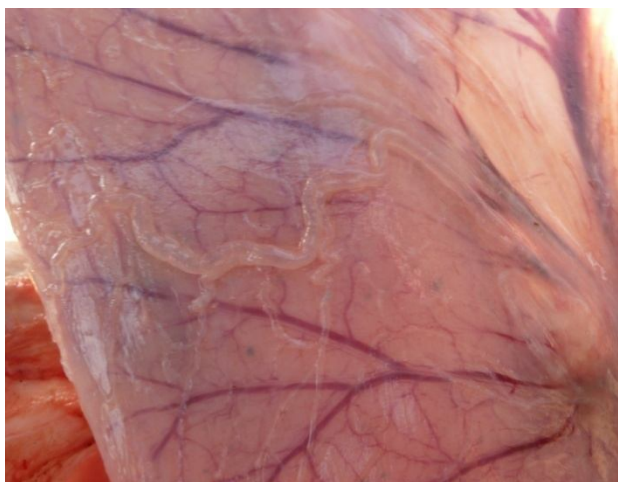
Microscopicamente, secções de lâmina própria intestinal apresentam-se repletas destas células epitelioides gigantes, com grande quantidade de citoplasma e frequentemente multinucleadas. Estas células infiltram a submucosa intestinal e contribuem para o seu espessamento e podem também ser encontradas nos linfonodos mesentéricos. Através da técnica Ziehl-Neelsen, estes agregados de células epitelioides revelam-se cheios de bacilos acido-resistentes, correspondentes a *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* (Jones *et al.*, 1997).

Embora normalmente as lesões se encontrem limitadas a trato intestinal e linfonodos, em situações de infecção generalizada, quer em bovinos quer em pequenos

ruminantes, podem encontrar-se lesões ao nível do fígado, baço, pulmões, rins, útero e placenta (Jones *et al.*, 1997).



**Figura 5:** Linfangiectasia intestinal (Foto de João Marques, 2011).



**Figura 6:** Linfangiectasia intestinal (Foto de João Marques, 2011).

## 2.9. Diagnóstico

Uma vez que os sinais clínicos e sintomas de paratuberculose só são reconhecidos em fases avançadas da doença e não são específicos apenas desta, torna-se difícil estabelecer um diagnóstico preciso. Existe uma grande variedade de testes de diagnóstico complementares para detectar a doença nos animais (Figura 7), os quais são convencionalmente divididos em métodos directos e métodos indirectos.

Os métodos directos pesquisam a presença da bactéria nas amostras biológicas, e os indirectos pesquisam a presença de anticorpos contra a bactéria produzidos durante a resposta imunitária do hospedeiro (Kawaji *et al.*, 2011).

Métodos de diagnóstico, incluindo a cultura, PCR e testes imunológicos, são considerados hoje em dia nas várias partes do mundo. A sua aplicação para a detecção da doença deve depender, em parte, de qual o objectivo de diagnóstico, se a detecção de um animal individual ou de um diagnóstico de rebanho. Como a maioria dos estudos procura conhecer a prevalência de rebanho, os testes serológicos de uma amostra de animais do efectivo têm sido maioritariamente utilizados, quer por simplicidade e rapidez de resposta, quer minimizar custos (Fecteau & Whitlock, 2010).

No entanto, na maioria dos casos os testes de diagnóstico actuais, apenas detectam os animais infectados nos estados mais avançados da doença, após um longo período de incubação e durante o qual estes animais eliminam para o ambiente grandes quantidades de microrganismos (Robbe-Austerman *et al.*, 2006a). Um método diagnóstico ideal seria aquele que detecta o animal infectado logo após a infecção com 100% de sensibilidade e especificidade. Actualmente, todos os métodos de diagnóstico disponíveis tendem a subestimar a verdadeira prevalência da doença, devido à dificuldade de identificação dos animais com infecção subclínica (Begg & Whittington, 2010).

A grande maioria dos testes de diagnóstico é feito com base na detecção de anticorpos no leite ou soro, ou por cultivo de bactérias das fezes, mas isto apenas acontece anos após a infecção e num estado avançado da doença. Por outro lado, sabe-se que inicialmente ocorre uma resposta imunitária mediada por células, e o diagnóstico com base nesta resposta pode ser aplicado na fase inicial da infecção, antes da formação de anticorpos e excreção bacteriana nas fezes, tendo no entanto a limitação de falta de

antígenos específicos, o que resulta numa baixa especificidade da técnica (Mikkelsen *et al.*, 2011).

Pode afirmar-se que todas as técnicas possuem desvantagens associadas em termos de especificidade e/ou sensibilidade. Segundo Nielsen, a comparação da precisão de vários testes de diagnóstico para a paratuberculose geralmente não é possível, mas a estratificação destes por objectivos melhora a sua interpretação (Nielsen & Toft, 2008).

No *post-mortem*, os testes diagnósticos incluem exame histopatológico, cultura e PCR a partir de tecidos (Begg & Whittington, 2010).

### **2.9.1. Métodos directos**

A utilização destes métodos é pertinente quando se visa detectar directamente a presença do agente numa amostra biológica, como fezes, tecido intestinal ou amostra ambiental.

#### **2.9.1.1. Coloração de esfregaços**

Este método baseia-se no uso da técnica de coloração Ziehl-Neelsen em esfregaços obtidos por biopsia ou raspagem da mucosa intestinal e das fezes. Esta técnica permite a identificação de células típicas de bactérias ácido-resistentes permitindo resultados ao fim de uma hora. No caso em que são observados agregados bacterianos de bactérias ácido-resistentes pode fazer-se um diagnóstico presuntivo. No entanto, a presença de bacilos ácido-resistentes não é específica para *M. paratuberculosis*, pois pode ser difícil distinguir o bacilo de paratuberculose de outros bacilos ácido-resistentes, e por isso o teste não é conclusivo (Radostits *et al.*, 2002).

#### **2.9.1.2. Cultura**

Dos testes utilizados na detecção do agente, o isolamento deste a partir de animais eliminadores pela cultura de fezes é considerado como uma prova de referência (*gold standard test*). A alta especificidade é demonstrada pelo crescimento lento, dependente de micobactina e identificação de genes específicos conseguido através de

técnicas moleculares avançadas, sendo mesmo considerada 100% específica por alguns autores (Djonje, 2010, Kawaji *et al.*, 2011). Segundo Radostits, a coprocultura é 100% específica e 100% sensível em rebanhos bovinos de 50 ou mais animais e um grau de infecção dentro do rebanho de 20% ou mais (Radostits *et al.*, 2002). Ainda que *M. paratuberculosis* seja um organismo de crescimento muito lento, atendendo a que a cultura fecal requer um período de tempo significativo para obter resultados, variando geralmente de 8 a 16 semanas, pode ser reduzido até 3 semanas, através da modificação na técnica de isolamento com o uso de factores de crescimento no meio de cultura (Radostits *et al.*, 2002).

No entanto, a sensibilidade dos métodos de cultura pode ser reduzida pela contaminação por parte da flora intestinal e através de outros procedimentos de descontaminação, que reduzem a viabilidade do microrganismo (Kawaji *et al.*, 2011). Também quando perante infecções subclínicas, em que a excreção de bactérias nas fezes pode ser intermitente, assim como em animais que eliminem baixo número de bactérias, a sensibilidade do teste pode ser diminuída (Begg & Whittington, 2010, Kawaji *et al.*, 2011).

A cultura pode também ser feita a partir de amostras de tecidos, sangue, leite ou amostras ambientais. Assim, é prática corrente a utilização da cultura para confirmar o diagnóstico presuntivo de animais individuais. Além disso, a cultura de amostras compostas de mais de um animal, ou do ambiente, é hoje em dia aceite como rastreamento de um rebanho ou herdade. Uma área onde a especificidade da técnica de cultura é amplamente utilizada é na averiguação da ligação entre a doença de Crohn nos humanos e o *M. paratuberculosis*, atendendo a que essa relação ainda não está confirmada (Whittington, 2010).

### **2.9.1.3. PCR**

Com este método, após a extracção de ADN do microrganismo a partir de tecidos ou amostras biológicas, consegue-se um rápido resultado quando comparado com a técnica de isolamento por cultura (Rizaldos, 2010). Graças a avanços na genética molecular, técnicas como o PCR (*Polimerase Chain Reaction*), permitem-nos identificar microrganismos por meio de testes de ADN (Radostits *et al.*, 2002). Esta

técnica produz réplicas de uma sequência específica de ADN, com a geração de milhões de cópias que são depois analisadas (Bolske & Herthnek, 2010).

O elemento genético único e identificador do *M. paratuberculosis* é um elemento de inserção chamado IS900 (Radostits *et al.*, 2002).

Nos últimos anos, as sensibilidades de testes PCR baseados na identificação do elemento de inserção IS900, a partir de amostras de fezes e tecidos, têm melhorado significativamente. Isto deve-se ao melhoramento nas técnicas de extracção de ADN e ao recurso ao PCR em tempo real que pode também ser quantitativo (qPCR) (*ou real-time PCR*) (Begg & Whittington, 2010).

As principais desvantagens desta técnica são o elevado custo monetário e, dada a natureza das amostras (fecais), à presença de inibidores da PCR, o que diminui a sensibilidade do teste (Radostits *et al.*, 2002, Rizaldos, 2010).

A técnica PCR para extracção de ADN de *M. paratuberculosis* encontra-se descrita para amostras de fezes (Kawaji *et al.*, 2007, Kawaji *et al.*, 2011), leite (Bosshard *et al.*, 2006, Slana *et al.*, 2008), tecidos (Bosshard *et al.*, 2006, Nelli *et al.*, 2008) e sémen (Ayele *et al.*, 2004). No sangue, foi realizado um estudo com base na teoria da possível existência de bacteriémia durante a infecção, onde os resultados sugerem que os testes de PCR de sangue podem ser potencialmente úteis numa nova abordagem ao diagnóstico de paratuberculose, especialmente em animais jovens. No entanto, estes resultados baseiam-se apenas num trabalho, onde os níveis de concordância entre o teste PCR no sangue e ELISA foram substancialmente baixos (Juste *et al.*, 2005).

Em relação à aplicação da técnica nas fezes, existem estudos que descrevem uma sensibilidade igual ou superior às técnicas de cultura, e confirmam o teste qPCR, como um teste sensível e específico de diagnóstico *ante-mortem* para a paratuberculose. A quantificação de ADN de *M. paratuberculosis* nas fezes, por qPCR, pode ainda fornecer informações imediatas que permitem estimar o estado da infecção, bem como o risco de transmissão a partir dos animais infectados (Kawaji *et al.*, 2007, Kawaji *et al.*, 2011).

## 2.9.2. Métodos indirectos

A utilização de métodos indirectos, para diagnóstico de paratuberculose, tem por base a resposta imunitária do hospedeiro frente à infecção pelo agente. Hoje em dia, essa resposta imunitária ainda carece de informações relevantes, as quais podem influenciar negativamente a utilização e interpretação destes testes (Nielsen, 2010).

### 2.9.2.1. *Fixação do Complemento*

No caso dos bovinos, o teste de fixação de complemento (FC), foi utilizado como teste padrão para identificação de paratuberculose durante muitos anos. O teste apresenta bons resultados em animais clinicamente suspeitos, mas para fins de controlo não tem especificidade suficiente para permitir a sua utilização na população em geral (World Organisation for Animal Health, 2008). As principais limitações deste teste são as baixas precisões dos resultados em casos de doença subclínica, apresentando resultados falsos negativos e resultados falsos positivos derivados de reacções cruzadas.

São descritas, em animais com doença clínica sensibilidades e especificidades próximas de 90 e 70% respectivamente, e sensibilidades na ordem dos 54% para animais subclínicos que eliminam baixa quantidade de microrganismos (Radostits, *et al.*, 2002).

Muitos países requerem resultados negativos de FC aquando realizam importações, no entanto, devido às limitações do teste, muitas vezes requerem também a complementação dos resultados com o teste intradérmico de paratuberculina ou coprocultura (Radostits *et al.*, 2002, World Organisation for Animal Health, 2008).

### 2.9.2.2. *Prova alérgica cutânea*

A prova alérgica cutânea baseia-se numa reacção de hipersensibilidade retardada *in vivo* (Robbe-Austerman *et al.*, 2006a).

Este teste de hipersensibilidade mede a imunidade mediada por células que se produz após a inoculação intradérmica de um antigénio, através da posterior medição do aumento e endurecimento do local de inoculação ao fim de 72 horas.



O teste é realizado através da inoculação intradérmica de 0,1 ml do antigénio no terço médio do pescoço. A interpretação deste teste apresenta dificuldades por falta de padronização em termos de leitura de prova.

Inicialmente, os antigénios utilizados foram extractos proteicos purificados obtidos a partir de *M. paratuberculosis*, que são conhecidos como Johnina ou Paratuberculina, ou de *M. avium*. No passado, acreditava-se que a PPD (derivado proteico purificado) aviária e a Johnina apresentavam sensibilidade e especificidade comparáveis (World Organisation for Animal Health, 2008). Segundo Kalis, a especificidade do teste em bovinos com antigénio Johnina, foi de 88,8% quando o aumento cutâneo foi igual ou superior a 2 mm, 91,3% quando igual ou superior 3 mm e 93,5% quando igual ou superior a 4 mm (Kalis *et al.*, 2003).

### **2.9.2.3. ELISA**

Um dos testes imunológicos mais utilizados hoje em dia é o teste ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), que tem por base detecção de anticorpos contra *M. paratuberculosis* nas amostras de soro sanguíneo e leite (Nielsen, 2010). Actualmente existem vários testes de ELISA disponíveis (Radostits *et al.*, 2002), sendo que esta técnica é caracterizada por uma maior sensibilidade, quando em comparação com as técnicas de FC e AGID (*Agar Gel Immunodiffusion*), na detecção de animais infectados subclínicamente, por ser capaz de detectar reduzidas quantidades de anticorpos (Mikkelsen *et al.*, 2011, World Organisation for Animal Health, 2008).

O teste ELISA é descrito como um teste de fácil execução e relativamente rápido, permitindo o processamento de grande número de amostras por dia e com um baixo custo monetário por unidade. A especificidade e sensibilidade do teste ao nível de amostras de leite ou soro parecem ser as mesmas (Whitlock, 2009). Contudo, existem diferenças entre os dois tipos de amostras na probabilidade do teste ser positivo durante a lactação. Um ELISA de soro é mais susceptível de produzir uma reacção positiva no final da lactação, enquanto um ELISA de leite é mais provável que seja positivo no início da lactação (Nielsen *et al.*, 2002).

Segundo Gumber (Gumber *et al.*, 2006), a sensibilidade do teste ELISA em ovinos e caprinos foi de 34,9 e 56,4%, com especificidades de 98,8 e 100,0%, respectivamente. Nos bovinos, a sensibilidade média do teste foi de 45% +/- 4,8, e a



especificidade foi de 99% +/- 0,9. Os resultados foram também correlacionados com o número de colónias de *M. paratuberculosis* detectados por cultura fecal, onde a sensibilidade para os casos clínicos de paratuberculose foi mais alta (87% +/- 8,4) do que para os casos subclínicos (15% +/- 6,6) (Sweeney *et al.*, 1995).

A especificidade dos testes ELISA tem sido melhorada através da remoção de reacções cruzadas pela adsorção de soros com *Mycobacterium phlei*. No entanto, esta etapa de adsorção compromete a sensibilidade do teste. A principal limitação deste teste é a dificuldade de utilização deste para diagnóstico de animais em fase inicial da infecção devido à baixa sensibilidade (Mikkelsen *et al.*, 2011).

#### **2.9.2.4. Teste de imunodifusão em gel (AGID)**

O teste de AGID (*Agar Gel Immunodiffusion*) é principalmente indicado para confirmação da doença clínica em bovinos, ovinos e caprinos. Foi descrito que, em pequenos ruminantes na Nova Zelândia e Austrália, o teste consegue sensibilidades e especificidades superiores ao teste ELISA (Hope *et al.*, 2000, World Organisation for Animal Health, 2008). As especificidades e sensibilidades relatados foram de 99 a 100% e 38 a 56% respectivamente (Hope *et al.*, 2000). Como vantagens o teste apresenta-se como um teste económico e rápido, conseguindo resultados em 48 horas. Contudo, segundo Radostits, tem como limitação a utilização em rebanhos com tuberculose, devido às possibilidades de reacção cruzada, que resultam falsos positivos (Radostits *et al.*, 2002).

A aplicação deste teste diagnóstico em animais subclínicamente infectados é reduzida, apesar de conseguir melhores resultados que o teste FC, revelando também falhas na detecção dos casos de infecção inicial (Radostits *et al.*, 2002, Rizaldos, 2010).

#### **2.9.2.5. Teste Gama-Interferão ( $\gamma$ -IFN)**

O teste do  $\gamma$ -IFN tem como base a identificação da imunidade mediada por células, a qual precede a produção de anticorpos detectáveis por a maioria dos testes serológicos (Rizaldos, 2010). Este teste surge da necessidade de conseguir testes de diagnósticos alternativos que detectem animais nas fases iniciais da doença, quando a resposta imunitária celular predomina, pois esta tende a diminuir com o avançar do

estado mórbido. Através duma identificação precoce dos animais infectados subclínicamente, pode evitar-se grande eliminação de microrganismos nas fezes e diminuir a excreção destes no ambiente (Robbe-Austerman *et al.*, 2006a, Robbe-Austerman *et al.*, 2007).

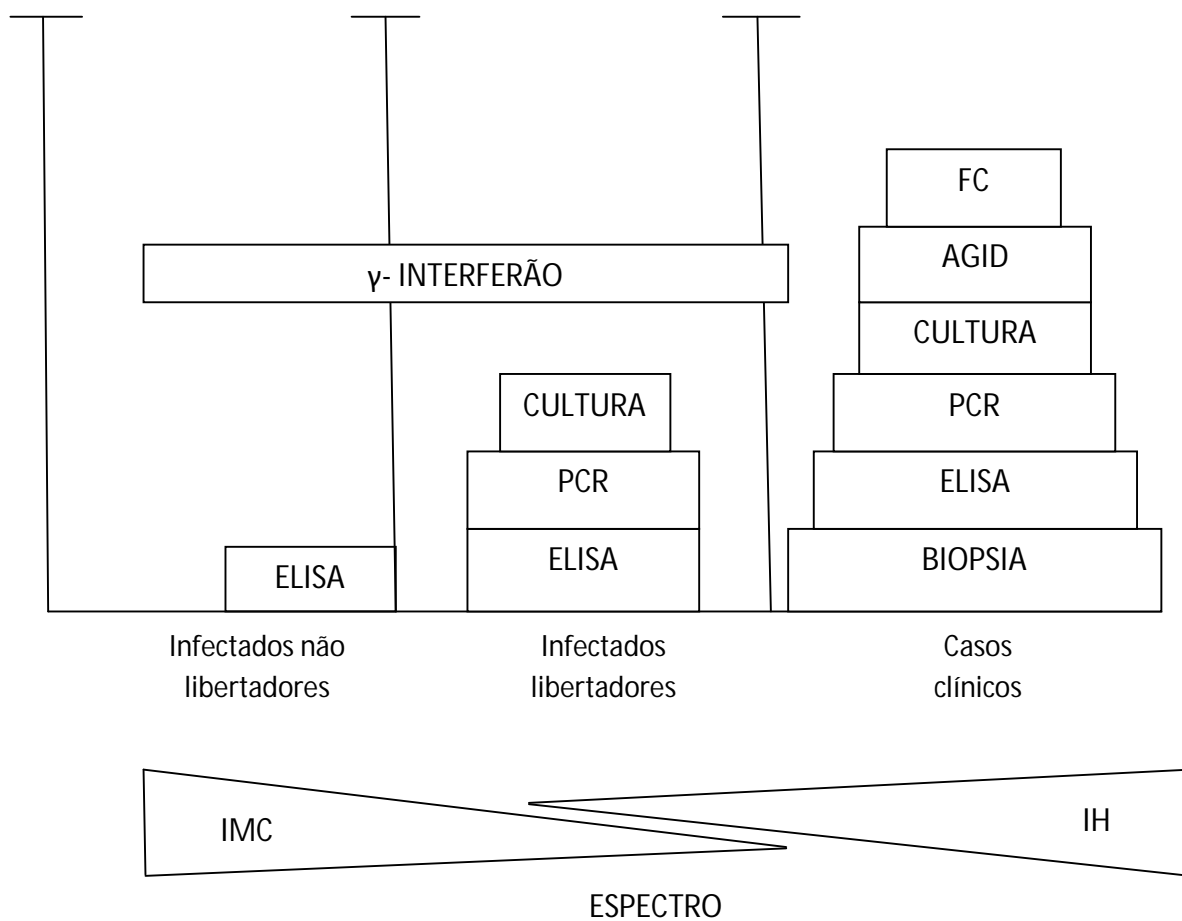
Existem dois testes propostos para determinação da imunidade celular contra a paratuberculose. Uma prova alérgica cutânea e a medição da produção de  $\gamma$ -IFN (Robbe-Austerman *et al.*, 2006a).

O método tradicional do teste  $\gamma$ -IFN em ruminantes, consiste na apresentação *in vitro* de antígenos de *M. paratuberculosis* ao sangue do animal testado, o que estimula uma resposta linfocitária na produção de  $\gamma$ -IFN, que é removido posteriormente no plasma, e aplicado no teste ELISA (Begg *et al.*, 2009, Robbe-Austerman *et al.*, 2006a). Uma das vantagens do teste  $\gamma$ -IFN sobre o teste cutâneo é a possibilidade de obter uma medição objectiva da magnitude da resposta de  $\gamma$ -IFN (Robbe-Austerman *et al.*, 2006a).

Nos últimos anos, o diagnóstico de tuberculose humana tem conduzido ao aperfeiçoamento no teste  $\gamma$ -IFN pela utilização da técnica ELISPOT (immunospot enzyme-linked), em vez das tradicionais abordagens como o teste intradérmico (Begg *et al.*, 2009, Lalvani *et al.*, 2001). O teste ELISPOT determina o número de células produtoras de  $\gamma$ -IFN, e não a quantidade total deste que é produzida, como o avaliado no teste ELISA tradicional. O ELISPOT é descrito ser 10 a 200 vezes mais sensível na detecção de citocinas que o teste ELISA (Begg *et al.*, 2009, Tanguay & Killion, 1994). Nos bovinos, a especificidade varia entre 94 e 67% dependendo dos critérios de interpretação (World Organisation for Animal Health, 2008).

#### **2.9.2.6. Bioquímica do soro e hematologia**

Pelo perfil bioquímico e análise hematológica também se consegue um diagnóstico preliminar de paratuberculose em animais com sintomatologia clínica. Estes animais apresentam normalmente hipoproteinémia, com reduções evidentes de albumina e de quase todas as imunoglobulinas. Achados como anemia, hipocalcémia, hipocalémia, hiponatremia, e hiperfosfatémia também são frequentes (Whitlock, 2009), ainda que só por si não estabeleçam o diagnóstico de paratuberculose.



IMC – Imunidade mediada por células  
 IH – Imunidade humoral

**Figura 7:** Diferentes testes que podem ser utilizados no diagnóstico da paratuberculose (Adaptado de Buergelt *et al.*, 2004).

## 2.10. Diagnósticos diferenciais

Como diagnósticos diferenciais devem ser ponderadas todas as possíveis causas de progressiva perda de peso, emaciação e alterações na consistência das fezes. O carácter crónico da paratuberculose e a não resposta aos tratamentos podem ser factores determinantes que conduzirão à definição do diagnóstico definitivo (Burgelt *et al.*, 2004, Radostits *et al.*, 2002, Scott, 2007).

Outras morbilidades a considerar no diagnóstico, comuns a grandes e pequenos ruminantes:

- Mau maneio/Mal nutrição
- Parasitismo gastrointestinal crónico
- Fasciolose
- Coccidiose
- Outras diarreias bacterianas
- Abscessos hepáticos
- Linfossarcoma

Em bovinos:

- BVD/Doença das mucosas
- Retículo-peritonite ou Retículo-pericardite crónica
- Amiloidose
- Pielonefrite

Em pequenos ruminantes:

- Linfadenite caseosa
- Encefaloartrite caprina
- Pneumonia progressiva ovina
- Ruminite
- Scrapie
- Maedi-visna
- Ausência de dentição

## 2.11. Tratamento

Actualmente, a paratuberculose é uma doença de notificação obrigatória em Portugal (World Organisation for Animal Health, 2011), sendo que, a sua terapia antimicrobiana encontra-se contra-indicada. As perspectivas de tratamento adequado são muito reduzidas e a baixa eficácia dos agentes anti-microbianos em promover a cura levam a que o tratamento desta doença seja desaconselhado. Antibioterapia prolongada apenas consegue um atenuar dos sinais clínicos e prolongar a vida do animal infectado (Collins, 2009, Radostits *et al.*, 2002).

Nos casos em que se arrisca o tratamento de animais suspeitos infectados deve haver um compromisso entre o veterinário e o proprietário, de modo a assegurar que o leite ou carne desse animal nunca seja utilizado para consumo humano. Nestes casos normalmente o tratamento prescrito segue na tentativa de tratar os sinais clínicos do animal, tentando eliminar possíveis diagnósticos diferenciais.

Drogas como a clofazimina, isoniazida, rifanpicina e estreptomicina foram descritas como tendo algum efeito contra o *M. paratuberculosis in vivo* (Chiodini, 1991, Radostits *et al.*, 2002, Whitlock, 2009).

A clofazimina está descrita como uma das drogas mais utilizadas no tratamento de bovinos. Em alguns casos o tratamento é também acompanhado pela adição de um anti-inflamatório que parece melhorar a sintomatologia clínica (Cocito *et al.*, 1994).

Segundo Cocito, a maioria dos agentes antimicrobianos inibem o crescimento de *M. paratuberculosis* quando em condições *in vitro*, sendo que a discrepância entre os resultados *in-vitro* para *in vivo* devem-se principalmente à dificuldade dos fármacos em aceder à micobactéria no interior dos macrófagos e células intestinais (Cocito *et al.*, 1994). Sabe-se também que, *in-vitro* o *M. paratuberculosis* apresenta maior resistência a quimioterápicos que o *M. tuberculosis* (Radostits *et al.*, 2002).

## 2.12. Prevenção e controlo

A paratuberculose, nos rebanhos bovinos, ovinos e caprinos onde existam casos de doença clínica e subclínica, é uma doença difícil de controlar. Devido à imprecisão dos testes de diagnóstico disponíveis no presente, é praticamente impossível a erradicação da doença a não ser que se faça um completo despovoamento do rebanho e a substituição deste por animais não infectados, o que por razões económicas e devido à difícil certificação de um novo rebanho não infectado se torna pouco prático (Radostits *et al.*, 2002). Segundo Ferreira, nestes casos é aconselhado um vazio sanitário de 12 meses até novo repovoamento (Ferreira & Ferreira, 1990). Assim sendo, a melhor opção a seguir parece ser o controlo da doença em níveis de prevalência muito baixos.

Diferenças na incidência da doença entre rebanhos e regiões estão provavelmente associadas a diferentes susceptibilidades de raças, presença de diferentes estirpes de *M. paratuberculosis*, condições climáticas regionais e maneios alimentares e de estabulação, que influenciam a contaminação ambiental e a capacidade de disseminação da doença. Factores de stress e sanidade dos rebanhos também devem ser tidos em conta (Sargison, 2008).

A técnica chave para a prevenção, controlo e eliminação da doença nas explorações, deve seguir a implementação de um rigoroso plano, que evidencia dois princípios fundamentais de controlo: (1) rastrear e identificar no rebanho animais libertadores de grande quantidade de microrganismos, eliminando-os ou isolando-os, diminuindo acentuadamente a contaminação ambiental e (2) instituir medidas de prevenção que limitem o quanto possível as oportunidades de ingestão e infecção do microrganismo, principalmente nos animais mais susceptíveis como os recém nascidos e restantes animais jovens. Estes dois princípios devem ser aplicados e acompanhados por um controlo activo na exploração e por um período de tempo razoável, sendo referidos 5 anos ou até que os níveis de prevalência se encontrem em valores baixos (Collins, 2009, Whitlock, 2009).

Para implementação destes princípios e consecução dos objectivos é necessário ter em consideração vários factores e ter um geral conhecimento da exploração e da sua capacidade de resposta, que por vezes leva a várias limitações. Factores como a natureza subclínica da doença com longo período de incubação, aliado ao baixo nível de casos clínicos e mortalidade, muitas vezes também são uma barreira na consolidação de

programas de controlo como este. Perante estes números, os produtores muitas vezes não estão conscientes de que o grau de infecção pode subir exponencialmente a qualquer momento.

Factores individuais do rebanho como o tamanho, prevalência e taxas anuais de nascimentos e reposições, são importantes elementos a avaliar. Por outro lado, factores ambientais e de higiene também devem ser acompanhados e controlados dentro do possível (Radostits *et al.*, 2002).

No rastreio dos animais o teste de ELISA e a cultura de fezes são os mais comumente utilizados (Radostits *et al.*, 2002) e, quando aplicados em conjunto, aumentam o número de animais identificados no rebanho levando a resultados mais rápidos. O custo económico dos testes é uma importante realidade, a qual se pode tentar atenuar através do rastreio alternado de 6 em 6 ou 12 em 12 meses (Whitlock, 2009).

As medidas de maneio referidas para controlo da doença são maioritariamente aplicáveis em explorações de bovinos leiteiros, como a remoção dos recém nascidos das mães e isolamento destes dos animais adultos, sendo alimentados com colostro ou leite artificial, ou pasteurizados. Os animais de substituição devem ser mantidos isolados dos adultos o máximo de tempo possível, não contactando com estes pelo menos 6 meses e preferencialmente 12 meses. Isto inclui a não partilha de água, comedouros e pastagens. Nos animais de carne em extensivo, estas medidas tornam-se impraticáveis, podendo-se apenas tentar diminuir a densidade populacional nos parques durante a época principal de partos e fazer a remoção das placentas da área de partos o mais precocemente possível. A limpeza de fezes nas áreas de estábulos deve ser frequente e restrito o acesso a águas estagnadas possivelmente contaminadas. Nestes casos e devido às referidas limitações, o recurso a testes de rastreio pode ser necessário com mais frequência (Collins, 2009).

No entanto, a falta de um programa de controlo integrado na maioria dos países e a falta de compreensão de alguns factores de risco pode colocar em causa todo o processo. Na Austrália existe actualmente um programa nacional de controlo da paratuberculose ovina, o qual teve início em 1998 (Allworth & Kennedy, 2000). Este programa surgiu na sequência da criação de um programa de controlo nacional para a paratuberculose, que apresenta um plano estratégico de controlo para bovinos e ovinos separadamente (Kennedy & Citer, 2010). O programa foi criado e co-financiado em parceria do estado com empresas privadas, tendo como objectivo oferecer através de

pesquisa e vigilância uma base sólida para uma futura decisão sobre o manejo da doença e o seu controlo a nível nacional. Ao fim de quatro anos foram observados significativos progressos, incluindo extensa vigilância do país que permitiu definir uma distribuição da doença, implementar projectos e criar um programa de comunicação que promoveu o conhecimento do programa e formação actual sobre a doença e seu controlo. Em 2001, o programa já apresentava seis subprogramas com diferentes áreas de responsabilidade: Pesquisa e Desenvolvimento, Vigilância, Controle, Comunicações, Gestão e Assistência Financeira (Allworth *et al.*, 2002).

Uma limitação aos programas de controlo é a capacidade que o *M. paratuberculosis* apresenta em infectar grande variedade de animais silvestres (Boadella *et al.*, 2010, Florou *et al.*, 2008, Harris & Barletta, 2001, Maio *et al.*, 2011, Pribylova *et al.*, 2011, Uzoigwe *et al.*, 2007) e o desconhecimento das prevalências da doença entre estes, estando no entanto comprovada a transmissão entre as espécies silvestres e os ruminantes domésticos (Stevenson *et al.*, 2009). O controlo destas fontes de infecção em determinadas regiões pode tornar-se muito complicado ou mesmo impossível.

Em explorações com elevada prevalência e severa disseminação da doença podem ser necessários programas de controlo muito agressivos e de longa duração. Nestas explorações, caso seja possível, deve-se considerar a vacinação contra a doença como uma séria alternativa de controlo (Whitlock, 2009). O controlo da paratuberculose tem sido tema de debate e investigação experimental, bem como de uma grande variedade de programas de manejo e controlo de qualidade de efectivos. Surpreendentemente, a estratégia que tem sido bem sucedida no campo desde há mais de 80 anos tende a ser sistematicamente ignorada pelos mais conceituados investigadores microbiológicos e epidemiológicos, que estão mais focados na erradicação da doença e conceitos de biossegurança do que em resultados práticos a curto prazo (Juste & Perez, 2011).

Vários trabalhos sobre o controlo da doença e efeitos da vacinação tem sido relatados, onde estes maioritariamente concordam e descrevem grandes benefícios na aplicação desta medida (Eppleston *et al.*, 2011, Juste & Perez, 2011, Reddacliff *et al.*, 2006). Segundo Ramon Juste (Juste & Perez, 2011), em 94% dos estudos efectuados em ovinos foram relatados efeitos positivos de vacinação, assim como em 92% dos efectuados em caprinos.



Tem sido testadas vacinas mortas ou atenuadas, sendo que todas parecem conseguir retardar o aparecimento dos sinais clínicos da doença, mas não protegem efectivamente contra a infecção dos animais (Rosseels & Huygen, 2008). Recentemente foram desenvolvidos trabalhos de pesquisa relativamente ao desenvolvimento de uma nova vacina oral contra o *M. paratuberculosis*, no entanto, não temos ainda resultados deste trabalho, mas acredita-se que pode ser um importante avanço no controlo da doença (Johnston *et al.*, 2010).

A recomendação geral de vacinação contra a paratuberculose é que esta seja aplicada nos primeiros dias de vida, para imunizar os animais antes da infecção. No entanto, são referidos casos de ovinos e caprinos que sugerem que a vacinação mais tarde, aquando da selecção dos jovens para reposição do efectivo pode ser mais oportuna, atendendo às medidas de selecção e ao sistema imunitário se encontrar mais desenvolvido e assim se obter uma melhor resposta (Juste & Perez, 2011).

Encontra-se também descrita a vacinação de rebanhos de ovinos adultos com paratuberculose, presumivelmente já infectados, com resultados satisfatórios em termos de regressão das lesões e redução dos casos clínicos e mortes, o que sugere também um efeito terapêutico da vacina nestes casos (Juste & Perez, 2011).

Na Austrália, a vacinação de rebanhos de ovinos com elevadas prevalências de paratuberculose, resultou numa eficiente estimulação da resposta imunitária específica, que levou a uma diminuição na excreção de *M. paratuberculosis* e reduziu significativamente a mortalidade dos animais. Nestes, a protecção manteve-se durante a vida económica das ovelhas, permitindo assim concluir que a vacinação proporcionou benefícios imediatos para os produtores, beneficiando-os também nas seguintes gerações do rebanho (Reddacliff *et al.*, 2006).

Na Noruega, durante um período de 16 anos, a vacinação contra a paratuberculose caprina foi obrigatória, o que resultou numa redução da incidência da doença de 53% para 1% e de 98% nas lesões na pós-morte. Nos Estados Unidos, existe também uma vacina registada para uso em bovinos, a qual pode ser utilizada em pequenos ruminantes como um acto clínico individual, variando de acordo com a legislação específica de cada estado (Juste & Perez, 2011).

Contudo, nos bovinos e caprinos, os quais são altamente susceptíveis à tuberculose e paratuberculose, a utilização da vacina é questionável por interferir nos resultados dos rastreios da tuberculose, não sendo posteriormente possível avaliar a

adequada eficácia da vacina nem um eficaz controlo da tuberculose (Johnston *et al.*, 2010, Juste & Perez, 2011, Rosseels & Huygen, 2008).

Nalguns países, ou regiões destes, não é permitido qualquer uso de vacinas contra a paratuberculose em qualquer espécie, principalmente para impedir a utilização de vacinas nas espécies submetidas a programas de controlo da tuberculose (Juste & Perez, 2011).

Em Portugal, não existe qualquer programa de controlo para a paratuberculose, nem a vacina se encontra disponível no mercado. No entanto, em casos excepcionais com confirmação do diagnóstico e em que os prejuízos pela doença se tornam evidentes, existe um formulário para se requer um pedido de autorização especial dirigido à DGV, com o qual é possível proceder-se à aquisição da vacina para pequenos ruminantes comercializada em Espanha (Juste & Perez, 2011), e utilização desta nos efectivos de pequenos ruminantes de Portugal (Direcção Geral de Veterinária [DGV], 2011).

Hoje em dia, pode afirmar-se que em qualquer estratégia de manejo da paratuberculose é economicamente rentável incluir o programa de vacinação (Juste & Perez, 2011).

Por outro lado, deve considerar-se que as vacinas actualmente existentes são insuficientes, pois além da limitação que apresentam no controlo da infecção, estas associam inconvenientes como a presença de lesões granulomatosas no local da injeção, interferência com os actuais testes de diagnóstico serológicos para o *M. paratuberculosis*, a não total protecção dos animais contra posterior exposição ao agente e também a interferência com os testes da tuberculose bovina (Johnston *et al.*, 2010).

### **2.13. Impacto económico**

O impacto económico da doença e avaliações precisas das perdas de produtividades e lucros num rebanho ou país são difíceis de calcular, o que pode dar origem a que a doença esteja subestimada (Harris & Barletta, 2001). Poucas informações e estudos existem ainda em relação a este tema.

Os prejuízos económicos associados à paratuberculose têm sido atribuídos a vários factores. Entre eles, diminuições nas produções leiteiras dos rebanhos,

diminuições das capacidades de conversão e aproveitamento dos alimentos, do crescimento e ganho médio diário dos animais, aumento da susceptibilidade a outras doenças, diminuição do potencial genético dos rebanhos, perda de mercados de exportação e internos, diminuições dos pesos dos animais ao abate, aumento de custos de manejo, veterinários e em medicamentos, aumento dos intervalos entre partos, aumento das taxas de refugo e reposição são algumas das consequências que podem ser associadas à doença (Hines *et al.*, 2007, Whitlock, 2009).

Estimativas de impacto no sector leiteiro, provenientes do sistema nacional de saúde e monitorização dos animais dos Estados Unidos, relatam perdas económicas de quase 100 dólares por vaca em rebanhos positivos quando comparados com rebanhos negativos. Tal facto deve-se à diminuição da produção de leite e aumento das taxas de reposição. Nos rebanhos positivos que descrevem pelo menos 10% dos seus animais de refugo como tendo sinais clínicos compatíveis com a doença, as perdas foram de mais de 200 dólares por animal. Nestes rebanhos de elevada prevalência, a produção de leite desceu aproximadamente 700 kg por vaca, associada a uma maior taxa de mortalidade e refugo. Na média de todos os rebanhos, os custos na indústria leiteira dos Estados Unidos revelaram uma redução de produtividade de 22 a 27 dólares por animal ou 200 a 250 milhões de dólares anualmente (Ott *et al.*, 1999).

Perdas ao nível de toda a indústria bovina dos Estados Unidos apontam para 1,5 biliões de dólares ao ano, onde um modelo de regressão estima que as perdas sejam 40 a 227 dólares por vaca ano (Chacon *et al.*, 2004).

Na Austrália, nos anos 90, a perda anual estimada era 92 milhões e 7,5 milhões de dólares Australianos no sector dos ovinos e bovinos respectivamente (Allworth & Kennedy, 2000, Buergelt *et al.*, 2004). Segundo um estudo de 2006, a redução média de rendimento por ano em 12 rebanhos de ovinos infectados foi de 13.715 dólares por exploração (Bush *et al.*, 2006).

A paratuberculose é uma das doenças bacterianas de animais domésticos mais difundidas, o que leva a crer que o seu impacto sobre a economia mundial é enorme e deve ser avaliado.

## 2.14. Implicações zoonóticas

Nos últimos tempos, o *M. paratuberculosis* tem recebido maior interesse devido a recentes trabalhos com evidências científicas cada vez mais significativas, que sugerem que a infecção humana com este microrganismo pode estar associada a alguns, ou possivelmente todos os casos de doença de Crohn.

Doença de Crohn é uma doença gastrointestinal de humanos, de carácter inflamatório crónico, com resultados histopatológicos muito semelhantes aos observados na forma paucibacilar de paratuberculose em bovinos (Figura 9) (Uzoigwe *et al.*, 2007). Primariamente, a doença causa ulcerações ao nível do intestino delgado e grosso, embora possa afectar todo o sistema digestivo desde a boca ao ânus. Os sintomas mais comuns da doença de Crohn são severos ataques de diarreia aquosa ou sanguinolenta, dor abdominal, febre, perda de peso e distensão abdominal (Uzoigwe *et al.*, 2007).

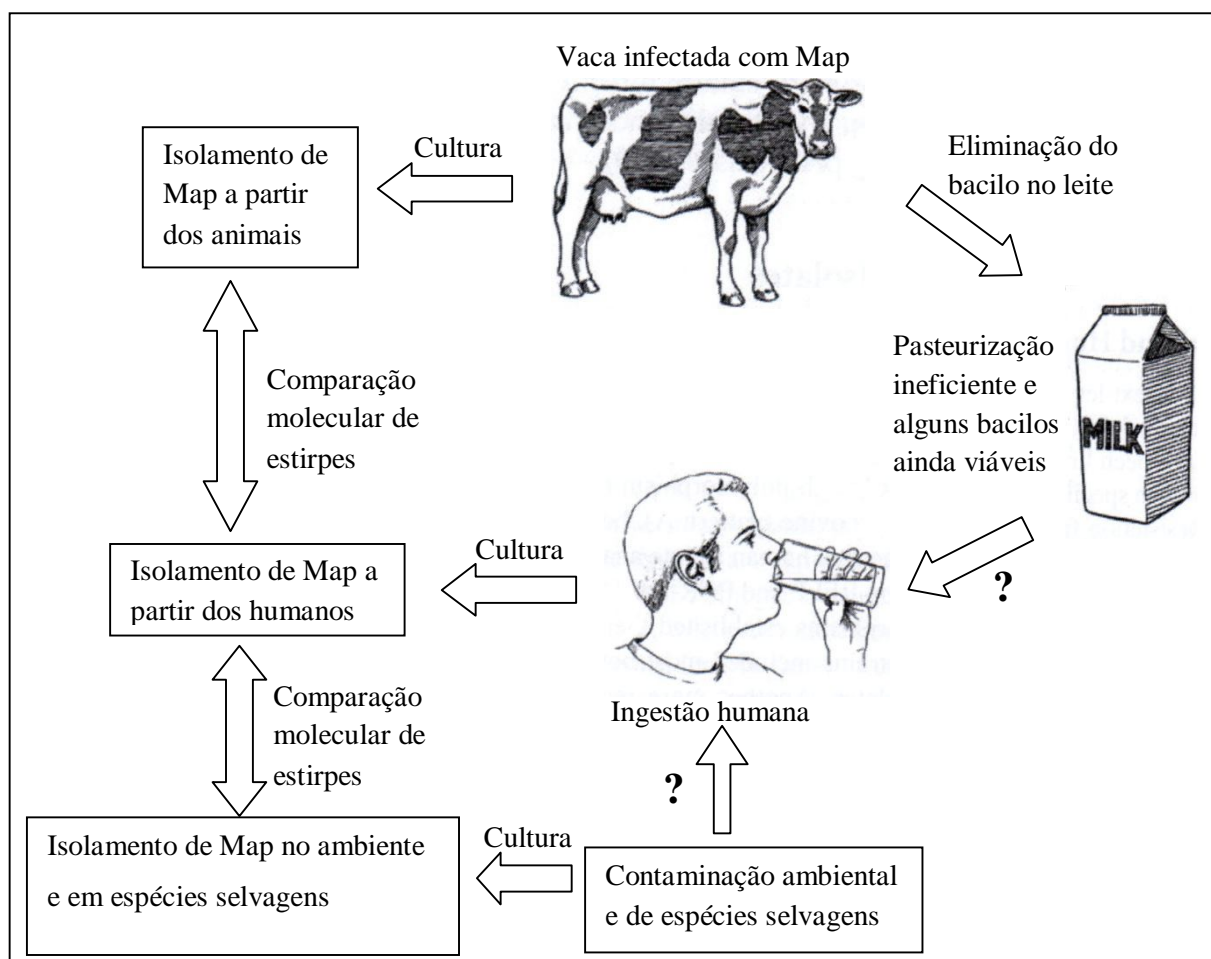
Várias teorias têm sido propostas sobre a etiologia da doença de Crohn. Factores como a dieta, infecções, predisposição genética, alterações imunitárias e factores ambientais desconhecidos têm sido vistos como suspeitos. A maioria dos investigadores acredita que a doença é uma síndrome causada por várias etiologias. Existem principalmente duas teorias, uma infecciosa e outra auto-imune, sendo que na teoria infecciosa o *M. paratuberculosis* aparece como o principal candidato (Figura 8) (Chamberlin *et al.*, 2001).

Estudos recentes têm demonstrado que uma elevada percentagem de pessoas com doença de Crohn apresentam infecção com *M. paratuberculosis* (Uzoigwe *et al.*, 2007). No entanto, esta associação ainda não está comprovada para a existência da doença em humanos (Eltholth *et al.*, 2009). Uma recente análise sobre o relacionamento entre o agente microbiano e a doença indicou que existe uma relação entre eles; contudo, o papel do *M. paratuberculosis* na etiologia da doença ainda não está claro, não devendo por isso ser ignorado. Recomenda-se assim, a investigação das possíveis fontes de exposição e infecção para os humanos (Eltholth *et al.*, 2009).

A presença de *M. paratuberculosis* no leite cru e pasteurizado tem sido objecto de vários estudos, que mostram que o leite pasteurizado nem sempre fica descontaminado e que a eficácia da pasteurização na inactivação do agente depende muito da concentração inicial deste no leite (Eltholth *et al.*, 2009). Trabalhos mais

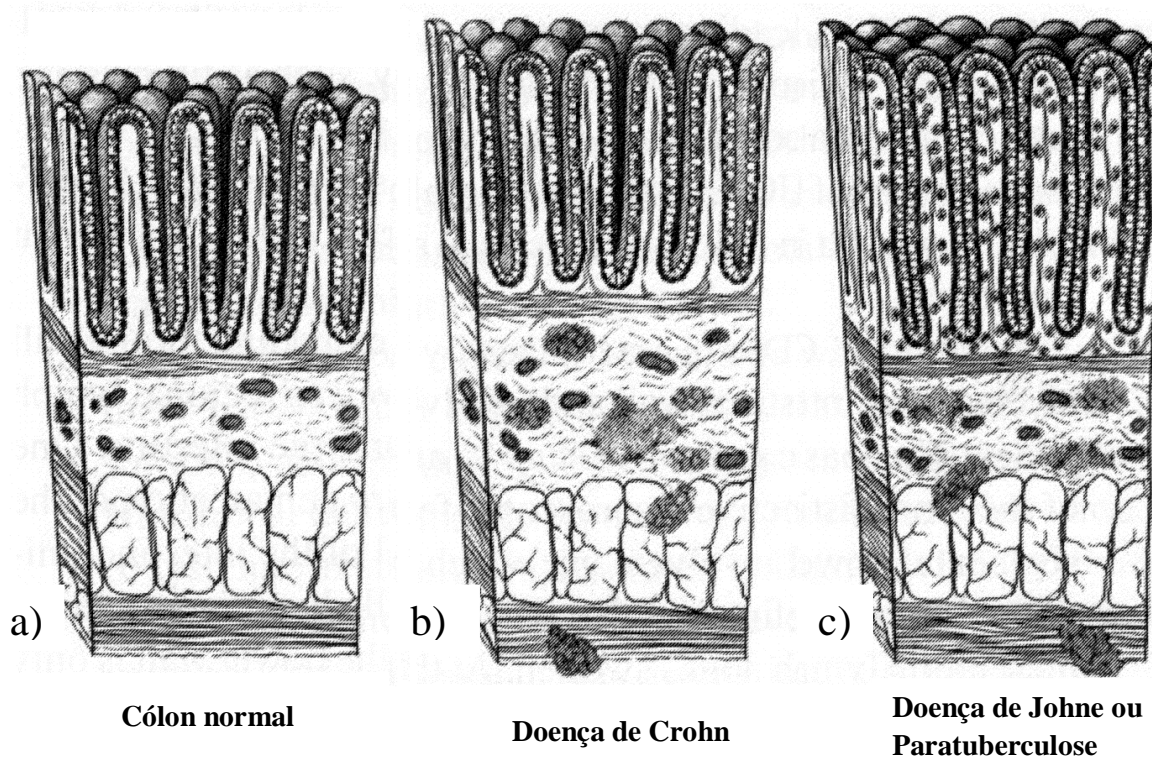
recentes indicam que a carne de animais infectados também pode estar contaminada com *M. paratuberculosis*, através da sua disseminação nos tecidos. Em animais com doença clínica, 59% apresentou a bactéria nos músculos e 85% nos linfonodos periféricos. Nos animais que se revelavam subclínicamente infectados a presença da bactéria foi identificada nos músculos em 4,5% e nos linfonodos periféricos em 32% (Reddacliff *et al.*, 2010).

Dados actualmente disponíveis sugerem ainda que a probabilidade dos produtos lácteos ou carne serem contaminados durante o processamento e revenda não deve também ser ignorada (Eltholth *et al.*, 2009).



**Figura 8:** Potenciais fontes de infecção humana (Adaptado de Chacon *et al.*, 2004).





**Figura 9:** Histologia do cólon humano e de animais em condições normais e de doença. a) Apresentação histológica normal de cólon humano. b) Cólon humano com doença de Crohn. Apresenta granulomas e processo transmural. c) Colon de bovino em estado avançado de paratuberculose, com inflamação da lâmina própria, granulomas e infiltração de macorfagos (Adaptado de Chacon *et al.*, 2004).

### **3. Rastreio serológico**

A paratuberculose é uma doença mundialmente reconhecida como responsável por diminuições nas produções nas explorações de carne ou leite e significativas perdas económicas na produção animal e nas suas indústrias associadas. Embora esteja descrita há sensivelmente um século, a quase ausência de estudos efectuados em pequenos ruminantes em Portugal, principalmente na região do Baixo Alentejo, resulta no desconhecimento do verdadeiro impacto desta doença nos efectivos e nas populações desta região.

Neste trabalho foi realizado um estudo epidemiológico através da determinação da seroprevalência de paratuberculose, por pesquisa de anticorpos séricos em amostras recolhidas nas explorações de pequenos ruminantes, com um sistema de pastoreio semi-extensivo, distribuídas pela região do Baixo Alentejo.

#### **3.1.Objectivos**

O presente trabalho teve como objectivo principal, verificar se há circulação do agente da paratuberculose nas explorações de pequenos ruminantes, com localização no Baixo Alentejo. Como objectivo secundário, pretendeu-se verificar se existe alguma variação da circulação do agente dependente da raça, a sua localização geográfica, a coabitação com outras espécies e a dimensão das explorações.

### 3.2. Material e métodos

#### 3.2.1. Caracterização da área de incidência do estudo

O estudo incidiu em 27 explorações de regime semi-extensivo, das quais 25 explorações de ovinos de aptidão de carne e duas explorações de caprinos, distribuídas por diversas localidades do distrito de Beja (Gráfico 1). Foram rastreados um total de 187 animais, sendo 172 ovinos e 15 caprinos, inseridos nas diversas explorações (Tabelas 4 e 5) em que o estudo incidiu. Os efectivos variaram de 16 a 650 animais.

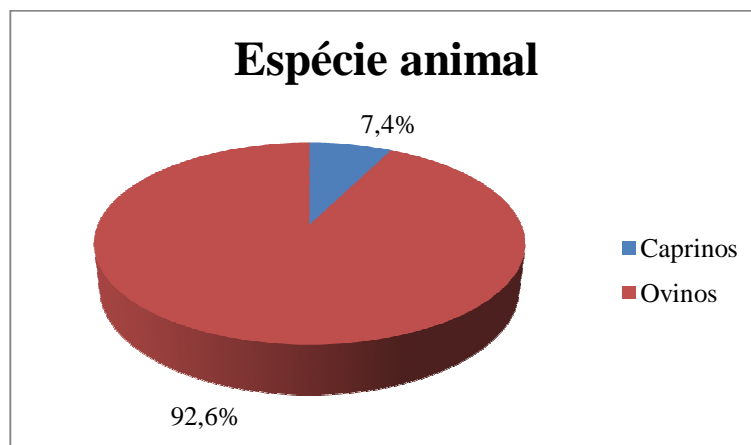
**Tabela 4:** Distribuição das amostras de sangue obtidas e população representada por localidade do distrito de Beja.

Localidade	Animais analisados	População representada	Nº de explorações
Beja	20	485	3
Albernoa	5	26	1
Alvito	5	26	1
Beringel	7	115	1
Santa Clara do Louredo	20	1048	2
Trindade	5	16	1
Moura	10	300	1
São Marcos	10	220	1
Salvada	15	568	2
Quintos	25	1080	3
Aljustrel	5	80	1
São Matias	5	40	1
Mértola	10	431	1
Neves	20	676	3
Baleizão	5	100	1
Trigaches	10	63	2
Viana do Alentejo	5	85	1
Cabeça Gorda	5	30	1
<b>Total</b>	<b>187</b>	<b>5389</b>	<b>27</b>

**Tabela 5:** Distribuição da população e amostras de sangue estudadas por espécie.

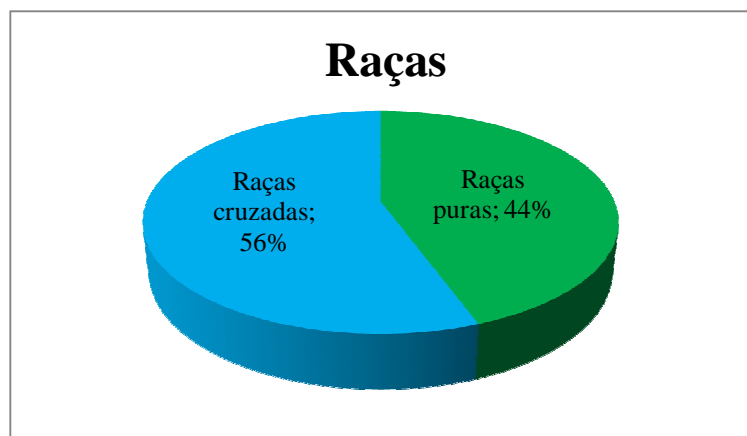
Espécie	Número de amostras	População representada
Ovinos	172	4873
Caprinos	15	516
<b>Total</b>	<b>187</b>	<b>5389</b>





**Gráfico 1:** Distribuição dos rebanhos analisados por espécie.

As raças dos animais das explorações em estudo distribuíram-se da seguinte forma: rebanhos cruzados (53%; 15/27) e rebanhos de raças puras (44%; 12/27) (Gráfico 2).

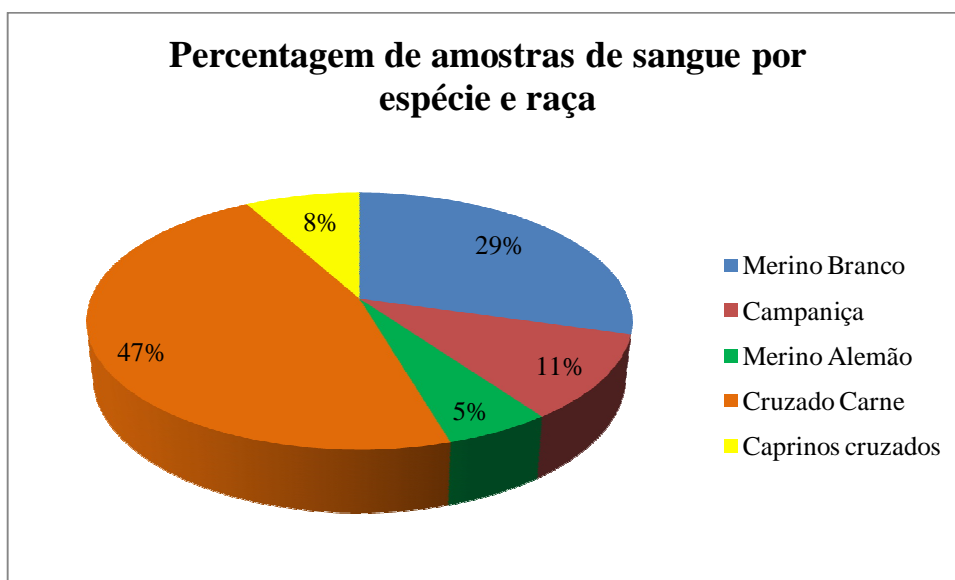


**Gráfico 2:** Distribuição dos rebanhos analisados entre animais de raças puras e de raças cruzadas.

No estudo foram identificadas 33,3% (9/27) de explorações de ovinos de raça Merino Branco, 7,4% (2/27) de raça Campaniça e 3,7% (1/27) de raça Merino Alemão. As restantes 55,6% (15/27) das explorações tinham animais cruzados. No entanto, derivado das diferentes amostragens, a representatividade das raças analisadas no volume total do estudo diferiram destes valores (Tabela 6 e Gráfico 3).

**Tabela 6:** Número de animais rastreados de cada espécie e raça.

Raça	Número de amostras
Merino Branco	55
Campaniça	20
Merino Alemão	10
Cruzado de carne	87
Caprinos cruzados	15

**Gráfico 3:** Distribuição da percentagem de amostras de sangue analisadas por espécie e raça.

### 3.2.2. Selecção do número de amostras a recolher por exploração

Para a determinação do número mínimo de amostras a recolher num determinado efectivo animal, considerou-se a dimensão de cada exploração. O número de amostras para análise foi calculado através da fórmula abaixo apresentada (Toma *et al.*, 2004).

#### Fórmula de cálculo do número mínimo de amostras

$$n = [1 - (\alpha)^{1/D}] \times \left[ N - \frac{D}{2} \right] + 1$$

**Legenda da fórmula:** **n** = dimensão da amostra;  **$\alpha$** = probabilidade de não ter nenhum doente entre os **n** animais aleatoriamente seleccionados de uma população **N**;  
**N**= dimensão da população; **D**= número de unidades doentes na população.

A partir dos resultados obtidos para as diferentes explorações, obteve-se um total de amostras de 187 animais, considerando um intervalo de confiança de  $\alpha=95\%$  e uma prevalência esperada de  $P=50\%$ , para cada uma das explorações em estudo. Esta prevalência esperada de  $P=50\%$  assumida inicialmente teve por base o desconhecimento da situação da região no início do trabalho, assumindo assim a possibilidade de um animal estar ou não infectado, havendo 50% de probabilidade para cada um dos resultados.

As amostragens recolhidas por exploração variaram em função da dimensão da sua população (Gráfico 4). Foi recolhida uma amostra de 5 animais para explorações com um efectivo até 100 animais, 7 animais para um efectivo de 101 a 200 animais e 10 animais para efectivos superiores a 200 animais, de forma a ser possível classificar cada

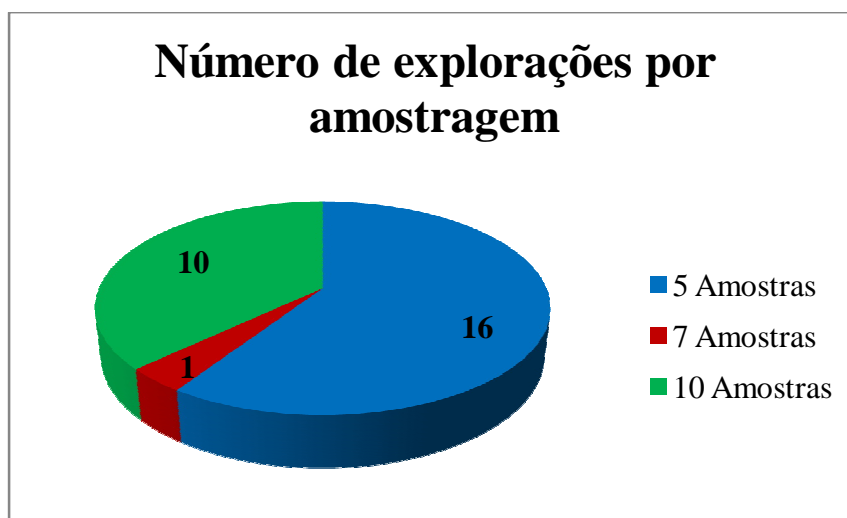
uma como exploração positiva, duvidosa ou negativa à presença de anticorpos contra *M. paratuberculosis*.

Os resultados obtidos da avaliação pelo teste ELISA das amostras permitiram dividir as explorações em positivas, duvidosas e negativas, de acordo com a seguinte caracterização:

❖ **Positivas** quando pelo menos um dos animais sujeito a análise pelo teste ELISA apresentar resultado positivo;

❖ **Duvidosas** quando pelo menos um animal dos que foram analisados tenha resultado duvidoso e os restantes animais analisados dessa população tenham resultado negativo;

❖ **Negativas** quando todos os animais sujeitos a análise pelo teste ELISA apresentarem resultados negativos.



**Gráfico 4:** Distribuição das explorações pelas 3 diferentes amostragens feitas nos rebanhos.

Assim, como podemos ver no gráfico 4, obteve-se dezasseis explorações com 5 amostras, uma exploração com 7 amostras e dez explorações com 10 amostras.

### 3.2.3. Recolha e envio de amostras

A recolha das amostras foi realizada em simultâneo com as intervenções sanitárias de rotina. Apesar da amostragem ser efectuada de forma aleatória, foram apenas recolhidas amostras em animais com idade superior a 2 anos e com ausência total de doença clínica aparente.

A recolha de sangue foi realizada na veia jugular para tubos de vácuo sem anticoagulante com agulhas 18 G, descartáveis e esterilizadas. Após a recolha das amostras, os tubos foram mantidos em geleiras térmicas até chegar ao frigorífico, onde foram armazenados a uma temperatura controlada entre 2 a 4 °C. Foram identificadas individualmente com um número de identificação correspondente a cada exploração, o qual fazia corresponder a marca da exploração e localização da mesma, omitidos neste trabalho. Outras características como presença de outras espécies, raça e tamanho do efectivo foram também registados. Posteriormente eram enviadas para o laboratório onde foram processadas.

A recolha e o processamento das amostras foram realizados durante o decorrer do estágio curricular nos meses de Janeiro, Fevereiro e Março de 2011.

### 3.2.4. Técnica laboratorial utilizada

O teste utilizado laboratorialmente para detecção de anticorpos anti *Mycobacterium paratuberculosis* nas amostras de sangue foi um teste ELISA indirecto, de nome comercial Pourquoi® ELISA Paratuberculosis Screening (produzido por IDEXX, Montpellier, França). Segundo o fabricante, este teste proporciona um método rápido e simples, altamente específico (especificidade de 99%) e com uma sensibilidade de 60-80% na detecção de anticorpos contra *M. paratuberculosis* (IDEXX, 2011).

A técnica laboratorial realiza-se em placas de microtitulação, tendo sido revestidas com antigénios de *M. paratuberculosis*. As amostras foram primeiramente incubadas com extracto de *Mycobacterium phlei*, com o objectivo de ligar anticorpos inespecíficos, e diminuir assim a probabilidade de reacções cruzadas. Após a transferência das amostras pré-incubadas para as placas revestidas com antigénio, os

anticorpos específicos ligam-se à sua superfície, ficando os restantes componentes soltos os quais são posteriormente removidos por lavagem.

As ligações antígeno-anticorpo foram detectadas por uma solução enzimática HRPO (horseradish peroxidase) e na presença desta o substrato TMB é coberto o qual reage com o cromogéneo dando origem a uma coloração azul. Após a adição da solução de bloqueio evidencia-se a coloração amarela. Através espectrofotometria é medida a absorvância com um comprimento de onda de 450 nm.

O grau de cor demonstrado medido pela densidade óptica é directamente proporcional à quantidade de anticorpos específicos de *M. paratuberculosis* presentes na amostra. Os diagnósticos obtêm-se por comparação da densidade óptica das amostras com a densidade óptica do controlo positivo (IDEXX, 2010).

### 3.2.5. Protocolo da técnica

- Pré-incubação das amostras
  - Pré diluiu-se as soluções de controlo e as amostras a 1:20 utilizando a solução de diluição tampão do teste.
  - Homogeneizar e incubar à temperatura de  $21 \pm 5$  °C durante 15 minutos a 2 horas.
- Incubação das amostras
  - Distribuir 100 µl de amostras, controlo positivo e controlo negativo pré-diluídos nos poços da placa de microtitulação com a diluição final de destes de 1:20.
  - Homogeneizar o conteúdo dos poços com uma suave agitação da placa
  - Cobrir a placa de microtitulação e incubar durante 45 minutos ( $\pm 5$  min) a 21 °C ( $\pm 5$  °C) ou durante a noite (16-24 horas) a 5 °C ( $\pm 3$  °C).
- Lavagem
  - Aspirar e descartar o conteúdo líquido dos poços para um reservatório. Lavar cada poço com 300µl de solução de lavado do teste três vezes consecutivas.
  - Aspirar os líquidos de todos os poços após cada lavagem. Posteriormente à última aspiração eliminar os resíduos de solução de lavagem com

material absorvente de forma a eliminar todos os lavados residuais da mesma. Evitar que a placa seque entre lavagens e antes de juntar o próximo reagente.

- Incubação com a solução conjugado HRPO
  - Distribuir 100 µl de conjugado HRPO anti-ruminante em cada poço.
  - Cobrir a placa e incubar durante 30 minutos ( $\pm 5$  min) a 21 °C ( $\pm 5$  °C).
- 2ª Lavagem
  - Repetir todos os procedimentos da primeira lavagem.
- Incubação com substrato TMB
  - Distribuir 100 µl de substrato TMB por poço e incubar durante 10 minutos a 21 °C ( $\pm 5$  °C) no escuro. Começar a contagem de tempo após a aplicação do substrato no primeiro poço.
  - Distribuir 100 µl de solução de bloqueio por poço.
  - Agitar suavemente a placa até a coloração da solução estar homogeneizada. Limpar cuidadosamente a parte inferior da placa.
- Leitura
  - Ler a densidade óptica após a cor ficar estável com o auxílio de um espectrofotómetro com um comprimento de onda de 450nm [A(450)].

### 3.2.6. Validação e cálculos dos resultados do teste

Para a correcta validação da placa, a densidade óptica dos controlos positivos deve ser maior ou igual que 0,350 e o rácio entre a média da densidade óptica dos controlos positivos (PCx) e a densidade óptica do controlo negativo (NC) deve ser maior ou igual a 3,00. (%S/P = Ajustamento da absorvância da amostra; A = absorvância)

#### **Cálculo do rácio S/P para cada amostra:**

$$\% S/P = 100 \times \frac{\text{Amostra [A(450)]} - \text{NC}}{(\text{PC}_x - \text{NC})}$$

### 3.2.7. Classificação dos resultados das amostras no teste

A classificação dos resultados das amostras é definida segundo uma escala que depende da percentagem do rácio S/P para cada amostra (Tabela 7).

**Tabela 7:** Classificação dos resultados das amostras no teste.

% S/P da amostra	$\leq 45\%$	$> 45\%$ e $< 55\%$	$\geq 55\%$
Interpretação	Negativo	Duvidoso	Positivo

### 3.2.8. Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do programa informático R Commander (R Development Core Team, 2008) e do site da internet EpiTools epidemiological calculators (Sergeant, 2009).

Foi necessário calcular três sensibilidades de rebanho, pois a amostragem dos rebanhos feita no estudo encontra-se dividida em 3 grupos, amostras de 5, 7 e 10 sangues, o que levou a calcular a sensibilidade de rebanho para cada um dos grupos ( $Se_5$ ,  $Se_7$  e  $Se_{10}$ ).

Para as amostragens de 5 sangues, as quais correspondiam a uma população até 100 animais, foi considerado um efectivo de 100 animais. Para a amostragem de 7 sangues, a qual correspondia uma população de 101 a 200 animais, foi considerado um efectivo de 115 animais, pois foi o único rebanho em estudo a obter 7 amostras de sangue, permitindo assim o valor da sensibilidade de rebanho para esta amostragem ser o mais aproximado possível. Para as amostragens de 10 sangues, as quais correspondem a populações superiores a 200 animais, foi considerado um efectivo de 300 animais.

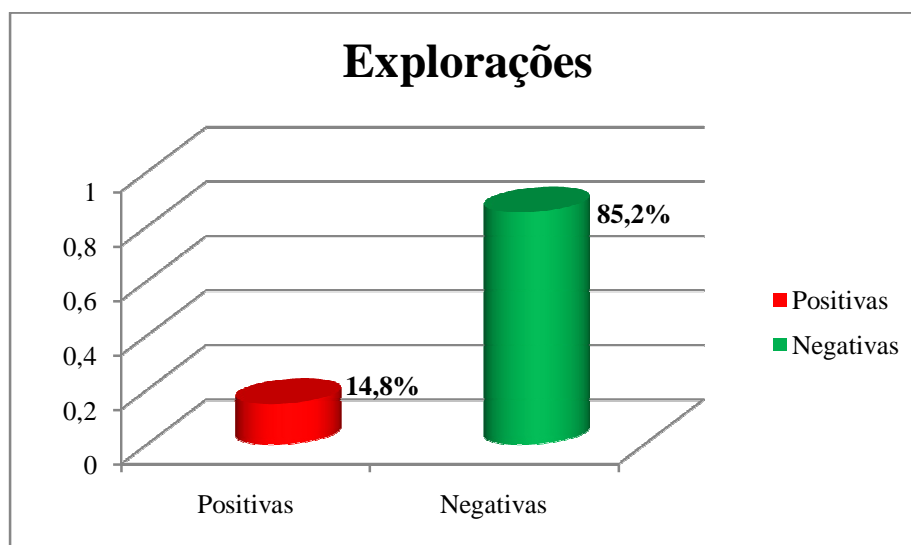


### 3.3.Resultados

Após a recolha de amostras e dados e, realizadas as análises do presente estudo foram encontrados os seguintes resultados aparentes:

Das 27 explorações rastreadas 3 explorações apresentaram pelo menos um resultado positivo no teste, sendo portanto consideradas explorações positivas à circulação do agente. Nas explorações rastreadas foi também encontrada 1 exploração que apresentou apenas um animal com resultado duvidoso no teste. No entanto, dada as características da doença, sendo esta uma doença de acrescida dificuldade de diagnóstico em estados iniciais, a sensibilidade do teste e a amostragem recolhida, foi assumida no estudo como uma exploração positiva, concluindo assim o estudo com 4 explorações classificadas como positivas.

Neste seguimento, 4 explorações positivas de 27 rastreadas obtemos um resultado de seroprevalência aparente de doença nas explorações de 14,8% (4/27) (Gráfico 5).



**Gráfico 5:** Distribuição das explorações em função da classificação.

Numa segunda análise, na tentativa de extrapolação destes valores para a realidade foi feita uma estimativa da prevalência real de rebanho para a doença e possíveis desvios desta.

Para estimar esta prevalência real foi necessário calcular primeiramente a sensibilidade do teste utilizado para os rebanhos estudados, considerando a sensibilidade do teste, a amostragem e a prevalência intra-rebanho existente. A esta sensibilidade é chamada sensibilidade de rebanho ou sensibilidade ao nível do rebanho (*herd-level sensitivity*). Para isso foi considerado o valor de sensibilidade do teste indicado pelo fabricante,  $Se = 60\%$  (IDEXX, 2011), e a prevalência intra-rebanho utilizada foi de 10%, retirada de um estudo da doença feito na região em 1999, desenvolvido pela DRAAL (Direcção Regional de Agricultura do Alentejo) (Ferreira *et al.*, 1999).

Recorrendo ao método de MacDiarmid (MacDiarmid, 1988), as sensibilidades de rebanho obtidas para os 3 grupos foram:  $Se_5 = 26,3\%$ ,  $Se_7 = 36\%$  e  $Se_{10} = 45,5\%$  (Tabelas 8, 9 e 10).

**Tabela 8:** Variáveis da sensibilidade de rebanho para 5 amostras.

<b>Sensibilidade de rebanho para 5 amostras</b>	Tamanho da amostra	5
	População	100
	Sensibilidade do teste	60%
	Prevalência intra-rebanho	10%
	<b>Se<sub>5</sub></b>	<b>26,3%</b>

**Tabela 9:** Variáveis da sensibilidade de rebanho para 7 amostras.

<b>Sensibilidade de rebanho para 7 amostras</b>	Tamanho da amostra	7
	População	115
	Sensibilidade do teste	60%
	Prevalência intra-rebanho	10%
	<b>Se<sub>7</sub></b>	<b>36%</b>

**Tabela 10:** Variáveis da sensibilidade de rebanho para 10 amostras.

<b>Sensibilidade de rebanho para 10 amostras</b>	Tamanho da amostra	10
	População	300
	Sensibilidade do teste	60%
	Prevalência intra-rebanho	10%
	<b>Se<sub>10</sub></b>	<b>45,5%</b>

Com as três sensibilidades de rebanho obtidas foi possível calcular uma média e chegar a uma sensibilidade de rebanho final para o estudo de  $S_{er} = 36\%$ , a qual foi posteriormente utilizada para o cálculo da estimativa da prevalência real.

### Sensibilidade ao nível do rebanho do estudo

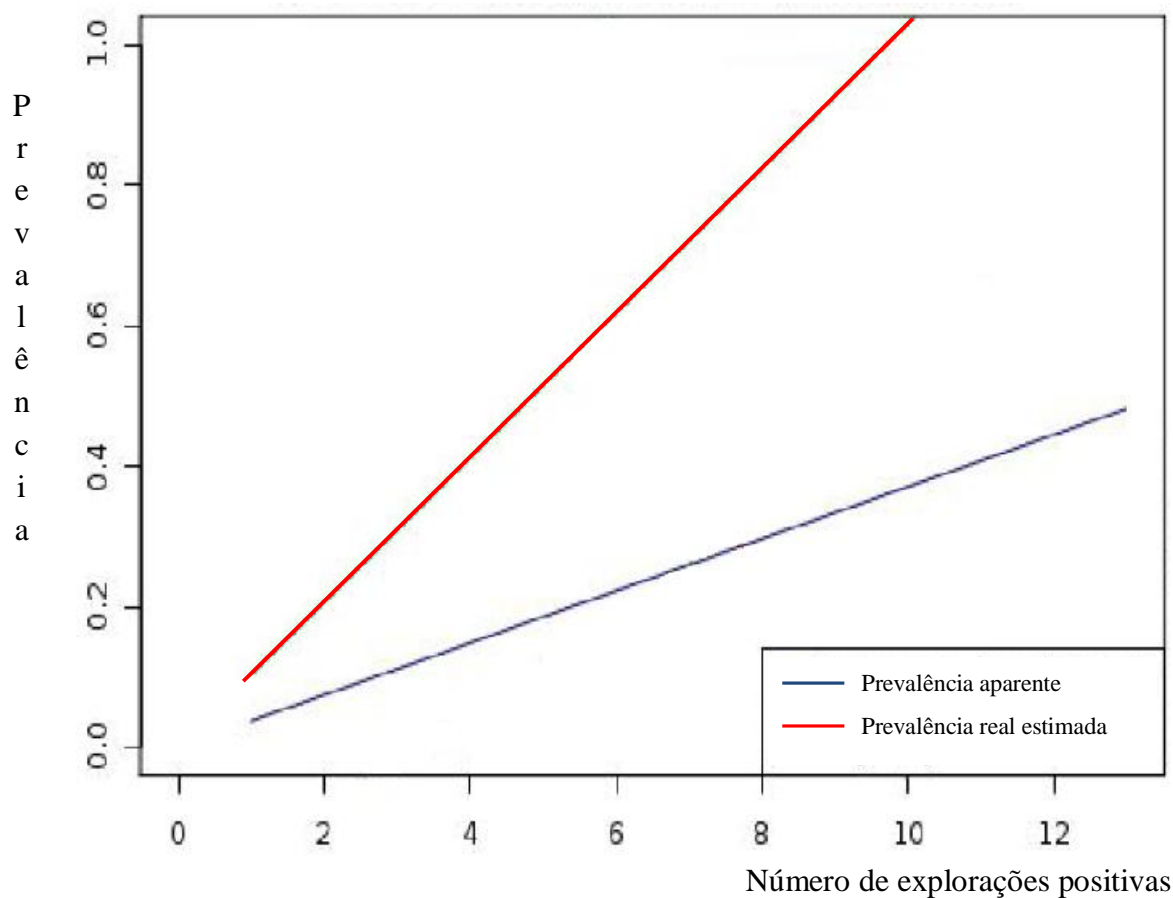
$$S_{er} = 36\%$$

Na estimativa da prevalência real considerou-se as 27 explorações rastreadas com 4 positivas, a sensibilidade de rebanho de 36% e a especificidade do teste de 100%, com um intervalo de confiança de 95%. Os resultados obtidos, recorrendo à análise estatística proposta por Brown, Greiner, Reiczgiel e Rogan (Brown *et al.*, 2001, Greiner & Gardner, 2000, Reiczgiel *et al.*, 2010a, Rogan and Gladen, 1978) foram uma seroprevalência de rebanho aparente de 14,8%, que apresenta um intervalo de confiança de 5,9 a 32,5%, e uma seroprevalência de rebanho estimada de 41,2%, com um intervalo de confiança de 16,4 a 90,2% (Tabela 11 e Gráfico 6).

**Tabela 11:** Estimativa da prevalência de rebanho real e variáveis associadas.

			Valor mínimo (IC)*	Valor máximo (IC)*
<b>Estimativa da seroprevalência real de rebanho de paratuberculose</b>	Rebanhos rastreados	27		
	Rebanhos positivos	4		
	Sensibilidade de rebanho	36%		
	Especificidade do teste	100%		
	Intervalo de confiança	95%		
	<b>Prevalência aparente</b>	<b>14,8%</b>	<b>5,9%</b>	<b>32,5%</b>
	<b>Prevalência estimada</b>	<b>41,2%</b>	<b>16,4%</b>	<b>90,2%</b>

\*IC – Intervalo de confiança



**Gráfico 6:** Valores de prevalência aparente e real.

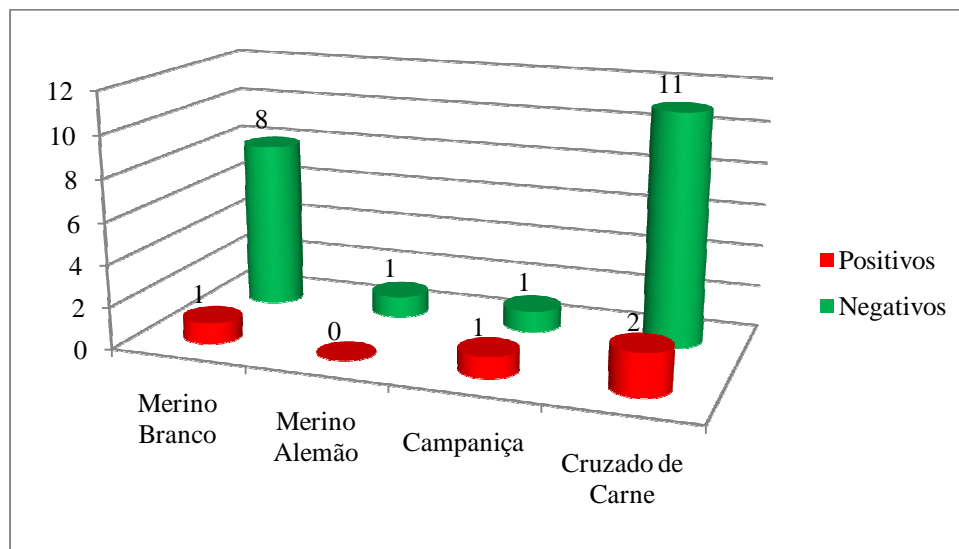
Na tentativa de conseguir atingir os objectivos secundários do estudo foram analisados os dados em função das raças dos rebanhos, da dimensão das explorações, da coabitação com outras espécies e da sua localização geográfica, procurando verificar se existia alguma correlação entre estes factores e a presença da doença.

### 3.3.1. Raça dos animais sujeitos a estudo

A raça dos animais foi um dos parâmetros avaliados de forma a saber se existia algum tipo de relação entre esta e os resultados apresentados nos testes ELISA.

Para os rebanhos de caprinos não foi feita qualquer análise, pois estes foram apenas 2 de raça cruzada e ambos apresentaram resultados negativos ao teste.

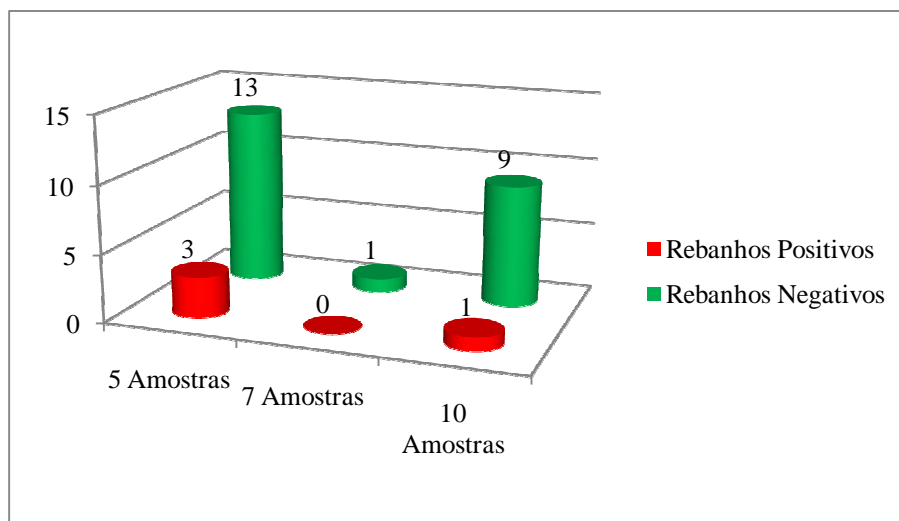
Nos rebanhos de ovinos também não foi possível qualquer correlação estatística dada a baixa prevalência aparente e baixa frequência de casos positivos (Gráfico 7).



**Gráfico 7:** Distribuição dos rebanhos positivos e negativos pelas correspondentes raças.

### 3.3.2. Relação dos resultados com a dimensão dos efectivos

O tamanho dos efectivos foi dividido pela amostragem feita dos rebanhos. Assim sendo foi avaliado se existia alguma relação entre os rebanhos de 5, 7 e 10 amostras com a presença de doença. Devido também á baixa prevalência da doença e baixo número de casos positivos não se encontrou qualquer relevância estatística. Em 16 rebanhos de 5 amostras 3 apresentaram resultados positivos, o único rebanho de 7 amostras apresentou resultado negativo e em 9 rebanhos de 10 amostras 1 apresentou resultado positivo (Gráfico 8).

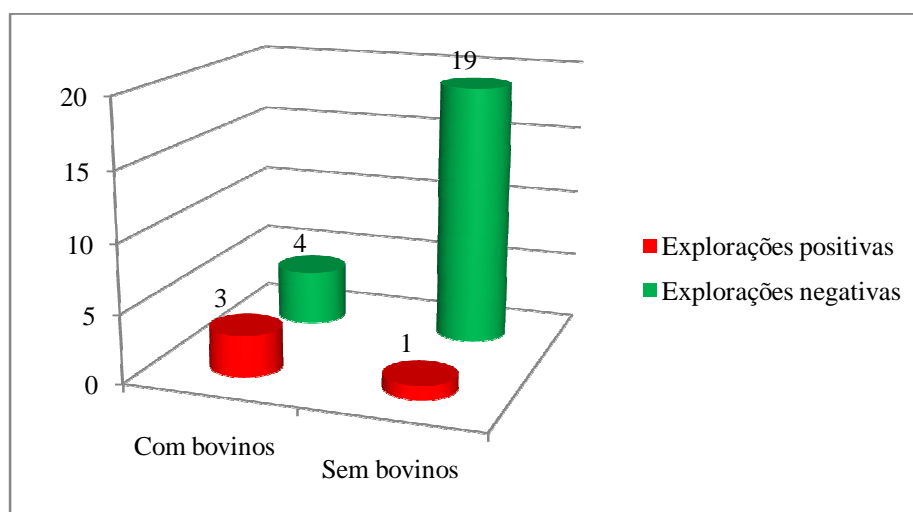


**Gráfico 8:** Distribuição dos rebanhos positivos e negativos em função da amostragem.

### 3.3.3. Coabitação dos rebanhos estudados com outras espécies

Na região do Alentejo algumas explorações de gado apresentam mais do que uma espécie em coabitação. Neste caso, foi avaliada coabitação de bovinos nas mesmas explorações de pequenos ruminantes, mais propriamente ovinos, onde o estudo incidiu.

Os dados avaliados no programa informático R, através da realização do teste de Fisher apresentaram um valor de  $p=0,04188$ , o que indica que este é um factor que apresenta relevância estatística.

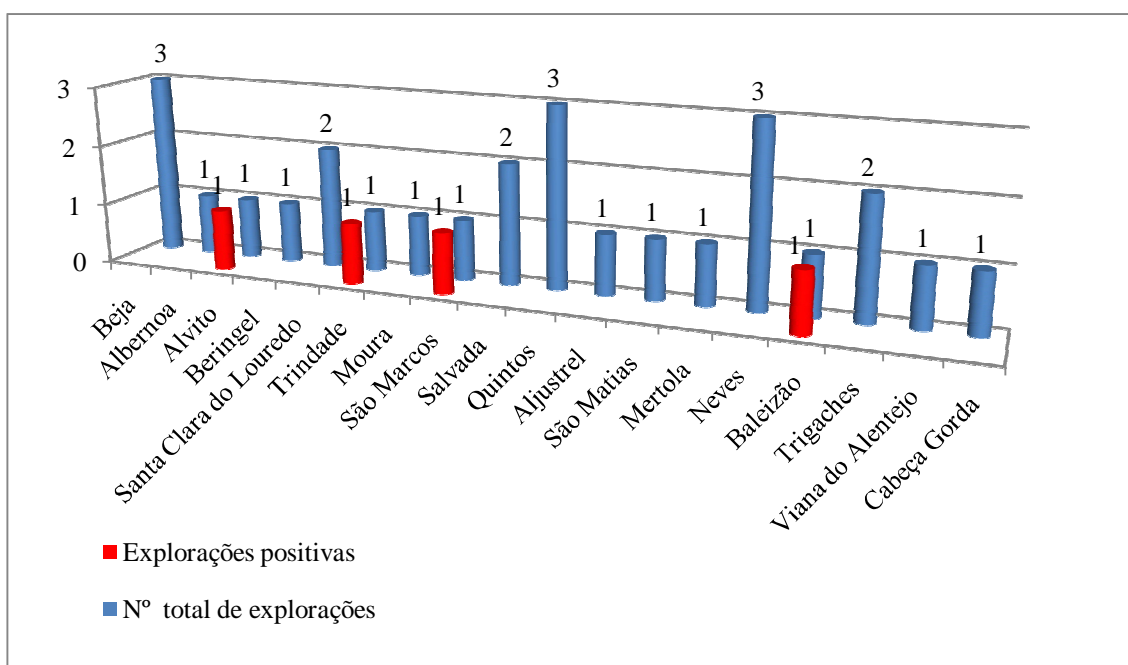


**Gráfico 9:** Distribuição dos rebanhos positivos e negativos em função da coabitação com bovinos.

Através do gráfico podemos ver que os rebanhos rastreados coabitantes com bovinos apresentam uma frequência de doença bastante mais evidente que os rebanhos de uma só espécie (Gráfico 9). Apesar do baixo número de explorações positivas o factor de coabitação com bovinos parece revelar-se importante no presente trabalho, sugerindo ser este um factor de risco que está correlacionado com a presença da doença nas explorações.

### 3.3.4. Distribuição geográfica das explorações

As explorações sujeitas ao estudo de análise de pesquisa de anticorpos anti *M. paratuberculosis*, apresentam-se distribuídas por diversas localidades do distrito de Beja. No entanto, como podemos ver no gráfico e no mapa geográfico das explorações não foi possível estabelecer qualquer tipo de relação (Gráfico 10 e Figura 10). As explorações positivas encontram-se espalhadas pelo distrito, sem formar qualquer tipo de aglomerado ou mancha.



**Gráfico 10:** Distribuição dos rebanhos pelas localidades do distrito de Beja.



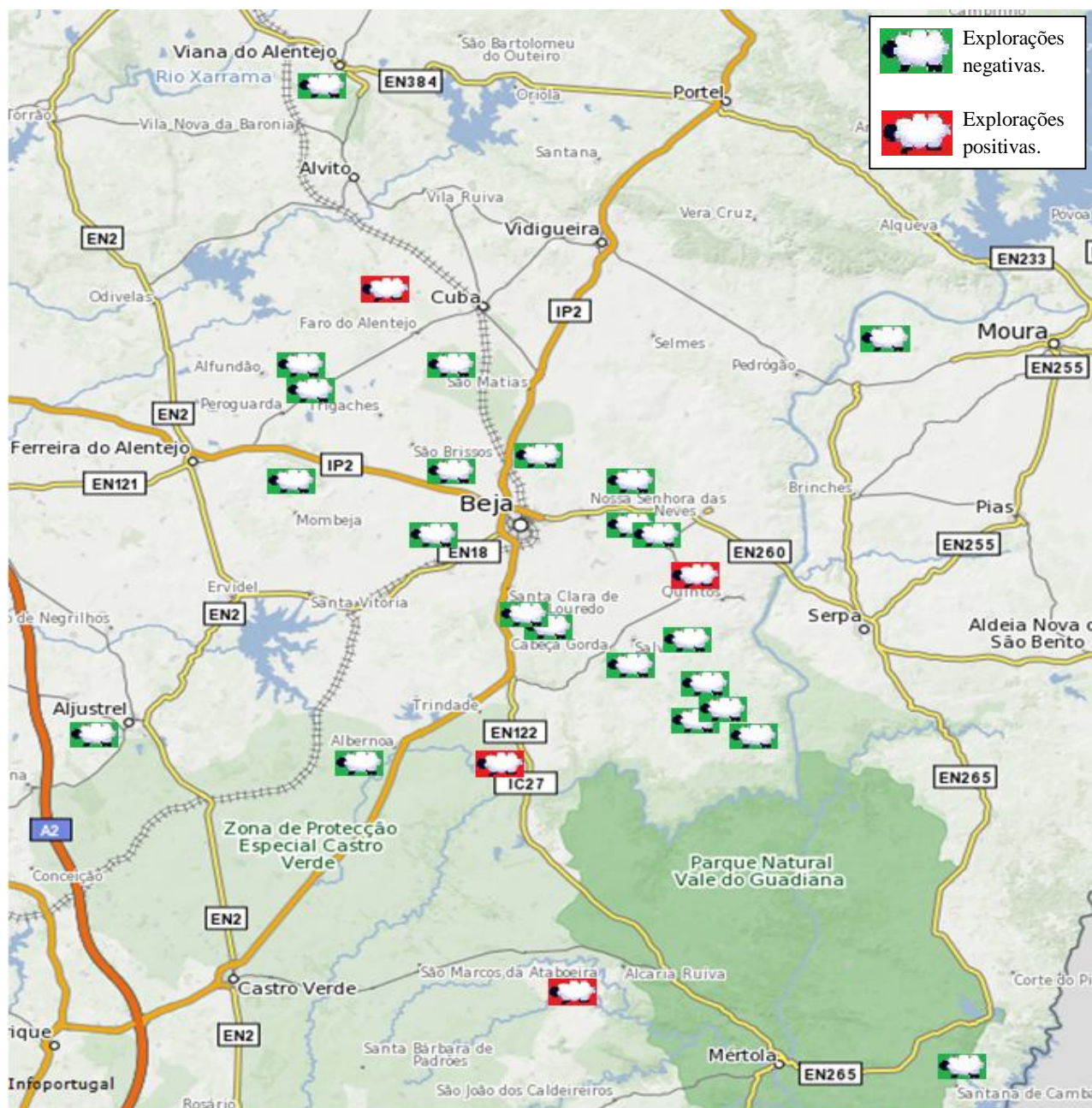


Figura 10: Distribuição geográfica das explorações.



## 4. Discussão

Aparentemente a seroprevalência de rebanho encontrada para a paratuberculose nos rebanhos rastreados foi de 14,8%. No entanto, este valor não tem em consideração as imperfeições do teste ou da amostragem. Segundo Reiczigel (Reiczigel *et al.*, 2010b), estes valores devem ser ajustados e corrigidos para a sensibilidade e especificidade do teste, prevenindo assim que resultados sem ajustamento nos levem a números irreais e a tirar conclusões menos precisas. Este autor descreve ainda uma situação de paratuberculose em rebanhos de ovinos no nordeste de Portugal como referência de um mau exemplo para resultados não ajustados que dão origem a estimativas erradas.

Após o ajustamento dos valores de sensibilidade do teste com a amostragem, verificamos que a seroprevalência aparente de rebanho encontrada inicialmente de 14,8% apresenta um intervalo de confiança de 5,9 a 32,5%, e a seroprevalência real de rebanho sobe para 41,2%, com um intervalo de confiança de 16,4 a 90,2%.

Estes intervalos de confiança devem-se ao valor de sensibilidade do teste ajustado, o qual está dependente da sensibilidade do ELISA comercial utilizado e da amostragem recolhida.

A paratuberculose é considerada uma doença de acrescida dificuldade de diagnóstico, pois a maioria dos testes de diagnósticos actuais apenas detectam a doença em estados avançados (Robbe-Austerman *et al.*, 2006b) e tendem a subestimar a verdadeira prevalência da doença devido à dificuldade de identificar os animais com infecção subclínica (Begg & Whittington, 2010). Segundo a literatura vários testes de ELISA foram avaliados para a paratuberculose e as estimativas da sensibilidade e especificidade variam muito entre eles (Nielsen, 2010). No presente trabalho foram assumidos os valores de sensibilidade e especificidade referidos pelo fabricante de 60% e 100% respectivamente (IDEXX, 2011).

A amostragem realizada pode neste estudo considerar-se um factor limitante, pois inicialmente foi assumida uma prevalência intra-rebanho de 50% para definir as amostragens a recolher nos efectivos, a qual se deveu ao desconhecimento da situação da região, a que se juntariam outros factores limitantes para o desenvolvimento do trabalho entre eles o elevado custo e tempo disponível para a recolha das amostras, a

qual deveria decorrer durante os saneamentos de rotina, sem prejudicar todo o dinamismo do processo.

No ajuste dos valores e cálculo da estimativa da seroprevalência real de rebanho tentou-se dissolver este erro assumindo nos cálculos a prevalência intra-rebanho de 10%, retirada de um estudo desenvolvido pela DRAAL (Ferreira *et al.*, 1999), ao qual apenas se teve acesso posteriormente.

Através da análise destes valores e compreensão dos resultados obtidos podemos verificar o quão importante é o ajustamento dos resultados dos estudos e a influência que estes podem ter nas conclusões e estimativas que deles advêm.

Na correlação da prevalência da doença com outros factores como a raça dos efectivos, a dimensão, a coabitação com outras espécies e a localização geográfica, apenas o factor coabitação dos rebanhos rastreados com rebanhos de bovinos revelou ser significativo.

Pode-se afirmar que nos rebanhos rastreados que coabitavam com bovinos a frequência relativa de explorações positivas se mostrou bastante maior que nos rebanhos de explorações com apenas pequenos ruminantes. Assim, podemos considerar a coabitação de rebanhos de pequenos ruminantes com rebanhos de bovinos um factor de risco para a doença.

Este facto pode ser explicado por um possível tropismo das estirpes existentes na região por bovinos, ou uma maior susceptibilidade da espécie à estirpe, permitindo um maior estabelecimento da doença. Deve, no entanto, ser interpretado com atenção este resultado, pois dada as características da amostragem e do estudo não é possível afirmar que o factor coabitação com bovinos seja condicionante para que os rebanhos sejam ou não positivos, mas sim que, talvez a doença se dissemine e perpetue com mais facilidade, dando origem a uma maior prevalência intra-rebanho, sendo portanto normal ser mais facilmente identificados estes rebanhos como positivos.

Os factores raça e tamanho de efectivo revelaram que o aumento do número de explorações positivas em cada um dos parâmetros aumentou em função do número de vezes que esse parâmetro foi avaliado, havendo mais explorações positivas nos parâmetros que obtiveram maior número de amostras, não demonstrando que esses factores pudessem ser correlacionados e considerados factores de risco. A distribuição geográfica revelou um padrão disperso sem qualquer tipo de associação.

## 5. Conclusão

A paratuberculose é uma doença que se pode considerar subestimada e à qual se dá pouca importância na região do baixo Alentejo, quer da parte dos produtores quer dos médicos veterinários. É uma doença que apresenta pouca expressão clínica e facilmente passa despercebida aos olhos dos profissionais.

Neste estudo a seroprevalência de rebanho estimada foi de 41,2% com um intervalo de confiança de 16,4% a 90,2%, não sendo por isso possível tirar conclusões exactas da situação da região em relação à doença, servindo contudo como um alerta para os médicos veterinários, entidades oficiais e produtores.

O factor coabitação dos rebanhos rastreados com rebanhos de bovinos revelou ter importância, podendo-se considerar um factor de risco para a doença nos rebanhos de pequenos ruminantes e mais um alerta para a situação dos rebanhos de bovinos na região.

Quer por parte dos médicos veterinários, quer por parte dos produtores e serviços oficiais de veterinária, por a paratuberculose estar presente e ser grave (Juste & Perez, 2011), deve corresponder uma maior sensibilidade para a morbilidade em pequenos ruminantes. O presente trabalho pode servir como mais um contributo para novos estudos, quer das regiões, quer das populações animais, e para sensibilizar os médicos veterinários e produtores para a doença.

Devem ser considerados factos como as perdas económicas ao nível das explorações nas produções animais assim como nas suas indústrias associadas e ainda interdições de mercados, como já acontece em alguns países que exigem certificados de ausência de doença nas importações.

Deve ser também considerado o facto das crescentes evidências zoonóticas da doença e correlação desta com a doença de Crohn nos humanos, devendo ser continuada esta pesquisa e confirmada a associação e o agente causal.

Na sequência do referido na literatura (Juste & Perez, 2011), deve ainda ser seriamente equacionada a utilização de protocolos vacinais para o controlo da morbilidade nos efectivos de pequenos ruminantes.

## 6. Bibliografia

- Allworth, M. B. & Kennedy, D. J. (2000). Progress in national control and assurance programs for ovine Johne's disease in Australia. *Vet. Microbiol.* 77, 415-422, doi:S0378113500003266 [pii].
- Allworth, M. B., Hood, R., & Kennedy, D. J. (2002). "Progress of the Australian National OJD Control and Evaluation Program" in Proceedings of the Seventh International Colloquium on Paratuberculosis., Bilbao, Spain, pp. 441-445.
- Alvarez, J., de, J. L., Briones, V., Romero, B., Aranaz, A., Fernandez-Garayzabal, J. F., & Mateos, A. (2005). Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in fallow deer and wild boar in Spain. *Vet. Rec.* 156, 212-213.
- Ayele, W. Y., Bartos, M., Svastova, P., & Pavlik, I. (2004). Distribution of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in organs of naturally infected bull-calves and breeding bulls. *Vet. Microbiol.* 103, 209-217, doi:S0378-1135(04)00267-6 [pii];10.1016/j.vetmic.2004.07.011 [doi].
- Beard, P. M., Daniels, M. J., Henderson, D., Pirie, A., Rudge, K., Buxton, D., Rhind, S., Greig, A., Hutchings, M. R., McKendrick, I., Stevenson, K., & Sharp, J. M. (2001). Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1517-1521, doi:10.1128/JCM.39.4.1517-1521.2001 [doi].
- Begg, D. & Whittington, R. (2010). *Paratuberculosis - Organism, Disease, Control*, edited by M. A. Behr & D. M. Collins, pp. 157-168. Cambridge: CAB Internacional.
- Begg, D. J., de, S. K., Bosward, K., Di, F. L., Taylor, D. L., Jungersen, G., & Whittington, R. J. (2009). Enzyme-linked immunospot: an alternative method for the detection of interferon gamma in Johne's disease. *J. Vet. Diagn. Invest* 21, 187-196, doi:21/2/187 [pii].
- Bermudez, L. E., Petrofsky, M., Sommer, S., & Barletta, R. G. (2010). Peyer's patch-deficient mice demonstrate that Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis

- translocates across the mucosal barrier via both M cells and enterocytes but has inefficient dissemination. *Infect. Immun.* 78, 3570-3577, doi:IAI.01411-09 [pii];10.1128/IAI.01411-09 [doi].
- Boadella, M., Carta, T., Oleaga, A., Pajares, G., Munoz, M., & Gortazar, C. (2010). Serosurvey for selected pathogens in Iberian roe deer. *BMC. Vet. Res.* 6, 51, doi:1746-6148-6-51 [pii];10.1186/1746-6148-6-51 [doi].
- Bolske, G. & Herthnek, D. (2010). *Paratuberculosis - Organism, Disease, Control*, edited by M. A. Behr & D. M. Collins, pp. 267-283. Cambridge: CAB Internacional.
- Bosshard, C., Stephan, R., & Tasara, T. (2006). Application of an F57 sequence-based real-time PCR assay for Mycobacterium paratuberculosis detection in bulk tank raw milk and slaughtered healthy dairy cows. *J. Food Prot.* 69, 1662-1667.
- Brown, L. D., Cat, T. T., & DasGupta, A. (2001). Interval Estimation for a proportion. *Statistical Science* 16, 101-103.
- Buergelt, C. D., Bastianello, S. S., & Michel, A. L. (2004). *Infectious Diseases of Livestock* 2<sup>a</sup> ed., Vol. 3, edited by J. A. W. Coetzer & R. C. Tustin, pp. 1994-2008. Cape Town: Oxford University Press.
- Bush, R. D., Windsor, P. A., & Toribio, J. A. (2006). Losses of adult sheep due to ovine Johne's disease in 12 infected flocks over a 3-year period. *Aust. Vet. J.* 84, 246-253, doi:AVJ001 [pii];10.1111/j.1751-0813.2006.00001.x [doi].
- Cartwright, W.A. (1829) Diarrhoea in a cow. *The Veterinarian* 2, 71-72.
- Chacon, O., Bermudez, L. E., & Barletta, R. G. (2004). Johne's disease, inflammatory bowel disease, and Mycobacterium paratuberculosis. *Annu. Rev. Microbiol.* 58, 329-363, doi:10.1146/annurev.micro.58.030603.123726 [doi].
- Chamberlin, W., Graham, D. Y., Hulten, K., El-Zimaity, H. M., Schwartz, M. R., Naser, S., Shafran, I., & El-Zaatari, F. A. (2001). Review article: Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis as one cause of Crohn's disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 15, 337-346, doi:apt933 [pii].

- Chiodini, R. J. (1991). Antimicrobial activity of rifabutin in combination with two and three other antimicrobial agents against strains of *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Antimicrob. Chemother.* 27, 171-176.
- Chiodini R.J. (1993). The history of paratuberculosis (Johne's disease). A review of the literature 1985 – 1992. Providence (RI): International Association of Paratuberculosis; p. 658.
- Cocito, C., Gilot, P., Coene, M., de, K. M., Poupart, P., & Vannuffel, P. (1994). Paratuberculosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 7, 328-345.
- Collins, M. T. (2009). *Current Veterinary Therapy: Food Animal Practice* 5<sup>a</sup> ed., edited by E. D. Anderson & D. M. Rings, pp. 65-69. St Louis: Saunders Elsevier.
- Collins, M. T. & Manning, E. J. (2011). Johne's Information Center. Acedido em 20 de Junho de 2011, em <http://www.johnes.org/>.
- Coussens, P., Lamont, E. A., Kabara, E., & Sreevatsan, S. (2010). *Paratuberculosis - Organism, Disease, Control*, edited by M. A. Behr & D. M. Collins, pp. 109-125. Cambridge: CAB Internacional.
- Davis, J. M. & Ramakrishnan, L. (2009). The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection. *Cell* 136, 37-49, doi:S0092-8674(08)01443-8 [pii];10.1016/j.cell.2008.11.014 [doi].
- de Silva, K., Begg, D., & Whittington, R. (2011). The interleukin 10 response in ovine Johne's disease. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 139, 10-16, doi:S0165-2427(10)00273-4 [pii];10.1016/j.vetimm.2010.07.022 [doi].
- Deutz, A., Spargser, J., Wagner, P., Rosengarten, R., & Kofer, J. (2005). [*Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in wild animal species and cattle in Styria/Austria]. *Berl Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 118, 314-320.
- Dhand, N. K., Eppleston, J., Whittington, R. J., & Toribio, J. A. (2009). Association of farm soil characteristics with ovine Johne's disease in Australia. *Prev. Vet. Med.* 89, 110-120, doi:S0167-5877(09)00038-5 [pii];10.1016/j.prevetmed.2009.02.017 [doi].

- Direcção Geral de Veterinária [DGV] (2011). Requerimento para Autorização de Utilização Especial de Medicamento Veterinário. Acedido em 15 de Junho de 2011, em [http://www.dgv.min-agricultura.pt/xeov21/attachfileu.jsp?look\\_parentBoui=83352&att\\_display=n&att\\_download=y](http://www.dgv.min-agricultura.pt/xeov21/attachfileu.jsp?look_parentBoui=83352&att_display=n&att_download=y).
- Djonne, B. (2010). *Paratuberculosis - Organism, Disease, Control*, edited by M. A. Behr & D. M. Collins, pp. 169-178. Cambridge: CAB Internacional.
- Eltholth, M. M., Marsh, V. R., Van, W. S., & Guitian, F. J. (2009). Contamination of food products with *Mycobacterium avium* paratuberculosis: a systematic review. *J. Appl. Microbiol.* 107, 1061-1071, doi:JAM4286 [pii];10.1111/j.1365-2672.2009.04286.x [doi].
- Eppleston, J., Windsor, P., & Whittington, R. (2011). Effect of unvaccinated Merino wether lambs on shedding of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in flocks vaccinating for ovine Johne's disease. *Aust. Vet. J.* 89, 38-40, doi:10.1111/j.1751-0813.2010.00651.x [doi].
- Fawcett, A. R., Goddard, P. J., McKelvey, W. A., Buxton, D., Reid, H. W., Greig, A., & Macdonald, A. J. (1995). Johne's disease in a herd of farmed red deer. *Vet. Rec.* 136, 165-169.
- Fecteau, M. E. & Whitlock, R. H. (2010). *Paratuberculosis - Organism, Disease, Control*, edited by M. A. Behr & D. M. Collins, pp. 144-156. Cambridge: CAB Internacional.
- Ferreira, A., Mariano, I., de Almeida, V., Caetano, M. C., Núncio, P., Carrilho, E., de Sousa, C., Lopes, S., & Gonçalves, A. P. (1999). Estudo Epidemiológico da Paratuberculose nos Ruminantes no Alentejo. Lisboa: Oficina Gráfica da Secretaria-Geral do MADRP.
- Ferreira, A. J. & Ferreira, C. (1990). *Doenças Infecto-Contagiosas dos Animais Domésticos* 4ª ed., pp. 309-316. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
- Florou, M., Leontides, L., Kostoulas, P., Billinis, C., Sofia, M., Kyriazakis, I., & Lykotrafitis, F. (2008). Isolation of *Mycobacterium avium* subspecies

- paratuberculosis from non-ruminant wildlife living in the sheds and on the pastures of Greek sheep and goats. *Epidemiol. Infect.* 136, 644-652, doi:S095026880700893X [pii];10.1017/S095026880700893X [doi].
- Gillan, S., O'Brien, R., Hughes, A. D., & Griffin, J. F. (2010). Identification of immune parameters to differentiate disease states among sheep infected with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Clin. Vaccine Immunol.* 17, 108-117, doi:CVI.00359-09 [pii];10.1128/CVI.00359-09 [doi].
- Grant, I. R., O'Riordan, L. M., Ball, H. J., & Rowe, M. T. (2001). Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw sheep and goats' milk in England, Wales and Northern Ireland. *Vet. Microbiol.* 79, 123-131, doi:S0378-1135(00)00344-8 [pii].
- Greiner, M. & Gardner, I. A. (2000). Application of diagnostic tests in epidemiologic studies. *Preventive Veterinary Medicine* 45, 43-59.
- Gumber, S., Eamens, G., & Whittington, R. J. (2006). Evaluation of a Pourquier ELISA kit in relation to agar gel immunodiffusion (AGID) test for assessment of the humoral immune response in sheep and goats with and without *Mycobacterium paratuberculosis* infection. *Vet. Microbiol.* 115, 91-101, doi:S0378-1135(06)00006-X [pii];10.1016/j.vetmic.2006.01.003 [doi].
- Harris, N. B. & Barletta, R. G. (2001). *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in Veterinary Medicine. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 489-512, doi:10.1128/CMR.14.3.489-512.2001 [doi].
- Hines, M. E., Stabel, J. R., Sweeney, R. W., Griffin, F., Talaat, A. M., Bakker, D., Benedictus, G., Davis, W. C., de Lisle, G. W., Gardner, I. A., Juste, R. A., Kapur, V., Koets, A., McNair, J., Pruitt, G., & Whitlock, R. H. (2007). Experimental challenge models for Johne's disease: a review and proposed international guidelines. *Vet. Microbiol.* 122, 197-222, doi:S0378-1135(07)00146-0 [pii];10.1016/j.vetmic.2007.03.009 [doi].



- Hope, A. F., Kluver, P. F., Jones, S. L., & Condrón, R. J. (2000). Sensitivity and specificity of two serological tests for the detection of ovine paratuberculosis. *Aust. Vet. J.* 78, 850-856.
- IDEXX (2010). Mycobacterium Paratuberculosis Antibody Tests Kit: Pourquoi® ELISA Paratuberculosis Screening. Montpellier: Institut Pourquoi.
- IDEXX (2011). Paratuberculosis Screening Ab Test. Acedido em 5 de Julho 2011, em [http://www.idexx.com/pubwebresources/pdf/en\\_us/livestock-poultry/paratuberculosis-screening-ab-test-sheet.pdf](http://www.idexx.com/pubwebresources/pdf/en_us/livestock-poultry/paratuberculosis-screening-ab-test-sheet.pdf).
- Johnson-Ifearulundu, Y. & Kaneene, J. B. (1999). Distribution and environmental risk factors for paratuberculosis in dairy cattle herds in Michigan. *Am. J. Vet. Res.* 60, 589-596.
- Johnston, C., Coffey, A., O' Mahony, J., & Sleator, R. D. (2010). Development of a novel oral vaccine against Mycobacterium avium paratuberculosis and Johne disease: A patho-biotechnological approach. *Bioeng. Bugs.* 1, 155-163, doi:10.4161/bbug.1.3.10408 [doi].
- Jones, T. C., Hunt, R. D., & King, N. W. (1997). *Veterinary Pathology* 6<sup>a</sup> ed., pp. 498-501. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins.
- Julian, R. J. (1975). A short review and some observations on Johne's disease with recommendations for control. *Can. Vet. J.* 16, 33-43.
- Juste, R. A., Garrido, J. M., Geijo, M., Elguezabal, N., Aduriz, G., Atxaerandio, R., & Sevilla, I. (2005). Comparison of blood polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection in cattle and sheep. *J. Vet. Diagn. Invest* 17, 354-359.
- Juste, R. A. & Perez, V. (2011). Control of paratuberculosis in sheep and goats. *Vet. Clin. North Am. Food Anim Pract.* 27, 127-138, doi:S0749-0720(10)00097-6 [pii];10.1016/j.cvfa.2010.10.020 [doi].
- Kahn, C. M., B.A., & M.A. (2007). *Manual Merck de Veterinaria - Edición especial 50º aniversario* 6<sup>a</sup> ed., Vol. 1 pp. 600-603. Barcelona: Oceano.

- Kalis, C. H., Collins, M. T., Hesselink, J. W., & Barkema, H. W. (2003). Specificity of two tests for the early diagnosis of bovine paratuberculosis based on cell-mediated immunity: the Johnin skin test and the gamma interferon assay. *Vet. Microbiol.* 97, 73-86, doi:S0378113503002426 [pii].
- Kawaji, S., Begg, D. J., Plain, K. M., & Whittington, R. J. (2011). A longitudinal study to evaluate the diagnostic potential of a direct faecal quantitative PCR test for Johne's disease in sheep. *Vet. Microbiol.* 148, 35-44, doi:S0378-1135(10)00370-6 [pii];10.1016/j.vetmic.2010.07.022 [doi].
- Kawaji, S., Taylor, D. L., Mori, Y., & Whittington, R. J. (2007). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in ovine faeces by direct quantitative PCR has similar or greater sensitivity compared to radiometric culture. *Vet. Microbiol.* 125, 36-48, doi:S0378-1135(07)00230-1 [pii];10.1016/j.vetmic.2007.05.002 [doi].
- Kennedy, D. & Citer, L. (2010). *Paratuberculosis - Organism, Disease, Control*, edited by M. A. Behr & D. M. Collins, pp. 330-343. Cambridge: CAB International.
- Laboratorio 9 de Julio - Diagnóstico Veterinario (2011). Acedido em 20 de Junho 2011, em [http://www.lab9dejulio.com.ar/fotos/signos-clinicos\\_a233](http://www.lab9dejulio.com.ar/fotos/signos-clinicos_a233).
- Lalvani, A., Pathan, A. A., Durkan, H., Wilkinson, K. A., Whelan, A., Deeks, J. J., Reece, W. H., Latif, M., Pasvol, G., & Hill, A. V. (2001). Enhanced contact tracing and spatial tracking of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen-specific T cells. *Lancet* 357, 2017-2021, doi:S0140-6736(00)05115-1 [pii];10.1016/S0140-6736(00)05115-1 [doi].
- Larsen, A. B., Stalheim, O. H., Hughes, D. E., Appell, L. H., Richards, W. D., & Himes, E. M. (1981). *Mycobacterium paratuberculosis* in the semen and genital organs of a semen-donor bull. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 179, 169-171.
- MacDiarmid, S. C. (1988). *N. Z. Vet. J.* 36, 39-42.
- Mainar-Jaime, R. C. & Vazquez-Boland, J. A. (1998). Factors associated with seroprevalence to *Mycobacterium paratuberculosis* in small-ruminant farms in

- the Madrid region (Spain). *Prev. Vet. Med.* 34, 317-327, doi:S0167-5877(97)00091-3 [pii].
- Maio, E., Carta, T., Balseiro, A., Sevilla, I. A., Romano, A., Ortiz, J. A., Vieira-Pinto, M., Garrido, J. M., de la Lastra, J. M., & Gortazar, C. (2011). Paratuberculosis in European wild rabbits from the Iberian Peninsula. *Res. Vet. Sci.*, doi:S0034-5288(11)00015-4 [pii];10.1016/j.rvsc.2010.12.014 [doi].
- Manning, E. J., Steinberg, H., Rossow, K., Ruth, G. R., & Collins, M. T. (1998). Epizootic of paratuberculosis in farmed elk. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 213, 1320-1321.
- Manning, E. J. B. & Collins, M. T. (2010). *Paratuberculosis - Organism, Disease, Control*, edited by M. A. Behr & D. M. Collins, pp. 1-9. Cambridge: CAB Internacional.
- Mendes, S., Boinas, F., Albuquerque, T., Fernandes, L., Afonso, A., & Amado, A. (2004). Epidemiological Studies on Paratuberculose in Small Ruminants in Portugal. *Epidémiologie et Santé Animale* 45, 61-71.
- Mendoza, J. L., Lana, R., & Diaz-Rubio, M. (2009). Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis and its relationship with Crohn's disease. *World J. Gastroenterol.* 15, 417-422.
- Michel, A. L. & Bastianello, S. S. (2000). Paratuberculosis in sheep: an emerging disease in South Africa. *Vet. Microbiol.* 77, 299-307, doi:S0378113500003151 [pii].
- Mikkelsen, H., Aagaard, C., Nielsen, S. S., & Jungersen, G. (2011). Review of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis antigen candidates with diagnostic potential. *Vet. Microbiol.*, doi:S0378-1135(11)00144-1 [pii];10.1016/j.vetmic.2011.03.006 [doi].
- Muskens, J., Bakker, D., de, B. J., & van, K. L. (2001). Paratuberculosis in sheep: its possible role in the epidemiology of paratuberculosis in cattle. *Vet. Microbiol.* 78, 101-109, doi:S0378113500002819 [pii].

- Muskens, J., Elbers, A. R., van Weering, H. J., & Noordhuizen, J. P. (2003). Herd management practices associated with paratuberculosis seroprevalence in Dutch dairy herds. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 50, 372-377, doi:697 [pii].
- Nelli, R. K., Graham, E., Dunham, S. P., & Taylor, D. J. (2008). Real-time PCR identification of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in ovine and bovine tissues. *Vet. Rec.* 163, 422-423, doi:163/14/422 [pii].
- Nielsen, S. S. (2010). *Paratuberculosis - Organism, Disease, Control*, edited by M. A. Behr & D. M. Collins, pp. 284-293. Cambridge: CAB Internacional.
- Nielsen, S. S., Enevoldsen, C., & Grohn, Y. T. (2002). The *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis ELISA response by parity and stage of lactation. *Prev. Vet. Med.* 54, 1-10, doi:S0167587702000089 [pii].
- Nielsen, S. S. & Toft, N. (2008). Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: a review of accuracies of ELISA, interferon-gamma assay and faecal culture techniques. *Vet. Microbiol.* 129, 217-235, doi:S0378-1135(07)00645-1 [pii];10.1016/j.vetmic.2007.12.011 [doi].
- Nielsen, S. S. & Toft, N. (2009). A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. *Prev. Vet. Med.* 88, 1-14, doi:S0167-5877(08)00181-5 [pii];10.1016/j.prevetmed.2008.07.003 [doi].
- Ott, S. L., Wells, S. J., & Wagner, B. A. (1999). Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. *Prev. Vet. Med.* 40, 179-192, doi:S0167-5877(99)00037-9 [pii].
- Pandey, G. S., Musonda, T. L., Chizyuka, H. G., & Schneebeil, M. (1987). Paratuberculosis (Johne's disease) in a herd of Friesian cattle in Zambia. *Vet. Rec.* 120, 369.
- Pribylova, R., Slana, I., Kaevska, M., Lamka, J., Babak, V., Jandak, J., & Pavlik, I. (2011). Soil and Plant Contamination with *Mycobacterium Avium* subsp. Paratuberculosis After Exposure to Naturally Contaminated Mouflon Feces. *Curr. Microbiol.* 62, 1405-1410, doi:10.1007/s00284-011-9875-7 [doi].

- Quinn, P. J., Markey, B. K., Carter, M. E., Donnelly, W. J., Leonard, F. C., & Maghire, D. (2002). *Veterinary Microbiology and Microbial Disease* pp. 97-105. Oxford: Blackwell Science Ltd.
- R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Radostits, O. M., Gay, C. C., Blood, D. C., & Hinchcliff, K. W. (2002). *Clínica Veterinária - Um Tratado de Doenças Dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos* 9ª ed., pp. 827-840. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Reddacliff, L., Eppleston, J., Windsor, P., Whittington, R., & Jones, S. (2006). Efficacy of a killed vaccine for the control of paratuberculosis in Australian sheep flocks. *Vet. Microbiol.* 115, 77-90, doi:S0378-1135(05)00493-1 [pii];10.1016/j.vetmic.2005.12.021 [doi].
- Reddacliff, L. A., Marsh, I. B., Fell, S. A., Austin, S. L., & Whittington, R. J. (2010). Isolation of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis from muscle and peripheral lymph nodes using acid-pepsin digest prior to BACTEC culture. *Vet. Microbiol.* 145, 122-128, doi:S0378-1135(10)00142-2 [pii];10.1016/j.vetmic.2010.03.011 [doi].
- Reiczigel, J., Foldi, J., & Ozsvari, L. (2010a). Exact confidence limits for prevalence of a disease with an imperfect diagnostic test. *Epidemiology and Infection* 138, 1674-1678.
- Reiczigel, J., Foldi, J., & Ozsvari, L. (2010b). Exact confidence limits for prevalence of a disease with an imperfect diagnostic test. *Epidemiol. Infect.* 138, 1674-1678, doi:S0950268810000385 [pii];10.1017/S0950268810000385 [doi].
- Richards, W. D. (1981). Effects of physiol and chemical factors on the viability of *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 14, 587-588.
- Rizaldos, E. C. (2010). *Tesis Doctorial - Caracterización molecular de aislados de Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis, Mapa epidemiológico en Enpaña*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.

- Robbe-Austerman, S., Stabel, J. R., & Morrical, D. G. (2007). Skin test and gamma interferon enzyme-linked immunosorbent assay results in sheep exposed to dead *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis organisms. *J. Vet. Diagn. Invest* 19, 88-90, doi:19/1/88 [pii].
- Robbe-Austerman, S., Stabel, J. R., & Palmer, M. V. (2006). Evaluation of the gamma interferon ELISA in sheep subclinically infected with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis using a whole-cell sonicate or a johnin purified-protein derivative. *J. Vet. Diagn. Invest* 18, 189-194.
- Rogan and Gladen (1978). Estimating prevalence from the results of a screening test. *American Journal of Epidemiology* 107, 71-76.
- Rohde, R. F. & Shulaw, W. P. (1990). Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from the uterine flush fluids of cows with clinical paratuberculosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 197, 1482-1483.
- Rohde, R. F., Shulaw, W. P., Hueston, W. D., Bech-Nielsen, S., Haibel, G. K., & Hoffsis, G. F. (1990). Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from washed bovine ova after in vitro exposure. *Am. J. Vet. Res.* 51, 708-710.
- Rosseels, V. & Huygen, K. (2008). Vaccination against paratuberculosis. *Expert. Rev. Vaccines.* 7, 817-832, doi:10.1586/14760584.7.6.817 [doi].
- Sargison, N. (2008). *Sheep Flock Health - A Planned Approach* pp. 295-300. Oxford: Blackwell Publishing Ltd.
- Scott, P. R. (2007). *Sheep Medicine* pp. 121-125. London: Manson Publishing Ltd.
- Sechi, L. A., Ruehl, A., Ahmed, N., Usai, D., Paccagnini, D., Felis, G. E., & Zanetti, S. (2007). *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infects and multiplies in enteric glial cells. *World J. Gastroenterol.* 13, 5731-5735.
- Seffner, W. (1999). *Doenças Infecciosas em Animais Domésticos* Vol. 2, edited by J. Beer, pp. 286-290. São Paulo: Roca.
- Sergeant, E. S. G. (2009). Epitools epidemiological calculators. AusVet Animal Health Services and Australian Biosecurity Cooperative Research Centre for Emerging

- Infectious Disease. Acedido em 5 de Julho 2011, em <http://epitools.ausvet.com.au>.
- Sharp, J. M. (2007). *Diseases of Sheep* 4<sup>a</sup> ed., edited by I. D. Aitken, pp. 168-173. Oxford: Blackwell Publishing.
- Sigur-Dardottir, O. G., Press, C. M., & Evensen, O. (2001). Uptake of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis through the distal small intestinal mucosa in goats: an ultrastructural study. *Vet. Pathol.* 38, 184-189.
- Sigurdardottir, O. G., Bakke-McKellep, A. M., Djonne, B., & Evensen, O. (2005). *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis enters the small intestinal mucosa of goat kids in areas with and without Peyer's patches as demonstrated with the everted sleeve method. *Comp Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 28, 223-230, doi:S0147-9571(05)00007-X [pii];10.1016/j.cimid.2005.01.004 [doi].
- Sigurethardottir, O. G., Valheim, M., & Press, C. M. (2004). Establishment of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection in the intestine of ruminants. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56, 819-834, doi:10.1016/j.addr.2003.10.032 [doi];S0169409X03002680 [pii].
- Skellet E. (1807) *A Practical Treatise on the Parturition of the Cow, or the Extraction of the Calf, and on the Diseases of Neat Cattle in General; with the Most Approved Methods of Treatment, and Best Forms of Prescription Adapted to Veterinary Practice*. Sherwood, Nely and Jones, London.
- Slana, I., Kralik, P., Kralova, A., & Pavlik, I. (2008). On-farm spread of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in raw milk studied by IS900 and F57 competitive real time quantitative PCR and culture examination. *Int. J. Food Microbiol.* 128, 250-257, doi:S0168-1605(08)00480-7 [pii];10.1016/j.ijfoodmicro.2008.08.013 [doi].
- Stabel, J. R. (2000). Transitions in immune responses to *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 77, 465-473, doi:S037811350000331X [pii].
- Stabel, J. R. (2010). *Paratuberculosis - Organism, Disease, Control*, edited by M. A. Behr & D. M. Collins, pp. 230-243. Cambridge: CAB Internacional.

- Stevenson, K. (2010). *Paratuberculosis - Organism, Disease, Control*, edited by M. A. Behr & D. M. Collins, pp. 126-137. Cambridge: CAB Internacional.
- Stevenson, K., Alvarez, J., Bakker, D., Biet, F., de, J. L., Denham, S., Dimareli, Z., Dohmann, K., Gerlach, G. F., Heron, I., Kopecna, M., May, L., Pavlik, I., Sharp, J. M., Thibault, V. C., Willemsen, P., Zadoks, R. N., & Greig, A. (2009). Occurrence of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis across host species and European countries with evidence for transmission between wildlife and domestic ruminants. *BMC. Microbiol.* 9, 212, doi:1471-2180-9-212 [pii];10.1186/1471-2180-9-212 [doi].
- Sweeney, R. W., Whitlock, R. H., Buckley, C. L., & Spencer, P. A. (1995). Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle. *J. Vet. Diagn. Invest* 7, 488-493.
- Tanguay, S. & Killion, J. J. (1994). Direct comparison of ELISPOT and ELISA-based assays for detection of individual cytokine-secreting cells. *Lymphokine Cytokine Res.* 13, 259-263.
- Tessema, M. Z., Koets, A. P., Rutten, V. P., & Gruys, E. (2001). How does *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis resist intracellular degradation? *Vet. Q.* 23, 153-162.
- Toma, B., Dufour, B., Sanaa, M., Benet, J-J., Shaw, A., Moutou, F., *et al.* (2004). *Epidemiologia aplicada: à luta colectiva contra as principais doenças animais transmissíveis*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
- Turenne, C. Y. & Alexander, D. C. (2010). *Paratuberculosis - Organism, Disease, Control*, edited by M. A. Behr & D. M. Collins, pp. 60-72. Cambridge: CAB Internacional.
- Twort, F. and Ingram, G.L.Y. (1912) A method for isolating and cultivating the *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis*, Johne, and some experiments on the preparation of a diagnostic vaccine for pseudotuberculosis enteritis of bovines. *Proceedings of the Royal Society, Series B* 84, 517-542.



- Uzoigwe, J. C., Khaita, M. L., & Gibbs, P. S. (2007). Epidemiological evidence for *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis as a cause of Crohn's disease. *Epidemiol. Infect.* 135, 1057-1068, doi:S0950268807008448 [pii];10.1017/S0950268807008448 [doi].
- Vala, H., Santos, C., Esteves, F., Albuquerque, T., Afonso, A., Botelho, A., Seixas, C., Amaral, M., & Amado, A. (2007). Paratuberculosis in sheep from Serra da Estrela Region, Portugal. *Proceedings of 9ICP* 250-253.
- Whitlock, R. H. (2009). *Large Animal Internal Medicine* 4<sup>a</sup> ed., edited by P. B. Smith, pp. 881-887. St. Louis: Mosby Elsevier.
- Whittington, R. (2010). *Paratuberculosis - Organism, Disease, Control*, edited by M. A. Behr & D. M. Collins, pp. 244-266. Cambridge: CAB Internacional.
- Whittington, R. J., Marshall, D. J., Nicholls, P. J., Marsh, I. B., & Reddacliff, L. A. (2004). Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2989-3004.
- Withers, R. W. Johne's disease. II. Incidence of the disease. *Vet. Rec.* 71: 1150-1153. 1959.
- World Organisation for Animal Health (2008). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2009, Paratuberculosis (Johne's Disease). Acedido em 1 de Junho de 2011, em [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2008/pdf/2.01.1\\_1\\_PARATB.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2008/pdf/2.01.1_1_PARATB.pdf), pp. 276-291.
- World Organisation for Animal Health (2011). Acedido em 20 de Junho 2011, em <http://web.oie.int/wahis/public.php?page=home>.

## **7. Anexos**

# **Anexo I**

## **Requerimento para Autorização de Utilização Especial de Medicamento Veterinário**



DGV  
Direcção-Geral  
de Veterinária

Direcção de Serviços de Medicamentos e Produtos de Uso Veterinário

**Requerimento para Autorização de Utilização Especial de Medicamento Veterinário**

<p>Ex.mo Senhor Director-Geral de Veterinária Lg. Da Academia Nacional de Belas Artes nº 2 1249-105 Lisboa</p>		
<p>E-mail – <a href="mailto:pedido.medicamento@dgv.min-agricultura.pt">pedido.medicamento@dgv.min-agricultura.pt</a> Faxe nº 213 239 565</p>		<p>Data:</p>
<p>ASSUNTO – <b>PEDIDO DE AUTORIZAÇÃO DE UTILIZAÇÃO ESPECIAL DE MEDICAMENTO VETERINÁRIO</b></p>		
<p>(Nome do médico-veterinário)</p>		<p>(Nº Cédula Profissional)</p>
<p>Exercendo a sua actividade profissional em:</p>	<p>Faxe Telefone / Telemóvel e-mail</p>	
<p>Ao abrigo do número 4 do artº 55º do Decreto-Lei nº 148/2008, de 29 de Julho de 2008, solicita autorização para utilização especial de:</p>		
<p>(Nº de embalagens)</p>	<p>(Nome do medicamento veterinário)</p>	<p>(Substância activa)</p>
<p>(Apresentação / Forma farmacêutica)</p>		<p>(Distribuidor)</p>
<p>Para utilizar durante (Período de duração previsto para utilização do medicamento veterinário)</p>		
<p>Em (espécie e identificação dos animais)</p>		



**Ministério da  
Agricultura,  
do Desenvolvimento  
Rural e das Pescas**

**DGV**  
Direção-Geral  
de Veterinária

**Direcção de Serviços de Medicamentos e Produtos de Uso Veterinário**

**Pertencente(s) / na posse de** *(Identificação e residência do proprietário / detentor do(s) animal(ais))*

**Justificação clínica e protocolo terapêutico:**

**Intervalo de segurança, se for o caso:**



Ministério da  
Agricultura,  
do Desenvolvimento  
Rural e das Pescas

DGV  
Direcção-Geral  
de Veterinária

Direcção de Serviços de Medicamentos e Produtos de Uso Veterinário

Outras informações consideradas relevantes para a avaliação do pedido:

(Assinatura e carimbo / vinheta do médico-veterinário)

Lista de documentos em anexo (*Documentos em anexo*)