

JOSÉ MARIA FERNANDES CARDOSO

**RASTREIO SEROLÓGICO DE
PARATUBERCULOSE EM REBANHOS DE
CAPRINOS NA REGIÃO DA BEIRA INTERIOR**

Orientador: Professor Doutor João Cannas da Silva

Coorientador: Dr. Álvaro Lopes

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2020

JOSÉ MARIA FERNANDES CARDOSO

**RASTREIO SEROLÓGICO DE
PARATUBERCULOSE EM REBANHOS DE
CAPRINOS NA REGIÃO DA BEIRA INTERIOR**

Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, no dia 8 de junho de 2020, perante o júri nomeado pelo Despacho Reitoral nº151/2020 de 27 de maio de 2020, com a seguinte composição:

Membros do Júri:

Presidente: Professora Doutora Laurentina Pedroso

Arguente: Professora Doutora Ângela Dâmaso

Orientador: Professor Doutor João Cannas da Silva

Coorientador: Dr. Álvaro Lopes

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2020

Agradecimentos

À Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, docentes e colaboradores, obrigado por seis anos de transmissão de conhecimentos, experiência e profissionalismo.

Ao Dr. Álvaro Lopes e ao Dr. João Diogo quero agradecer por todo o conhecimento transmitido e por toda a disponibilidade, dedicação e auxílio. Agradeço também os valores transmitidos quer a nível profissional como pessoal.

Ao Professor Doutor João Cannas da Silva, meu orientador, por toda a sua disponibilidade, auxílio e conhecimento, fundamental para a elaboração desta dissertação.

Ao Dr. André Preto pelo auxílio prestado no estudo epidemiológico da dissertação.

Aos meus pais, irmão, avós e restante família um enorme agradecimento pelo apoio incondicional que me deram ao longo do curso.

Aos meus amigos Gonçalo, Bruno, Bernardo, Gil, Carlos, João, Mafalda, Margarida, Beatriz, Inês, Susie, Bruno, Tiago por todo este percurso académico onde cultivamos a amizade.

Resumo

A Paratuberculose, doença infecciosa crónica, afeta principalmente as espécies de ruminantes e apresenta-se como uma doença de difícil controlo, quer no ambiente como nos efetivos.

Foi realizado um rastreio epidemiológico para determinar a seroprevalência do agente da Paratuberculose, o *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, nos rebanhos de caprinos da Beira Interior, de forma a calcular a prevalência de explorações positivas assim como a assertividade do Médico Veterinário no diagnóstico da doença com base no historial clínico e epidemiológico.

Foi selecionada uma amostra de 16 explorações aos quais foram recolhidas amostras de sangue para serem analisadas através de um teste ELISA comercial para deteção de anticorpos anti- Map. Foi verificada uma prevalência de 56,2%.

Com base no historial clínico e epidemiológico das explorações foi selecionada uma amostra de 15 explorações que integravam o padrão clínico e epidemiológico da Paratuberculose das quais 14 explorações apresentaram resultado positivo no teste ELISA (93,3%).

Dada o elevado impacto da Paratuberculose na saúde animal, revelando por isso um colateral impacto económico e também um possível carácter zoonótico fazem da enfermidade um objetivo de controlo.

Os longos períodos subclínicos da doença, resistência no meio ambiente, capacidade de infeção de uma variedade de espécies de seres vivos caracterizam o Map num microrganismo de difícil controlo.

Palavras-Chave: Map; seroprevalência; Paratuberculose; ELISA; caprinos

Abstract

Paratuberculosis, a chronic infectious disease, affects mainly as species of ruminants and presents itself as a disease difficult to control, both in an environment and in herds.

An epidemiological screening was carried out to determine the seroprevalence of the Paratuberculosis agent, *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*, in goat herds in Beira Interior, in order to calculate the prevalence of positive explorations as well as the veterinarian's assertiveness in the diagnosis of the disease based on the clinical and epidemiological history.

A sample was selected from 16 farms from which blood samples were taken to be analyzed using a commercial ELISA test for anti-Map antibodies. A prevalence of 56.2% was found.

Based on the clinical and epidemiological history of the farms, a sample of 15 farms that integrated the clinical and epidemiological standard of Paratuberculosis was selected, of which 14 farms had a positive result in the ELISA test (93.3%).

Given the high impact of Paratuberculosis on animal health, revealing therefore a collateral economic impact as also a possible zoonotic character, make the disease a control objective.

The long subclinical periods of the disease, resistance in the environment, ability to infect a variety of species of living beings characterize Map in a microorganism that is difficult to control.

Key words: Map; seroprevalence; Paratuberculosis; ELISA; goats

Abreviaturas, siglas e símbolos

ADN – Ácido Desoxirribonucleico (DNA)
AGID – Teste de Imunodifusão em Gel Agar
DAD- Deslocamento de Abomaso á direita
DAE – Deslocamento de Abomaso á esquerda
DGAV – Direção Geral de Alimentação e Veterinária
ELISA – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
EUA – Estados Unidos da América
FA – Frequência Absoluta
Fe - Ferro
FR – Frequência Relativa
IC – Intervalo de Confiança
IgG – Imunoglobulina G
IL 10 – Interleucina 10
IS900 – Sequência de Inserção 900
LAMP – Amplificação Isotérmica Mediado por Ciclos
MAC - Complexo *Mycobacterium avium*
Map – *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*
Mm – Milímetro
OPP – Organização de Produtores Pecuários
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (Polimerase Chain Reaction)
PPD – Derivado proteico purificado (purified protein derivative)
REAP – Regime de Exercício da Atividade Pecuária
rRNA – Ácido Ribonucleico Ribossômico
RT – PCR – Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
Se - Sensibilidade
Sp – Especificidade
TH1 – Células T “helper” 1
TH2 – Células T “helper” 2
tRNA – Ácido Ribonucleico de Transferência
T₉₉ – Tempo necessário para redução de 99% das bactérias
 γ -INF – Gamma Interferão

μm – Micrómetro

Índice

Agradecimentos	1
Resumo	2
Abstract	3
Abreviaturas, siglas e símbolos	4
Índice	6
Índice de Tabelas	10
Índice de Figuras	11
Índice de Gráficos	11
I - Relatório do Estágio Curricular	12
1. Descrição de atividades	12
2. Casuística.....	12
2.1. Espécie Animal.....	12
2.2. Área Clínica	13
2.2.1. Medicina Preventiva	14
2.2.2. Clínica Médica.....	14
2.2.3. Clínica Cirúrgica.....	15
2.2.4. Maneio Reprodutivo	15
II - DISSERTAÇÃO DE MESTRADO	17
1. INTRODUÇÃO	17
1.1. História de <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	17
1.2. Caracterização do agente.....	19
1.2.1. O género <i>Mycobacterium</i>	19
1.2.2. MAC – Complexo <i>Mycobacterium avium</i>	19
1.2.3. Map – <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	20
1.2.4. <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> K-10.....	21

1.2.5.	Diferentes estirpes de Map	22
1.3.	Sobrevivência no Ambiente	23
1.3.1.	Aplicação de Esterco nos Solos	23
1.3.2.	Adsorção a partículas de Solo	23
1.3.3.	Sobrevivência na Água	24
1.3.4.	Interação de Map com protozoários ambientais.....	25
1.3.5.	Biofilmes	26
1.3.6.	Estado de Dormência de Map	28
1.3.7.	Fauna Selvagem	29
1.4.	Doença de Johne's – (Paratuberculose)	30
1.5.	Impacto Económico da doença.....	31
1.6.	Transmissão	32
1.7.	Patogénese e Patogenicidade	33
1.8.	Estádios de Infecção.....	34
1.9.	Sinais Clínicos.....	35
1.10.	Efeito Iceberg	36
1.11.	Diagnóstico Laboratorial de Map	36
1.12.	Paratuberculose em pequenos ruminantes em Portugal	38
2.	ESTUDO DE PREVALÊNCIA DE PARATUBERCULOSE EM REBANHOS DE CAPRINOS DA BEIRA INTERIOR.....	38
2.2.	Material e Métodos	39
2.2.1.	Estudo Epidemiológico.....	39
2.2.2.	Seleção e caracterização das áreas de estudo	39
2.2.3.	Caracterização das explorações da região e respetivo manejo.....	39
2.2.4.	Rebanhos estudados e amostragem	40
2.2.5.	Preparação e recolha de amostras	40
2.2.6.	Seleção dos Animais da Amostra	41

2.2.7.	Teste Laboratorial	41
2.2.8.	Especificidade e sensibilidade do teste.....	41
2.2.9.	Interpretação de Resultados	41
2.2.10.	Análise Estatística	42
2.3.	Resultados.....	42
2.3.1.	Caracterização das explorações	42
2.3.2.	Rastreio Sero-epidemiológico – Detecção de doença	43
2.3.3.	Relação entre a doença e o tamanho do efetivo	44
2.3.4.	Quantidade de Amostras Positivas por Amostra	46
2.3.5.	Distribuição por raça	46
2.3.6.	Relação entre a raça e a % de anticorpos	48
2.3.7.	Relação entre tamanho de efetivo e % anticorpos	50
2.4.	Discussão	51
3.	EFICIÊNCIA DO DIAGNÓSTICO DE PARATUBERCULOSE COM BASE NO HISTORIAL CLÍNICO E EPIDEMIOLÓGICO	55
3.1.	Objetivos	55
3.2.	Material e Métodos	55
3.2.1.	Estudo Epidemiológico.....	55
3.2.2.	Caraterização da Amostra.....	55
3.2.3.	Seleção de Explorações para amostra.....	55
3.2.4.	Seleção de Animais para Amostragem	56
3.2.5.	Teste Laboratorial	56
3.2.6.	Especificidade e sensibilidade do teste.....	56
3.2.7.	Interpretação de Resultados	56
3.2.8.	Análise Estatística.....	57
3.3.	Resultados.....	57
3.4.	Discussão	59

4. CONCLUSÃO.....	60
5. BIBLIOGRAFIA	62

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Contabilização do número total de animais intervencionadas durante o estágio	13
Tabela 2 - Diversidade de áreas clínicas abrangidas pelo estágio e respectivas contabilizações.	13
Tabela 3 - Diferentes áreas de Clínica Médica e respectivas intervenções.....	14
Tabela 4 - Diferentes cirurgias efetuadas e respectivas contabilizações.....	15
Tabela 5 - Número de intervenções de Maneio Reprodutivo realizadas e respetiva distribuição por espécies.....	16
Tabela 6 - Distribuição das explorações por classes de tamanho de efetivo.....	43
Tabela 7 - Classificação das explorações de acordo com o resultado laboratorial.....	43
Tabela 8 - Distribuição das classes de explorações em função do resultado serológico.....	44
Tabela 9 - Resultado Laboratorial em função do efetivo.	45
Tabela 10 - Número de soros positivos na exploração #16.....	46
Tabela 11 - Distribuição das explorações pelas diferentes raças e o resultado obtido no teste de pesquisa de anticorpos anti-Map.	47
Tabela 12 - Distribuição das explorações por raças com resultado positivo no teste de pesquisa de anticorpos anti-Map.	47
Tabela 13 - Explorações que apresentavam sintomatologia clínica e/ou historial clínico compatível com Paratuberculose e o resultado laboratorial na pesquisa da doença.	58

Índice de Figuras

Figura 1 - Representação circular do genoma de Map K10 (adaptado de (Li <i>et al.</i> , 2005)	21
Figura 2 - Adaptado de Magombedzel <i>et al.</i> , (2016).....	36
Figura 3 - Durante uma necropsia é detetada a presença de linfonodos mesentéricos edemaciados.....	58
Figura 4 - Demonstração um caprino de raça Charnequeira com edema submandibular, sendo uma consequência da emaciação.....	58

Índice de Gráficos

Gráfico 1 - Tamanho do efetivo das explorações pertencentes à amostra.....	42
Gráfico 2 - Proporção de explorações positivas e negativas na amostra de acordo com os resultados laboratoriais	44
Gráfico 3 - Distribuição das explorações positivas e negativas no teste ELISA em função da sua classe de tamanho de efetivo.....	45
Gráfico 4 - Relação entre as diferentes raças de caprinos e o resultado no teste ELISA.	48
Gráfico 5 - Relação entre as raças de caprinos Autóctones portuguesas e as consideradas exóticas e os resultados no teste ELISA nestes dois grupos.....	48
Gráfico 6 - Variação da percentagem de anticorpos na amostra individual positiva e a raça ..	49
Gráfico 7 - Percentagens de anticorpos obtidos nas duas classes de raças de caprinos	49
Gráfico 8 - Valores de percentagem de anticorpos de amostras individuais positivas em função da classe de tamanho de efetivo.	50

I - Relatório do Estágio Curricular

O relatório tem como finalidade descrever as atividades desenvolvidas durante o período de estágio curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Foi realizado na Socivet por um período de 6 meses compreendidos entre outubro e março de 2019 sob orientação do Dr. Álvaro Lopes.

O estágio compreendeu atividades nas áreas de clínica médica e cirúrgica e, maioritariamente medicina preventiva mediante atividades de sanidade animal inerentes a programas nacionais de erradicação de doenças infecciosas.

1. Descrição de atividades

No decorrer do estágio, durante a clínica de campo acompanhei consultas de clínica médica, clínica cirúrgica, medicina preventiva, manejo de reprodução e ainda de consultoria.

Ao longo do estágio consegui adquirir e desenvolver os meus conhecimentos a nível de trabalho de equipa, raciocínio clínico, técnicas de condução e contenção dos animais e técnicas de comunicação com proprietários. A clínica cirúrgica, por vezes conjugada com a medicina de urgência permitiu-me adquirir conhecimentos na elaboração e execução de protocolos anestésicos bem como de toda a preparação do material, campo e técnica cirúrgica.

No âmbito de consultoria, tive a oportunidade de adquirir conhecimentos sobre os diversos tipos e deficiências dos estábulos das explorações, manejo alimentar e reprodutivo, assim como o devido aconselhamento para as respetivas adversidades.

2. Casuística

Os resultados estatísticos da atividade do estágio curricular serão apresentados em frequência absoluta (F_A), número total de casos observados e em frequência relativa (F_R), comparação dos casos assistidos e o total de casos, sob a forma de percentagem calculada com a fórmula: $F_R = (F_A / F_{A_{total}} \times 100)$.

2.1. Espécie Animal

As espécies de ruminantes foram as predominantes em todo o estágio.

A tabela seguinte apresenta os animais observados durante o estágio durante procedimentos sanitários, procedimentos clínicos médicos, cirúrgicos e manejo reprodutivo.

Tabela 1 - Contabilização do número total de animais intervencionados durante o estágio.

Espécie	FA	Fr
Bovinos	9340	12,63%
Ovinos/Caprinos	57325	86,82%
Equinos	24	0,04%
Suínos	340	0,51%
Total	66029	100%

Os pequenos ruminantes apresentam-se como a espécie predominante em frequência absoluta uma vez que a sua presença é substancialmente superior na área onde foi realizado o estágio.

2.2. Área Clínica

De todas as atividades clínicas realizadas, de acordo com a tabela 2, a área com maior destaque em número de intervenções durante o estágio curricular foi a medicina preventiva (57,4%), seguindo-se a área da clínica médica (19,2%).

Tabela 2 - Diversidade de áreas clínicas abrangidas pelo estágio e respetivas contabilizações.

Clínica	FA(atos)	Total
Medicina Preventiva	194	57,4%
Clínica Médica	65	19,2%
Clínica Cirúrgica	26	7,8%
Manejo Reprodutivo	39	11,5%
Inspeção inicial de Caça	14	4,1%
Maior		
Total	338	100%

2.2.1. Medicina Preventiva

De todas as áreas abrangidas pelo estágio curricular, esta foi a que apresentou maior expressividade. Revela-se uma atividade fundamental na manutenção da saúde dos efetivos, garantindo por isso um escudo protetor para a saúde pública. Este grupo engloba procedimentos de imunoprofilaxia, desparasitação e identificação.

Foram desenvolvidas atividades sanitárias no âmbito de programas de erradicação e vigilância de doenças tais como: brucelose e tuberculose bovina, brucelose em pequenos ruminantes, língua azul, doença de Aujeszky.

A caça maior apresentou-se também como uma área de intervenção, uma vez que a área do estágio integra uma das áreas geográficas de vigilância de tuberculose em caça maior, onde pode realizar exame iniciais de carcaças de caça.

2.2.2. Clínica Médica

Relativamente à medicina interna de grandes animais, as intervenções que apresentaram maior representatividade foram as Necropsias, totalizando uns representativos 41,5% dos atos, seguido das Doença Infeciosas e Parasitárias que representaram 38,4% das intervenções. Destas destacam-se as hemoparasitoses e os parasitas gastrointestinais com elevada representatividade essencialmente nos animais em regime extensivo.

De entre todas, os bovinos foram a espécie com maior representatividade com 58% das intervenções.

Tabela 3 - Diferentes áreas de Clínica Médica e respetivas intervenções.

Clínica Médica	Bovino	Ovino	Caprino	Equino	Suíno	FA	Total
Doenças Infeciosas e Parasitárias	17	5	3	0	0	25	38,4%
Pneumologia	6	2	0	0	0	8	12,3%
Ortopedia e Musculosquelética	4	0	0	1	0	5	7,8%
Necropsias	11	9	5	2	0	27	41,5%
Total	38	16	8	3	0	65	100%

2.2.3. Clínica Cirúrgica

Em clínica cirúrgica, a castração em equinos, com 30,8% apresenta-se como a cirurgia com maior representatividade. Seguida pela cesariana em bovinos com 19,2%.

Também aqui, os bovinos surgem com a maior representatividade na categoria de intervenção cirúrgica por espécie, totalizando 50% das intervenções.

Tabela 4 - Diferentes cirurgias efetuadas e respetivas contabilizações.

Clínica Cirúrgica	Bovino	Ovino	Caprino	Equino	Suíno	FA	Total
Castração	0	0	0	8	0	8	30,8%
Cesariana	5	0	0	0	0	5	19,2%
DAE	4	0	0	0	0	4	15,4%
DAD	1	0	0	0	0	1	3,8%
Encerramento de feridas	0	2	0	2	0	4	15,4%
Prolapso Uterino	3	1	0	0	0	4	15,4%
Total	13	3	0	10	0	26	100%

2.2.4. Maneio Reprodutivo

Durante o período do estágio tive a oportunidade de realizar protocolos reprodutivos. Neles estão englobados protocolos de sincronização deaios (38,5%) para posterior cobertura natural, como aconteceu em ovinos, ou inseminação artificial no caso dos bovinos.

O diagnóstico de gestação mediante ecografia apresentou-se como a atividade relacionada com o maneio reprodutivo com maior representatividade com 61,5% das intervenções.

Nesta categoria de intervenção, os ovinos surgem como espécie predominante com 53,8% das intervenções.

Tabela 5 - Número de intervenções de Maneio Reprodutivo realizadas e respetiva distribuição por espécies.

Maneio reprodutivo	Bovino	Ovino	Caprino	Equino	Suíno	FA	Total
Sincronização de cios	5	10	0	0	0	15	38,5%
Diagnóstico de gestação	9	11	1	3	0	24	61,5%
Total	14	21	1	3	0	39	100%

II - DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

1. INTRODUÇÃO

Sendo a Paratuberculose uma importante doença infecciosa, particularmente nas espécies de ruminantes com importantes impactos económicos e impactos na saúde animal, trata-se por isso de uma doença cujo controlo é fundamental.

As suas sublimes capacidades de sobrevivência fora do seu microbiótoto ideal constituem uma dificuldade acrescida no controlo da disseminação do agente.

Os longos períodos subclínicos e importantes afeções entéricas, contudo algo inespecíficas, fazem da doença uma doença subvalorizada.

Esta trabalho pretende demonstrar a importância da doença particularmente em espécies de pequenos ruminantes bem como a importância do seu controlo.

1.1. História de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

Em 1820, foi verificado um aumento de frequência de uma doença intestinal debilitante em bovinos. Durante várias décadas, a doença permaneceu no grupo de doenças por caracterizar. Foi finalmente descrita em 1894 pelos Drs. Albert John e Langdon Frothingham em Dresden, na Alemanha. (John's Information Center 2019)

Dadas as lesões observadas e a abundância de bacilos álcool-acido-resistentes o diagnóstico mais provável seria tuberculose intestinal, porém no teste de cultura o resultado foi negativo assim como no teste de intradermotuberculinização, refutando por isso a hipótese de tuberculose como causa. (John's Information Center 2019)

Anos mais tarde, após realização do teste de intradermotuberculinização comparada em animais infetados, o Prof. Oluf Bang constatou que estes apresentavam resposta deficiente à tuberculina mamífera e uma resposta exacerbada à tuberculina aviária. Com base neste facto, sugeriu que a intradermotuberculinização com tuberculina aviária, poderia ser utilizada como meio de diagnóstico, o que acabou por ser confirmado anos mais tarde. Contudo, o fator de confusão persistia, apesar de se manter a suspeita de que haveria envolvimento do *Mycobacterium avium* no desenvolvimento de doença, porém persistia a incapacidade de cultivar o agente em laboratório. (John's Information Center 2019)

Em 1910, acidentalmente, o cientista britânico Frederick Twort foi responsável pelo isolamento da bactéria causadora da Paratuberculose. Este investigador observou o

crescimento de colônias de dimensões reduzidas em redor de colônias de bactérias de dimensões maiores, como que usufruindo de uma relação simbiótica. As colônias maiores, colônias antigas que se preparava para descartar, eram resultantes da contaminação com bacilos do feno, *Mycobacterium phlei*. (Johne's Information Center 2019)

Após a descoberta concreta do agente etiológico da Doença de Johne's, foram obtidos antigénios para a injeção intradérmica ao qual foi atribuído o nome de johnina, para diagnosticar a doença assim como a realização de ensaios imunológicos para deteção de anticorpos no soro e também diagnosticar a doença. (Johne's Information Center 2019)

Após diversas tentativas, Valle e Rinjard equacionaram a injeção do agente por via subcutânea como medida de controlo, funcionando como vacina. Em 1923, a primeira edição de "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", (na época, considerada "a Bíblia" das bactérias), denominou oficialmente o agente de *Mycobacterium paratuberculosis* como agente causador da Doença de Johne's. (Johne's Information Center 2019)

Com o avanço da ciência foi possível o aperfeiçoamento de técnicas de estudo do material genético. Isto possibilitou a identificação de uma sequência única de nucleótidos no material genético de *M. paratuberculosis*. Esta sequência repete-se diversas vezes entre toda a cadeia de ADN do agente. Foi denominada de IS900, a primeira Sequência de Inserção detetada em micobactérias. Nesta descoberta, realizada em 1989, participaram Des Collins na Nova Zelândia e J. McFadden e a sua equipa em Inglaterra. Esta descoberta permitiu contornar a barreira imposta pela morosidade do processo de cultura do agente que até aí era o único método de diagnóstico do agente. (Johne's Information Center 2019)

Em 1990, Marie-Françoise Thorel, após o uso de taxonomia numérica para avaliar as semelhanças entre micobactérias dependentes da micobactina, propôs a alteração do nome do agente para *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map), nome este que se mantém. (Johne's Information Center (2019)

Em 2005, foi descrita toda a sequência genómica de Map K10, proveniente de um bovino, isolada ainda na década de 1990. Caracteriza-se por ser um genoma circular composto por 4 587 genes e um total de 4 829 781 genes. (Johne's Information Center 2019); Li et al., 2005)

1.2. Caracterização do agente

1.2.1. O género *Mycobacterium*

Como agente causador de Paratuberculose, comumente conhecida como Doença de Johne's é o *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Este microrganismo pertencente ao género *Mycobacterium*, integrando a família *Mycobacteriaceae*, que por sua vez integra a ordem *Actinomycetales*. (Balows *et al.*, 1991; Van Metre *et al.*, 2008)

O género *Mycobacterium* subdivide-se em dois complexos distintos, dos quais o complexo *Mycobacterium tuberculosis* e o complexo *Mycobacterium avium*, no qual Map se integra. (Thorel *et al.*, 1990; Harris & Barletta, 2001)

As micobactérias apresentam morfologia de bastonete, com uma largura compreendida entre 0,2 e 0,6 µm e um comprimento entre 1,0 e 10 µm, podendo ser moderadamente encurvados ou simplesmente retilíneos, imóveis, não capsuladas e não esporulados. (Madigan *et al.*, 2009; Johnson & Odell, 2014)

A sua parede celular é espessa, com elevada presença de lípidos e ácidos micólicos (Liu *et al.*, 1996), sendo o interior basal maioritariamente constituída por peptidoglicano e a exterior lipofílica (Schorey & Sweet, 2008). Estas características da parede celular, tornam as micobactérias impermeáveis aos nutrientes hidrofílicos, conferindo também alguma resistência a metais pesados, antibióticos e desinfetantes, capacitando-as para formar reservatórios. (Johnson & Odell, 2014)

Apresentam-se como bactérias Gram-positivas, vulgarmente caracterizadas como “bacilos álcool-acido resistentes”. (Liu *et al.*, 1996)

São frequentemente aeróbias, variando com a espécie, e apresentam uma temperatura de crescimento ótimo compreendida entre 25°C e 45°C. (Thorel *et al.*, 1990)

1.2.2. MAC – Complexo *Mycobacterium avium*

O complexo *Mycobacterium avium* integra o grupo das Micobactérias Não-Tuberculosas (Thorel *et al.*, 1990; Balows *et al.*, 1991; González-Pérez *et al.*, 2013)

Este complexo subdivide-se em duas espécies: *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium intracellulare*. (González-Pérez *et al.*, 2013)

Com base em dados relativos aos seus perfis genético e fenotípico, características de crescimento, composição bioquímica, *M. avium* subdivide-se nas seguintes subespécies: *M.*

avium subsp. *paratuberculosis*, *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *hominissuis*, e *M. avium* subsp. *silvaticum*. (Turenne *et al.*, 2008; Agdestein *et al.*, 2014)

1.2.3. Map – *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (Map), integrante do complexo *Mycobacterium avium*, classifica-se como uma micobactéria de crescimento lento e dada a sua necessidade de colonizar um hospedeiro, classifica-se por isso como um tipo de microrganismo intracelular obrigatório. (Thorel *et al.*, 1990; Cayrou *et al.*, 2010)

Map é uma das micobactérias de tamanho mais reduzido, apresentando dimensões de 0,5 µm de largura e 1,5 µm de comprimento, sendo por isso um bacilo fino, encontrando-se geralmente em aglomerados celulares. (Salem *et al.*, 2013)

Partilhando das características comuns das outras micobactérias, é um Gram-positivo, provido de uma parede celular capaz de conferir proteção (Hett & Rubin, 2008), através de uma elevada impermeabilidade, valores baixos de pH e possibilidade de sobrevivência a estímulos ambientais adversos (Stevenson, 2010), considerada como uma das micobactérias mais resistentes a temperaturas elevadas. (Grant *et al.*, 2002)

O microrganismo caracteriza-se por ser um “bacilo álcool-acido resistente” pelo facto da sua resistência e não descorar com ação de álcool ou ácidos fortes. (Lombard, 2011; Olsen *et al.*, 2010)

Como característica principal que distingue Map de outras micobactérias, é o facto de este ser dependente da micobactina, um importante sideróforo no transporte de ferro para o interior das células, elemento essencial na manutenção da replicação do microrganismo. (Buergelt *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2005) Este facto explica a necessidade de Map em habitar o meio intracelular do seu hospedeiro, como forma de encontrar uma maior disponibilidade de ferro. (Lombard, 2011)

Apresenta um crescimento muito lento, podendo levar entre 5 e 16 semanas a desenvolver-se. As suas colónias são de tamanho reduzido, com forma de hemisférica, apresentando tamanhos inferiores a 1mm de diâmetro. São usualmente despigmentadas, podendo esporadicamente apresentar pigmento. (Quinn *et al.*, 2011)

1.2.4. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* K-10

O ADN de Map apresenta um genoma circular, assemelhando-se em cerca de 99% com o ADN de *Mycobacterium avium*. Como tal, expressa um teor em guanina+citosina a rondar os 69,3%. (Li *et al.*, 2005)

O genoma de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* K-10 foi completamente sequenciado, da qual resultam 4 829 781 pares de bases, 4 350 Fases de Leitura Aberta, 45 tRNA e um rRNA operão. (Li *et al.*, 2005)

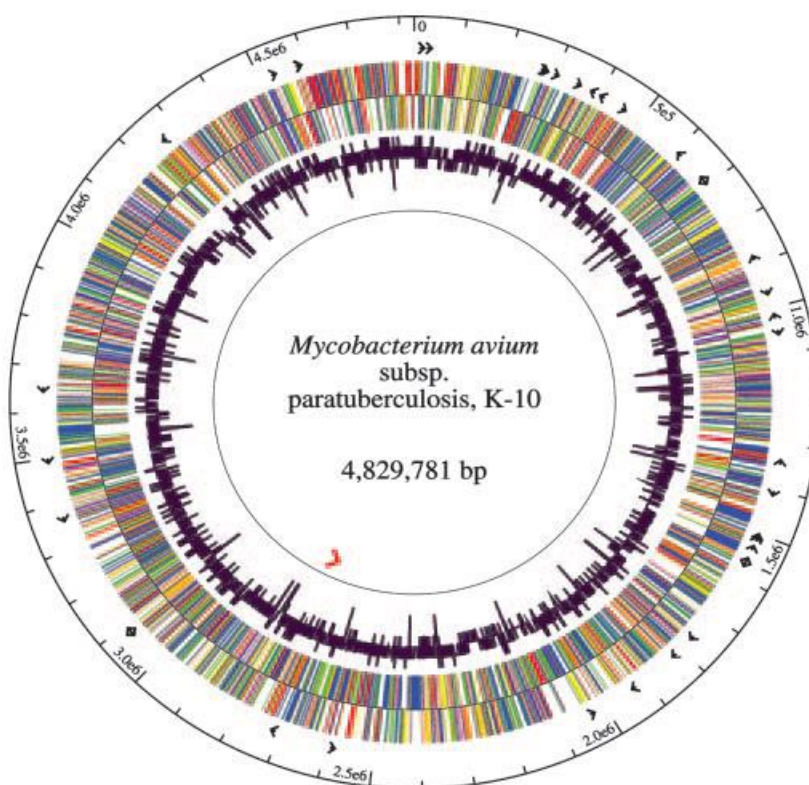


Figura 1 - Representação circular do genoma de Map K-10 (adaptado de Li *et al.*, 2005)

Na presente sequenciação de material genético, encontram-se presentes múltiplas Sequência de Inserção que se repetem ao longo de todo o genoma. Totalizam-se 19 diferentes Sequências de Inserção, traduzindo-se em 58 cópias ao longo do genoma. (Li *et al.*, 2005) Destas destaca-se a Sequência de Inserção IS900 da qual se encontram presentes 17 cópias, IS1311 com 7 cópias, ISMav2 com 3 copias (Li *et al.*, 2005), ISMap02 com 6 cópias (Stabel &

Bannantine, 2005) e uma cópia do fragmento f57 do gene *MAP0865*. (Coetsier *et al.*, 2000; Tasara & Stephan, 2005)

1.2.5. Diferentes estirpes de Map

Relativamente as suas características de crescimento, patogenicidade e hospedeiro preferencial, Map subdivide-se assim em dois grupos principais: Tipo S (I/III) e Tipo C (II). (Timms *et al.*, 2011).

O Tipo I/III ou Tipo S, referente a “Sheep”, revela-se como hospedeiro preferencial ovelhas e cabras. Contudo, esta estirpe pode também ser isolada em bovinos. (Salem *et al.*, 2012). É uma das estirpes de isolamento mais complexo. Das duas estirpes, esta é a que tem um crescimento mais lento, podendo levar entre 16 e 52 semanas a produzir colónias viáveis. As suas colónias são usualmente pigmentadas, podendo variar entre a pigmentação branca ou amarela. (Stevensen, 2015).

O Tipo I e Tipo III, encontra-se assim de forma conjunta uma vez que o Tipo III revela-se um tipo intermédio (de Juan *et al.*, 2005; The Center for Food Security & Public Health 2017), apresentando-se como um subtipo do Tipo I. (Whittington *et al.*, 2001;Stevensen, 2015; The Center for Food Security & Public Health 2017)

O Tipo II ou Tipo C, remetendo para “Cattle” apresenta-se como o mais comum de todos. Apresenta uma amplitude muito superior de hospedeiros, não apresentando um preferencial. Podem variar entre animais de produção, animais selvagens e a espécie humana. O seu isolamento revela-se facilitado em comparação com o outro tipo. Leva entre 4 e 6 semanas a produzir colónias viáveis. (Stevensen, 2015)

O tipo B ou Tipo Bisonte, foi descoberto mais recentemente. Este também pode ser isolado de diferentes hospedeiros nos EUA, no entanto apresenta diferenças do Tipo S e do Tipo C. Apresenta um tempo de isolamento intermédio, em comparação com os dois outros tipos, necessitando de cerca de 18 a 20 semanas para formar colónias (Whittington *et al.*, 2001). Mais tarde, após sequenciação do genoma, classificou-se como um subtipo do Tipo II. (Bryant *et al.*, 2015; Stevensen, 2015). Por sua vez, este subtipo, apresentou discrepâncias nos genótipos isolados na Índia e nos EUA, dividindo assim este Tipo em duas sub-linhagens. (Stevensen, 2015)

1.3. Sobrevivência no Ambiente

1.3.1. Aplicação de Esterco nos Solos

Com a intensificação da agricultura, a adubação dos solos tornou-se numa prática comum. (Salgado *et al.*, 2011; Salgado *et al.*, 2015). Dada a sua disponibilidade, o esterco proveniente da indústria pecuária, é um valioso subproduto capaz de aportar às terras de cultivo e pastoreio elevadas quantidades de fósforo, nitrogénio e potássio. (Salgado *et al.*, 2011; Salgado *et al.*, 2013; Salgado *et al.*, 2015)

Por outro lado, o uso de esterco como fertilizante, apresenta-se também, como um fator de risco devido ao facto do elevado conteúdo em microrganismos patogénicos. O *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* não é exceção. (Salgado *et al.*, 2011; Salgado *et al.*, 2013; Salgado *et al.*, 2015)

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* apresenta uma maior afinidade de permanência nas camadas superiores do solo bem como uma associação significativa da sua presença no coberto vegetal após aplicação de esterco contaminado. (Salgado *et al.*, 2011). Com a recorrência desta prática agrícola, o Map, tem a capacidade de permanecer no solo em maior quantidade, tornando-se um maior de risco de contaminação dos animais que realizem pastoreio nessas áreas. (Salgado *et al.*, 2011; Salgado *et al.*, 2015)

Em contrapartida, aquando da incorporação do esterco no solo, durante a prática agrícola, o Map perde a sua viabilidade entre 90 e 99%. Este facto deve-se, provavelmente à ligação do agente a partículas do solo. (Whittington *et al.*, 2003)

1.3.2. Adsorção a partículas de Solo

Sendo a excreção de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* efetuada através das fezes, e o seu método de transmissão mais comum ser efetuado através da via fecal-oral, tornou-se fundamental conhecer a sua permanência no ambiente após a sua excreção. (Dhand *et al.*, 2009a)

Após a excreção, a bactéria pode ficar associada a partículas de solo pelo processo de adsorção. Este mecanismo, permite com que a bactéria permaneça no ambiente, essencialmente nas camadas superiores do solo, por períodos prolongados, agilizandoo desta forma o alcance do seu microbiótopo ideal. (Dhand *et al.*, 2009a)

A sua permanência em camadas superiores do solo, camadas essas onde também se encontra o pasto, consumido pelos ruminantes. Particularmente os pequenos ruminantes, capazes efectuar um pastoreio mais próximo do solo, podendo chegar a ingerir cerca de 100g de solo por dia, podendo mesmo ser cerca de 300g durante períodos em que o solo esteja com elevada percentagem de água. (Dhand *et al.*, 2009a)

Foi considerada a hipótese da relação entre a Doença de Johne's e as características do solo. Tal qual como outros microrganismos, Map requer ferro para a sua replicação celular, garantindo desta forma a sua continuidade. Por outro lado, possui fraca capacidade de quelar o ferro (Fe). O carácter ácido dos solos, traduzido por um pH baixo, permite a solubilização do Fe, facilitando por isso, o seu uso por parte de Map, agilizando a sobrevivência do agente no exterior ao seu microbiótopo predileto. (Dhand *et al.*, 2009b)

Dhand *et al.*, (2009a) levaram a cabo um estudo experimental para avaliar a adsorção de Map em diferentes tipos de solo e diferentes valores de pH. Os resultados demonstraram que a retenção do microrganismo foi maior em solos do tipo argiloso, apresentando a mesma correlação com pH's ácidos, principalmente em pH de valor 6 e 7.

Map apresenta também capacidade de permanecer em outros substratos ambientais. Apresenta sobrevivências superiores as 55 semanas no solo, superiores a 24 semanas em partes superiores de plantas e superiores a 48 semanas na água. (Reis, 2015)

1.3.3. Sobrevivência na Água

Não sendo exceção, Map, integrante do complexo *M. avium*, é capacitada de uma fácil adaptação aos ecossistemas aquáticos, não só de água doce e salgada, mas também de solos alagados. (Whittington *et al.*, 2005)

Especialmente em regime extensivo, o abeberamento dos animais realiza-se, de forma geral através do uso de reservatórios naturais. Inevitavelmente, durante o abeberamento dá-se a contaminação das águas com fezes. Este facto faz com que, a água se torne num reservatório do agente, tornando-se assim numa fonte de dispersão da doença. (Whittington *et al.*, 2005)

Estudos realizados, nomeadamente a cadeia observada em gado bovino e água engarrafada concluíram que Map poderia sobreviver entre 6 e 18 meses em água proveniente de lagoas ou mesmo em água da torneia engarrafada enquanto que, em água destilada engarrafada poderia sobreviver até 15 meses. (Whittington *et al.*, 2005)

Whittington *et al.*, (2005) comprovou que a sobrevivência de Map em ambiente aquático é influenciada pela temperatura a que está exposto, bem como a variação da mesma. Foi

comprovado que o Map sobreviveu 48 semanas em ambiente aquático, num bebedouro natural, disposto á sombra (temperaturas variaram entre 7 e 28°C) enquanto que, no mesmo ambiente, mas desprovido de sombra (temperaturas variaram entre 5 e 40°C), apenas sobreviveu durante 36 semanas. Neste estudo, foi também estudada a sobrevivência do agente nos sedimentos presentes nos reservatórios de água naturais onde foi possível observar uma sobrevivência nos sedimentos de mais 3 meses aos verificados em suspensão na água.

A sombra, fator condicionante da temperatura a que se encontra exposto o microrganismo, pode então ser classificada como um fator que favorece a sobrevivência no meio ambiente. (Whittington *et al.*, 2004)

A sua adaptação com maior facilidade aos sedimentos dos reservatórios de água naturais revela-se num problema acrescido na eliminação do agente. Com a perturbação da estabilidade de deposição dos sedimentos, seja provocada por anos de seca, que provocam a descida do nível da água, facilitando a movimentação dos sedimentos por parte dos animais com os seus membros durante o abeberamento ou pela transferência de água de um reservatório natural para um bebedouro artificial, a presença de Map pode ser restabelecida na água, aumentando por isso a chance de ser ingerido pelo animal. (Whittington *et al.*, 2005)

A possibilidade de aerossolização foi também equacionada, havendo a possibilidade de Map se concentrar em bolhas de ar presentes na água e ser desta forma ejetado da interface água-ar através da formação de aerossóis tal como outras micobactérias constituintes do complexo *Mycobacterium avium*. Este mecanismo possibilita alargar as vias de infeção providas pela água, permitindo por isso também a infeção por inalação. A dispersão para outros meios, como por exemplo a pastagem mais próxima do aquífero fica também facilitada. (Whittington *et al.*, 2005)

A presença de cursos de água pode ser considerada também um fator de risco para a dispersão da doença, atuando como um veículo de transporte do agente, mediado pela escorrência de água contaminada com o agente. (Pickup *et al.*, 2004; Whittington *et al.*, 2005; Salgado *et al.*, 2013)

1.3.4. Interação de Map com protozoários ambientais

Uma das estratégias de sobrevivência de Map, é mediada por protozoários ambientais, geralmente existentes em grande quantidade. De entre eles destaca-se o *Acanthamoeba* spp. (Whan *et al.*, 2006)

Com os hábitos alimentares destes protozoários, geralmente bacteriófagos, Map beneficia da capacidade de sobrevivência após ingestão pelos mesmos, formando vacúolos no seu interior. (Mura *et al.*, 2005; Whan *et al.*, 2006; Samba-Louaka *et al.*, 2018). Já no interior o Map bloqueia parte dos mecanismos de acidificação levados a cabo no interior dos vacúolos, permitindo a sua sobrevivência à digestão. (Samba-Louaka *et al.*, 2018). Esta peculiaridade permite aumentar a sua longevidade. (Whan *et al.*, 2006)

A sua presença nas pastagens, ocorre essencialmente pela aplicação de esterco contaminado. Após ingestão de Map por ameboides, estes então infetados, podem atuar como um “Cavalo de Troia” na infeção de ruminantes que realizem o pastoreio em locais contaminados. (Salgado *et al.*, 2015; Samba-Louaka *et al.*, 2018)

Map, para além de apresentar capacidade de resistir ao protozoário bacteriófago, apresenta também a particularidade de se replicar no seu interior. O facto foi constado num estudo levado a cabo por Salgado *et al.*, (2015), onde se puderam efetuar contagens superiores de Map, no interior de amebas, aos encontrados no início do estudo. Sendo por isso, elevadamente sugestivo, a sua capacidade de multiplicação no interior destes protozoários. (Mura *et al.*, 2005; Whan *et al.*, 2006; Samba-Louaka *et al.*, 2018)

Durante o seu estudo, Whan *et al.* (2006) verificou que Map, com localização intracelular, em *Acanthamoeba castellanii* e *A. polyphaga* beneficiava de um escudo de proteção contra desinfeção com produtos constituídos de cloro. Observou ainda, a presença de Map, não só no interior de *Acanthamoeba castellanii* mas também na camada externa da sua dupla camada do quisto. Isto é altamente sugestivo que Map apresenta, em adição a todas as suas outras capacidades inerentes aos protozoários ambientais, a capacidade de realizar o enquistamento nos mesmos.

1.3.5. Biofilmes

Map pode ser encontrado em diversos locais do ambiente da exploração com animais infetados pelo agente. A sua associação com outros agentes microbiológicos e até mesmo a possibilidade de entrar num estado de dormência contribuem para a sua resistência. (Cook *et al.*, 2009)

A sua capacidade de formação de biofilmes foi equacionada. Estudos realizados com outros tipos de micobactérias provaram a capacidade de formação de biofilmes por parte deste tipo de bactérias. (Cook *et al.*, 2009) A formação de biofilmes fornece às bactérias constituintes condições de sobrevivência facilitadas uma vez que beneficiam de proteção da lavagem,

predação, maior facilidade de obtenção de nutrientes e proteção contra substâncias tóxicas. (Cook *et al.*, 2010)

Estes biofilmes formam-se, principalmente em bebedouros mal construídos, uma vez que estes são inevitavelmente alvos de conspurcação fecal, elevada humidade e disponibilidade de nutrientes, fatores esses favoráveis à colonização bacteriana. (Cook *et al.*, 2010)

O microrganismo, caracterizado por deter fortes cargas negativas possibilita que este beneficie das forças de atração exercidas entre o próprio microrganismos e superfícies que detenham cargas positivas, como é o caso de superfícies com cobertura de ferro, como é o caso dos bebedouros, gradeamentos, possibilitando a sua fixação. Para além disto, estas superfícies permitem também a Map usufruir de uma maior disponibilidade do elemento Ferro, que tanto necessita. (Bolster *et al.*, 2008)

Num outro estudo levado a cabo por Cook *et al.*, (2009) foi avaliada a capacidade de formação de biofilmes em ambiente de exploração. Para tal foram escolhidos materiais utilizados na construção de estruturas da exploração. Sendo os bebedouros uma das zonas suscetíveis á conspurcação fecal e caracterizados por fornecer às bactérias humidade suficiente para a formação de biofilmes e assim foram escolhidos quatro materiais utilizados no seu fabrico, por exemplo: plástico, betão, aço galvanizado e inoxidável. O agente foi inoculado nas superfícies dos materiais, que foram mantidos em condições normais da exploração. Cook *et al.*, (2009) puderam observar que as concentrações avaliadas nos materiais, betão e aço galvanizado foram as mais elevadas enquanto que nos materiais como o plástico e aço inoxidável foram as mais baixas. O tempo necessário para a redução de 99% (t_{99}) de um biofilme composto por Map foi estimado, para o plástico ser de 144 dias enquanto que para o aço inoxidável apenas 115 dias. Nos restantes materiais, aço galvanizado e betão, a redução do microrganismo não pode ser observada, pelo que o t_{99} não foi estimado.

Após 365 dias, foi realizada uma reinoculação que permitiu constatar um aumento do agente em todos os materiais, á exceção do betão. Este facto remete para a capacidade de Map integrar biofilmes de outros microrganismos já estabelecidos, podendo fazê-lo em apenas 3 dias. (Cook *et al.*, 2009)

A interação entre múltiplos microrganismos, a superfície e o ambiente de colonização revelam-se fator condicionantes para a formação de biofilmes. O Map beneficia de todas estas interações. (Cook *et al.*, 2009)

Frequentemente, os produtos à base de cloro são utilizados como material de limpeza e desinfeção dos materiais na exploração. Devido á conhecida resistência de Map a desinfetantes,

Cook *et al.*, 2010) comprovou que com a presença de cloro, a redução das concentrações de Map foi muito mais rápida, apresentando os seus melhores resultados em materiais como aço inoxidável e aço galvanizado. O t_{99} de Map do aço inoxidável foi de 16 dias, enquanto que, sem aplicação deste produto, pode demorar até 115 dias. Concluíram assim a eficácia do cloro.

Os produtos de limpeza à base de cloro, apesar de apresentarem fraca efetividade em outras bactérias constituintes de biofilmes, podem demonstrar melhores resultados quando as superfícies são limpas frequentemente. A redução de biofilmes já existentes revela-se extremamente importante, dada a capacidade de Map os integrar. (Cook *et al.*, 2010).

1.3.6. Estado de Dormência de Map

Verificado em vários estudos de pesquisa do agente em diversos meios externos ao microbiótopo ideal do agente, a discrepância entre o resultado de culturas de controlo negativas, seguido de culturas positivas, é sugestiva de uma capacidade de ingressar num estado de dormência podendo ser revertida. (Whittington *et al.*, 2004)

Este estado revela-se numa resposta a um estímulo ambiental adverso, como por exemplo, o défice de nutrientes necessários para garantir a replicação. Este estado é geneticamente programado, em que o microrganismo não necessita de realizar a replicação, podendo mais tarde ser revertido. (Whittington *et al.*, 2004)

A dormência, verificada posteriormente em outras micobactérias (*M. smegmatis*, *M. bovis* e *M. tuberculosis*) está associado à expressão de genes específicos. Posteriormente identificada em *M. smegmatis*, uma proteína semelhante a uma proteína Dps, que confere proteção através da sua ligação ao ADN em caso de stress nutricional ou oxidativa, foi também identificada, um homólogo, presente no genoma de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. (Whittington *et al.*, 2004)

O gene, *relA* presente no genoma de *M. tuberculosis*, ativo em situações de défice de aminoácidos ou fontes de carbono, também se encontra presente no genoma de Map. Contudo, o estímulo de entrada em estado de dormência não foi concretamente apurado, para além de estar fora do seu microbiótopo natural, condicionando o acesso a nutrientes. (Whittington *et al.*, 2004)

Esta capacidade de ingressar num estado de dormência, evidencia mais um obstáculo na erradicação do organismo do ambiente, podendo induzir em erro, com um resultado negativo de cultura. (Whittington *et al.*, 2004)

1.3.7. Fauna Selvagem

Dadas as suas características taxonómicas, Map apresenta capacidade de infeção de uma grande variedade de seres vivos. De entre a grande variedade, apresenta como hospedeiros principais os ruminantes, não sendo, porém, os seus únicos hospedeiros. A doença pode ser verificada em espécies ruminantes e não-ruminantes, tanto selvagens como domésticas (Diagnosis and Control of Johne's Disease.,2003).

Cerca de 75% das doenças infecciosas que afetam humanos são de origem zoonótica, sendo que a maioria tem origem na fauna selvagem, constituindo por isso, um importante reservatório de enfermidades. Esta pode constituir um vetor de transmissão de doenças tanto para o ser humano, assim como para os animais domésticos. (Rhyan & Spraker, 2010). Os aumentos verificados tanto nas atividades pecuárias, como na quantidade de espécies selvagens, particularmente nas espécies de carácter cinegético, precipitaram por isso um aumento considerável na densidade animal. O contacto entre espécies pecuárias, especialmente aquelas mantidas em regime extensivo, espécies selvagens e o homem, tornou-se praticamente inevitável. Constitui tudo isto, um fator de risco na transmissão de doenças. (Rhyan & Spraker, 2010; Barasona, 2013; Wiethoelter, 2014)

Foram efetuados estudos de pesquisa de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* em diversos animais selvagens em Portugal. O agente foi pesquisado em espécies ruminantes e não-ruminantes. De entre os quais, pôde verificar-se a presença do agente nas seguintes espécies: veado vermelho (*Cervus elaphus*), gamo (*Dama dama*) javali (*Sus scrofa*), raposa vermelha (*Vulpes vulpes*), gineta comum (*Genetta genetta*), fuinha (*Martes foina*), saca-rabos (*Herpestes ichneumon*), texugo europeu (*Meles meles*), lontra europeia (*Lutra lutra*). (Reis, 2015)

O facto de ser constatada a presença de Map em espécies selvagens de ruminantes como o veado vermelho (*Cervus elaphus*), corço (*Capreolus capreolus*) ou o gamo (*Dama dama*) sugere a existência de uma fonte de contaminação ambiental indireta como por exemplo a contaminação de fontes de água ou pastagens, onde o agente pode permanecer por longos períodos. Por outro lado, a sua deteção em animais carnívoros como a raposa vermelha (*Vulpes vulpes*) ou omnívoro como o javali (*Sus scrofa*), é sugestivo de contaminação indireta comum aos ruminantes, não só através de fontes de água contaminadas como também uma contaminação direta, através da ingestão de carcaças contaminadas. (Matos *et al.*, 2014; Reis, 2015; Matos *et al.*, 2017).

Uma vez comprovada, a presença de Map em fauna selvagem, e a sua excreção através das fezes, pode-se constatar que constitui um fator de risco para a manutenção e dispersão da bactéria nas pastagens e nas fontes de água, principalmente nas fontes de origem natural. Locais estes frequentemente coabitados em simultâneo por espécies pecuárias. (Pickup *et al.*, 2004;Reis, 2015)

Os coelhos selvagens (*Ornitulagus cunicilli*) são também considerados um elemento chave, na manutenção do agente no ambiente. (Daniels *et al.*, 2003)

1.4. Doença de Johne's – (Paratuberculose)

Paratuberculose ou Doença de Johne's, trata-se de uma doença infecciosa, que afeta essencialmente ruminantes e é provocado por uma micobactéria Não-Tuberculosa, mais especificamente o *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. (Whittington *et al.*, 2019)

Inicialmente, o processo da doença inicia-se com uma infeção localizada progredindo para uma infeção sistémica. (Whittington *et al.*, 2019)

A doença infecciosa resulta numa enterite granulomatosa crónica, resultando numa perda de peso progressiva, ocorrendo diarreias, podendo mesmo, conduzir à morte. (Whittington *et al.*, 2019).

Map causa uma reação inflamatória e, retira funcionalidade à parede intestinal através do aumento da sua espessura e edema, reduzindo a absorção de proteínas e nutrientes. As lesões intestinais manifestam-se essencialmente no jejuno e no íleo, bem como na junção ileocecal. Os linfonodos apresentam-se frequentemente aumentados e edematosos. (Garcia & Shalloo, 2015)

É uma doença com um impacto económico tanto direto, como por exemplo a mortalidade, como indireto, inerente às perdas de peso progressivas ou quebras na produção. Para além disso tem um importante impacto para o bem-estar animal, levantando também algumas questões supostamente relacionadas com a saúde pública. (The Center for Food Security and Public Health ,2017)

Atualmente, é uma doença bastante comum em animais de produção, onde se podem verificar prevalências crescentes ao longo do tempo. (The Center for Food Security & Public Health, 2017)

Uma vez que se trata de uma doença ubiqüitária, com períodos de incubação alargados e apresentar sinais clínicos inespecíficos, é uma doença muito difícil de controlar. (Whittington *et al.*, 2019)

1.5. Impacto Económico da doença

Uma vez que a doença, afeta principalmente ruminantes, inevitavelmente, tem um impacto económico associado a produção pecuária, sendo fundamental o controlo da doença.

As perdas podem ser variadas, desde redução na produção de leite, aumento da contagem de células somáticas, incremento da gravidade de mastites, redução da fertilidade (Garcia & Shalloo, 2015; Whittington *et al.*, 2019), custos com a reposição de efetivos (Garcia & Shalloo, 2015) são problemas com um elevado impacto económico.

Como é uma doença que induz uma perda de peso gradual, provoca uma diminuição da eficiência dos critérios zootécnicos das explorações, levando ao aumento da taxa de refugo e de mortalidade. A perda de peso gradual e acentuada pode conduzir à subvalorização de carcaças em matadouro e levar à sua reprovação. (Garcia & Shalloo, 2015; Whittington *et al.*, 2019).

A presença da Doença de Johnes aumenta consequentemente a suscetibilidade a outras doenças ou condições. (Garcia & Shalloo, 2015; Whittington *et al.*, 2019).

No entanto, de entre todas estas perdas económicas associadas à produção, a que mais levanta preocupação é a sua possível implicação na saúde pública. Um consumidor de produtos de origem animal “mais preocupado”, com doenças infecciosas que possam vir a ser transmitidas através destes produtos, pode tomar a decisão de se abster de os consumir (Whittington *et al.*, 2019).

De entre os diversos setores afetados, em primeiro lugar surgem os impactos económicos, sejam eles diretos como por exemplo a mortalidade de animais, ou indiretos como a incidência de mastites ou a redução de fertilidade. (Whittington *et al.*, 2019). Num estudo realizado por Sardaro *et al.*, (2017) em Itália, demonstrou-se uma diminuição da eficiência lucrativa de 84% a 64% em explorações leiteiras de ovinos e caprinos.

Outro dos setores potencialmente em risco é o setor da saúde pública. Não podendo ser ignorados, os riscos de exposição existem (Whittington *et al.*, 2019), como por exemplo o leite proveniente de animais infetados, quando consumido sem qualquer tratamento ou mesmo após o processo de pasteurização do leite. (Chaubey *et al.*, 2017; Zarei-Kordshouli *et*

al., 2019) Apesar de o agente ter sido isolado em humanos com Doença de Crohn, doença esta que se apresenta como uma doença com etiologia multifatorial, a presença de Map não pode ser considerada causal. (McNees *et al.*, 2015; Zarei-Kordshouli *et al.*, 2019; Whittington *et al.*, 2019)

Apesar de haver mais setores envolvidos, as perdas económicas são o fator chave para o desenvolvimento de programas de controlo de Map. (Whittington *et al.*, 2019)

1.6. Transmissão

A principal via de entrada do agente no organismo é a via fecal-oral. Pode dar-se através de uma série de produtos, como leite, alimentos ou água contaminada com fezes contendo Map. (Corbett *et al.*, 2017)

Apesar da excreção ser principalmente por via fecal, pode ocorrer de outras formas. Isto pode acontecer em estágios de infeção mais avançados, onde a excreção pode ser pelo leite ou colostro, saliva, fluidos uterinos e sémen. A transmissão através de aerossóis foi também confirmada. (Garcia & Shalloo, 2015; Corbett *et al.*, 2017)

A contaminação em bovinos ocorre de forma mais frequente durante os primeiros meses de vida (primeiros 6 meses), momento em que apresentam ainda um sistema imunitário mais débil, tornando os neonatos mais suscetíveis (Garcia & Shalloo, 2015). Nesta fase, a contaminação ocorre através do leite/colostro ou mesmo pela contaminação fecal do úbere. (Sonawane & Tripathi, 2018)

Em bovinos, a excreção aparenta ser superior em animais com afeções clínicas que em animais assintomáticos. Esta apresenta a sua taxa mais alta nos primeiros dois meses de lactação. (The Center for Food Security & Public Health.,2017) A excreção é predominantemente pelas fezes. Após o início da mesma, a resposta imunitária humoral sofre um incremento proporcional. (van Schaik *et al.*, 2003; Beaver *et al.*, 2017)

A manifestação de sinais clínicos pode levar anos, no entanto, a excreção pode ocorrer pouco tempo após o momento da infeção (Corbett *et al.*, 2017). Contudo a infeção subclínica, só por si, afeta o animal de forma suficiente para alterar o seu bem-estar, saúde e produtividade (Garcia & Shalloo, 2015)

1.7. Patogénese e Patogenicidade

Map classifica-se como um patógeno intracelular obrigatório. A sua entrada é traduzida numa série de reações mediadas por células, responsáveis pela maioria das lesões entéricas. (Quinn *et al.*, 2011)

Sendo a via de contágio mais comum, após a exposição oral Map, é então fagocitado pelas células M presentes nas placas de Peyer, presentes no íleo e jejuno. (Quinn *et al.*, 2011; Whittington *et al.*, 2019). O Map apresenta um claro tropismo para estes locais de tecido linfóide organizado na mucosa e submucosa intestinal, de forma a poder sair do lúmen intestinal do hospedeiro que está a infetar e da mesma forma poder continuar o processo de excreção através de fezes. (Whittington *et al.*, 2019)

Após atravessar o epitélio intestinal, é fagocitado por macrófagos, ao qual o Map é capaz de resistir e replicar-se. O microrganismo é capaz de interferir no processo de maturação do fagossoma e no processo de fusão entre o fagossoma e lisossomas garantindo assim a sua sobrevivência intracelular. (Quinn *et al.*, 2011)

Com a progressão da doença pode verificar-se uma acumulação de linfócitos e macrófagos na lâmina própria, havendo também uma reação granulomatosa imunomediada. As lesões resultantes afetam a integridade entérica, conduzindo a uma perda progressiva de proteínas plasmáticas, dificuldade de absorção de nutrientes e de água. (Quinn *et al.*, 2011)

Após a fase de entrada da micobactéria, esta pode ser encontrada em elevada quantidade nos macrófagos presentes na parede intestinal e nos linfonodos regionais. (Quinn *et al.*, 2011)

Dependendo da progressão da doença, podem ser identificadas diferentes indicadores, nomeadamente a elevada expressão de IL-10 detetada em lesões patológicas bastantes extensas ou em elevada presença da bactéria. Por outro lado, em doenças subclínicas, onde não há lesões ou sinais evidentes, γ -INF foi detetado em maioria. (Quinn *et al.*, 2011)

Após infetados, os macrófagos, induzem a resposta de células T específicas, que por sua vez, induzem a proliferação de células T- *helper*, células T-supressoras e células T-citotóxicas. De entre estas, destacam-se T_{H1} e T_{H2}, sendo estes, dois subconjuntos de células T-*helper* (Buergelt *et al.*, 2004). Ambas correlacionadas com a cronologia da doença, T_{H1} é predominante no início da infeção, ainda quando a doença é subclínica enquanto que T_{H2} apresenta uma resposta mais expressiva durante a fase clínica da doença. (Quinn *et al.*, 2011)

Sendo a Doença de Johne's uma doença intermitente, onde pode haver períodos imunitários mais eficientes por parte do organismo, em que este consegue resistir mediante

imunidade celular, e outros, por sua vez menos capazes, em que o hospedeiro apresenta baixa resistência ao agente, mediando por isso, a sua resposta através de imunidade humoral. Sendo esta imunidade individual em parte dependente de fatores extrínsecos, a expressão da Doença de Johnes é, por isso, dependente do estado imunológico do organismo que afeta, sendo traduzida em períodos de remissão e períodos de exacerbação. (Buergelt *et al.*, 2004)

A imunidade celular ocorre especialmente no início da infecção, perdendo-se com a progressão da doença para o seu estado clínico. Quando lisados os macrófagos, permitindo ao Map a saída do interior celular. (Buergelt *et al.*, 2004) Com a progressão clínica é estimulada uma resposta humoral dominada essencialmente por imunoglobulinas IgG. Contudo, a existência de uma dualidade de resposta imunológica celular e humoral foi também confirmada. (Fernandez *et al.*, 2019)

Esta resposta imune não permite a destruição do microrganismo, mas, revela-se uma importante ferramenta de diagnóstico. (Buergelt *et al.*, 2004)

Com a debilidade imunitária dos animais provocada pelo avanço da doença, possibilitando a entrada em circulação de macrófagos ainda com Map no seu interior. Isto conduz a um estado de bacteriemia, levando à disseminação do microrganismo por diversos órgãos do indivíduo afetado, variando as localizações; rins, fígado, pulmões, bexiga, o trato reprodutivo, explicando por isso a possibilidade de transmissão por via *in útero*. (Buergelt *et al.*, 2004)

1.8. Estádios de Infecção

Uma vez que o momento de infecção ocorre com elevada frequência enquanto neonatos e a resposta imune não ocorre de imediato, bem como a seroconversão ocorre antes do período clínico da doença (Facciuolo *et al.*, 2016)

A infecção divide-se em 4 estádios. O primeiro, essencialmente em animais muito jovens, onde a suscetibilidade da doença é elevada, mas não há qualquer manifestação clínica nem imunitária da doença. O segundo estágio envolve já uma infecção subclínica, também sem manifestações clínicas, mas podendo já a partir deste estágio excretar o agente. O diagnóstico nestas fases é ainda dificultado pelo estado precoce do desenvolvimento da resposta imunitária. No terceiro estágio, onde os sintomas não são específicos, o diagnóstico é geralmente positivo. No quarto estágio que é já o estágio final da doença, a progressão da doença toma a forma

clínica. (van den Esker & Koets, 2019) O período até atingir todas estas fases e demonstrar sintomatologia varia entre 2 e 7 anos. (Stau *et al.*, 2012)

1.9. Sinais Clínicos

De forma geral, a manifestação de sinais clínicos ocorre após a fase subclínica, que por sua vez, se apresenta prolongada. Desta forma, animais podem estar infetados, sem demonstrar sinais clínicos durante anos, podendo levar geralmente 2 anos até demonstrar os primeiros sinais. (Buergelt *et al.*, 2004; Quinn *et al.*, 2011; Stau *et al.*, 2012). Quando manifestada, torna-se claramente evidente especialmente em pequenos ruminantes adultos pela sua evidente emaciação, não sendo muito evidentes os episódios de diarreia. (Quinn *et al.*, 2011)

O sinal clínico mais comum é diarreia, podendo inicialmente ser intermitente, tornando-se posteriormente persistente com a progressão cronológica da doença. Associado a este sinal clínico, inevitavelmente surge a perda de peso progressivo, não que a doença afete o apetite do animal, mas pelas avultadas perdas provocadas pela diarreia crónica. (Quinn *et al.*, 2011)

Sendo as maiores lesões verificadas a nível entérico, pode verifica-se o aumento de espessura da mucosa intestinal da porção terminal do intestino delgado (jejuno e íleo) e do intestino grosso, bem como a sua transição e a válvula ileocecal (Quinn *et al.*, 2011) resultado da enterite causada por Map, resultando num enrugamento e consequente espessamento da mucosa. (Van Metre *et al.*, 2008). Os linfonodos das regiões afetadas, principalmente os linfonodos mesentéricos e os linfonodos ileocecais apresentam-se aumentados de tamanho e edematosos. Podem também apresentar-se necrosados ou caseificados em ovinos. (Quinn *et al.*, 2011)

Uma vez que as capacidades de absorção de nutrientes e água estão comprometidas, bem como a existência de perda de proteínas plasmáticas a nível intestinal, as capacidades produtivas do animal são também afetadas. É comum como já foi referido encontrar quebras na produção de leite assim como aumento da taxa de mastites e diminuição da fertilidade. (Buergelt *et al.*, 2004; Van Metre *et al.*, 2008) É ainda frequente haver mau estado do pelo. (Buergelt *et al.*, 2004; Boersema *et al.*, 2010).

Com envolvimento de macrófagos na resposta ao agente, tendo estes um papel importante na síntese de vitamina D3, podem causar calcificações, que tendem a depositar-se em locais como o coração (Buergelt *et al.*, 2004), particularmente a válvula mitral, semilunares da aorta, átrio esquerdo e na superfície interna de vasos como aorta ascendente, artéria

mesentérica e carótida, provocando a calcificação de zonas destes locais. (Driemeier *et al.*, 1999)

1.10. Efeito Iceberg

O facto de o processo de disseminação da doença ser iniciado durante a fase subclínica da doença levanta sérios problema para o seu controlo. No momento da manifestação dos sinais clínicos que levantem suspeitas de doença ou até mesmo num diagnóstico inesperado. A disseminação da doença já existe há algum tempo, e o ambiente já está contaminado. (Magombedzel *et al.*, 2016)

Por isso, um animal na fase clínica da doença é apenas a ponta do “iceberg”. Tal qual como em outras doenças endémicas, é conhecido como Fenómeno de Iceberg em que a maioria das infeções não estão diagnosticadas porque pertencem a um grupo na fase subclínica. (Magombedzel *et al.*, 2016)

No caso da Paratuberculose, por cada animal que se apresente no estado avançado de doença, apresentando diarreias profusas, demarcada emaciação, há 1 a 2 animais que se apresentam em fase clínica da doença, 4 a 8 presentes na fase subclínica e 10 a 14 na fase silenciosa da doença, infetados recentemente. (Magombedzel *et al.*, 2016)

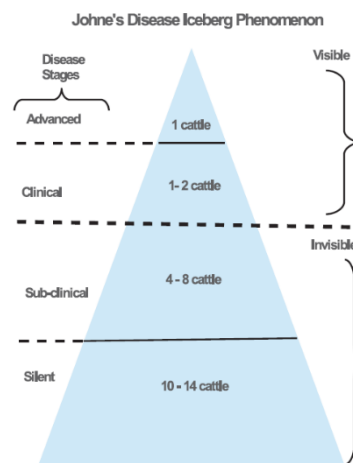


Figura 2 - Adaptado de Magombedzel *et al.*, (2016)

1.11. Diagnóstico Laboratorial de Map

Animais com demarcados sinais clínicos comuns na Doença de Johne's, como diarreia, perda de peso crónica, diminuições na produção, edemas secundários á hipoproteinémia

(Buergelt *et al.*, 2004), necessitam de ser diferenciados de outras doenças que afetem ruminantes, que apresentem um quadro clínico semelhante. (Quinn *et al.*, 2011)

Amostras recolhidas do reto de animais vivos, sejam elas raspagens ou biópsias por punção podem ser submetidas a observação microscópica direta usando a técnica de coloração Ziehl-Neelsen. Já as amostras recolhidas *post-mortem* devem ser encaminhadas para exame histopatológico sendo recolhidas porções de intestino (Íleo) ou linfonodos regionais afetados (linfonodos mesentéricos e ileoceais). (Quinn *et al.*, 2011)

De entre a panóplia de testes laboratoriais disponíveis para identificação da presença de agentes infecciosos, existem aqueles que nos permitem identificar diretamente o microrganismo, ou detetá-lo indiretamente mediante o produto da resposta imunitária específica levada a cabo pelo próprio organismo, como é o caso dos anticorpos. (Buergelt *et al.*, 2004)

As fezes podem ser submetidas para cultura, constituindo um método de diagnóstico direto de isolamento de Map nas fezes (Quinn *et al.*, 2011), reconhecido como o “Gold Standard” para o diagnóstico de Paratuberculose (Hansen *et al.*, 2019; Punati *et al.*, 2019). Contudo, apresenta-se como um método com alguma dificuldade de execução uma vez que as amostras necessitam de ser descontaminadas com Cloreto de benzalcónio a 0,3% e adicionar micobactina ao meio de cultura para possibilitar o crescimento (Quinn *et al.*, 2011). É também um processo moroso uma vez que pode levar até 16 semanas a apresentar resultados. (Punati *et al.*, 2019; Hansen *et al.*, 2019).

Para a realização dos métodos de diagnóstico indireto é utilizado o soro. Destas destaca-se a Fixação de Complemento, AGID, ELISA e RT-PCR. O diagnóstico pode também ser efetuado por respostas mediadas por células como é o caso do teste intradérmico com Johnina-PPD, teste de Gamma-Interferão e teste de estimulação de linfócitos (Quinn *et al.*, 2011; Buczinski *et al.*, 2019)

Contudo, estes testes apresentam menos sensibilidade e especificidade para detetar a presença indireta do agente, apresentando uma sensibilidade menor que 50% quando comparada com a cultura (Punati *et al.*, 2019)

A partir do soro, a pesquisa direta do agente é também possibilitada. Um dos métodos, BACTEC, destaca-se como processo de isolamento rápido do agente, que se baseia no crescimento num meio líquido, e detetar esse mesmo crescimento através de métodos radiométricos (Quinn *et al.*, 2011). Outro dos processos baseia-se em Sequências de Inserção contidas de forma repetida ao longo de todo o genoma do Map. Servindo-se delas, é possível levar a cabo PCR, permitindo a amplificação destas sequências específicas do agente. (Quinn

et al., 2011; Hansen *et al.*, 2019; Punati *et al.*, 2019) Apesar de haver várias Sequências de Inserção, a mais utilizada é a IS900.

Este método de diagnóstico baseado no ADN, apresenta-se como uma alternativa rápida e efetiva, permitindo aumentar a sensibilidade e especificidade do diagnóstico (Quinn *et al.*, 2011; Punati *et al.*, 2019). Para além disto, uma vez que o agente após infeção circula na corrente sanguínea, a realização de PCR a partir de amostra de soro sanguíneo de animais jovens permite a deteção precoce da doença (Punati *et al.*, 2019).

Recentemente, mediante o uso de Amplificação Isotérmica Mediada por Ciclos (LAMP) do material genético obtém-se um diagnóstico mais fidedigno. Este método amplifica também a Sequência de Inserção IS900 de forma rápida sem alteração da temperatura, permitindo assim aumentar os níveis de sensibilidade e especificidade. É um método mediado por Primers desenhados especificamente para IS900 uma vez que se apresenta como a Sequência de Inserção mais específica e sensível do microrganismo (Punati *et al.*, 2019).

1.12. Paratuberculose em pequenos ruminantes em Portugal

Foram já realizados estudos de seroprevalência de Paratuberculose em Portugal envolvendo os caprinos. Anteriormente o estudo de Afonso *et al.*, (2014), realizado em caprinos de raça Serrana, uma das raças autóctones de caprinos em Portugal, pesquisou a seroprevalência do agente. Foram também realizados outros estudos envolvendo no mesmo estudo ovinos e caprinos como foi o caso do estudo de Mendes *et al.*, (2004), ou somente ovinos como o estudo de Coelho *et al.*, (2010).

2. ESTUDO DE PREVALÊNCIA DE PARATUBERCULOSE EM REBANHOS DE CAPRINOS DA BEIRA INTERIOR

2.1. Objetivos

Este estudo pretende pesquisar a presença de Paratuberculose em rebanhos de caprinos contidos na região da Beira Interior, selecionando-os de forma aleatória e calcular a prevalência da doença.

2.2. Material e Métodos

2.2.1. Estudo Epidemiológico

Foi realizado um estudo observacional transversal e descritivo sob a forma de rastreio sero-epidemiológico.

2.2.2. Seleção e caracterização das áreas de estudo

A área geográfica em estudo corresponde à Beira Interior, nos concelhos abrangidos por três Organizações de Produtores Pecuários (OPP), Ovibeira, Acripinhal e Sanicobe. A seleção desta área geográfica para realização do estudo deveu-se ao facto de ser o local da realização do estágio curricular e de ser uma região com abundância em rebanhos de caprinos.

2.2.3. Caracterização das explorações da região e respetivo manejo

Na região escolhida, os rebanhos de caprinos caracterizam-se essencialmente por ser familiares. São rebanhos que realizam pastoreio em regime extensivo, podendo variar de silvo-pastoreio a pastoreio em áreas agrícolas destinadas ao gado caprino, sendo suplementados com feno no local de abrigo noturno.

São rebanhos que passam a maioria do seu tempo a pastorear no campo, sendo confinados diariamente em local adequado da exploração.

A sua raça varia desde animais de raça autóctone da região como é o caso da Charnequeira, Serpentina e animais de raças exóticas como são o caso da Murciana, Saanen, Malaguanha, Florida e animais resultantes do cruzamento com as raças autóctones.

São explorações abertas, onde a aquisição de indivíduos de outras explorações, especialmente de machos é relativamente frequente.

O refugo é frequentemente descurado e os animais mais velhos e debilitados acabam por morrer junto do rebanho.

Os partos ocorrem em abrigo da exploração, onde os neonatos permanecem desde o momento que recebem o colostro até ao momento de serem vendidos ou adquirirem condições para acompanharem o rebanho no pastoreio.

O manejo do esterco realiza-se mediante recolha cerca de duas vezes por ano.

2.2.4. Rebanhos estudados e amostragem

Os rebanhos selecionados para estudo, correspondem a rebanhos de caprinos abrangidos pelo plano nacional de erradicação de Brucelose, com localização inserida na área geográfica anteriormente mencionada.

As amostras foram recolhidas de forma aleatória, realizada por conveniência relativa ao processo de saneamento realizado na região. Foram selecionadas explorações de caprinos, das quais foram selecionados animais para a recolha das amostras.

Todos as explorações amostradas realizam pastoreio á exceção da exploração #16 que se encontra em confinamento permanente.

2.2.5. Preparação e recolha de amostras

A recolha de amostras foi efetuada mediante recolha de amostra de sangue de animais de 16 explorações selecionadas. Uma vez que o estudo pretende detetar a presença do agente nas explorações, basta que uma das amostras apresente resultado positivo para que a exploração seja classificada como positiva. O tamanho da amostra foi calculado através do programa de estatística WinEpi V.2.0 de acordo com uma seroprevalência esperada de 50% com um intervalo de confiança de 95%, de entre os cerca de 2400 animais que integram os rebanhos estudados. A partir dos dados das OPP's , foram recolhidas 5 amostras por rebanho.

A recolha foi efetuada pelos Médicos Veterinários das OPP's durante as visitas realizadas às explorações selecionadas, no âmbito do programa sanitário de erradicação de Brucelose.

Após recolhidas as amostras, procedeu-se à separação dos respetivos soros e posterior congelamento a – 20 °C até á data de expedição para o laboratório SEGALAB para o respetivo processamento mediante o método de ELISA.

As amostras foram associadas á sua identificação da exploração, identificando-as por si só e, possibilitando assim, na instância de se verificar a positividade da mesma, com a inclusão desta identificação no relatório, ser possível solicitar autorização á DGAV para a realização da vacinação do efetivo contra a enfermidade.

2.2.6. Seleção dos Animais da Amostra

Para aumentar a taxa de sucesso na pesquisa do agente, no momento de seleção de indivíduos para a amostra, foi dada a prioridade a indivíduos mais velhos do rebanho e que apresentassem fraca condição corporal.

2.2.7. Teste Laboratorial

Os soros foram processados mediante o método ELISA para a pesquisa de anticorpos específicos para *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Foi utilizado o teste comercial PrioCHECK MAP Ab 2.0 Plate Kit (Thermo Fisher Scientific) que permite detetar a presença de anticorpos específicos para o agente em ruminantes, quer no soro ou no leite.

Para impedir reações cruzadas com anticorpos de outras micobactérias, o teste possui *M. phlei* que permite removê-los por absorção.

2.2.8. Especificidade e sensibilidade do teste

O teste utilizado possui uma elevada sensibilidade e especificidade. Os valores obtidos pelo teste, quando realizado no soro de ovinos apresentam valores fornecidos pelo fabricante de 86,1% relativos à Sensibilidade e 99,4% relativos à Especificidade.

Apesar do teste utilizado para a pesquisa do agente não ser considerado o “Gold Standard” para o diagnóstico, o fabricante apresenta uma correlação de PrioCHECK MAP Ab 2.0 Plate Kit com o teste de cultura fecal, ao qual apresenta uma elevada concordância, apresentando um valor de 96%.

2.2.9. Interpretação de Resultados

Os resultados obtidos na pesquisa do agente em soros que apresentam valores iguais ou acima de 15% são considerados positivos. Uma exploração é considerada positiva se nela tiver sido detetado pelo menos um animal seropositivo.

2.2.10. Análise Estatística

As estatísticas foram calculadas e foram criados gráficos e tabelas com as variáveis numéricas sendo estas o número de animais por exploração, divididas posteriormente em duas classes de tamanho, diferentes raças e respetiva correspondência como raça autóctone ou exótica e resultado percentual ELISA.

Os resultados laboratoriais obtidos foram então comparados com as variáveis apresentadas anteriormente. O valor percentual obtido no teste laboratorial foi também relacionado com as variáveis.

A prevalência foi calculada com base no resultado serológico.

Os gráficos e tabelas foram contruídos com o software estatístico SPSS® e Excel.

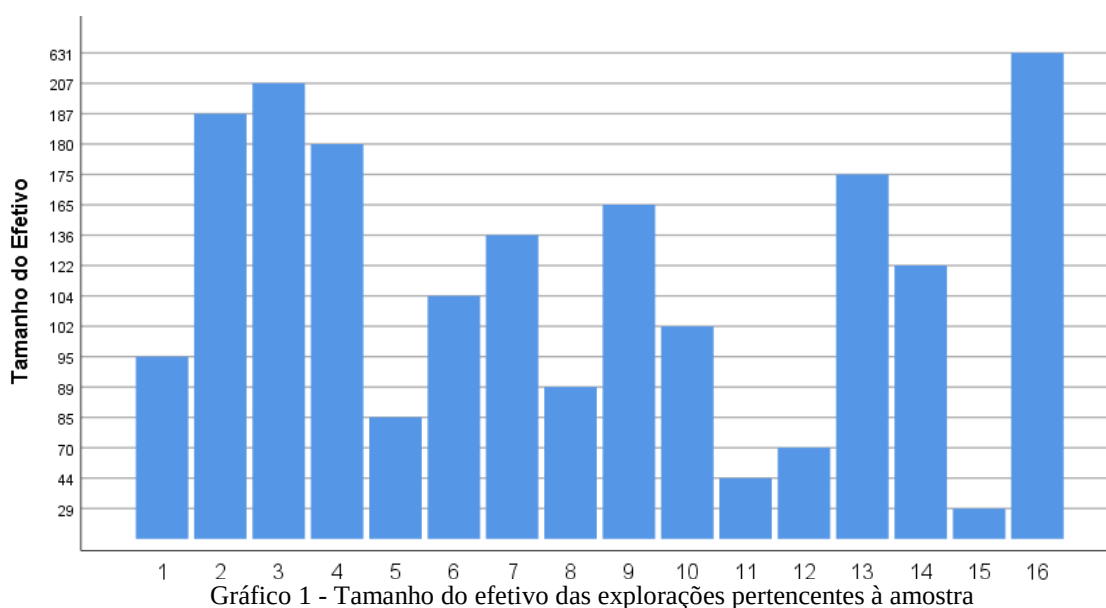
O teste estatístico utilizado foi o teste Mann–Whitney.

2.3. Resultados

2.3.1. Caracterização das explorações

Para melhor enquadramento do estudo, a partir das informações recolhidas posteriormente na OPP, foi possível realizar uma caracterização das explorações que integraram o estudo.

O Gráfico 1 mostra um número muito variável de animais por exploração que constituem a amostra.



As explorações abrangidas pelo estudo (n=16), foram divididas em 2 classes segundo o tamanho do seu efetivo (Tabela 6) por forma a agrupá-las em classes mais abrangentes. 37,5% (n=6) das explorações são constituídas por menos 100 animais, 62,5% (n=10) são constituídos por mais de 100 animais. A divisão foi efetuada em concordância com as Classes REAP, estando apenas representadas na amostra as Classes REAP 2 e 3.

Tabela 6 - Distribuição das explorações por classes de tamanho de efetivo

	Frequência	Percentagem	Percentagem válida	Percentagem acumulativa
≤ 100	6	37,5	37,5	37,5
>100	10	62,5	62,5	100,0
Total	16	100,0	100,0	

2.3.2. Rastreio Sero-epidemiológico – Detecção de doença

Os resultados obtidos nos testes serológicos segundo o método ELISA efetuados nas amostras de soro individuais permitiram assim identificar, de entre um total das 16 explorações estudadas, 9 explorações positivas e 7 explorações negativas (Tabela 7).

Tabela 7 - Classificação das explorações de acordo com o resultado laboratorial.

	Frequência	Percentagem	Percentagem válida	Percentagem acumulativa
Negativo	7	43,8	43,8	43,8
Positivo	9	56,2	56,2	100,0
Total	16	100,0	100,0	

Este facto traduz-se num total de 56,2% das explorações com classificação positiva na pesquisa de doença.

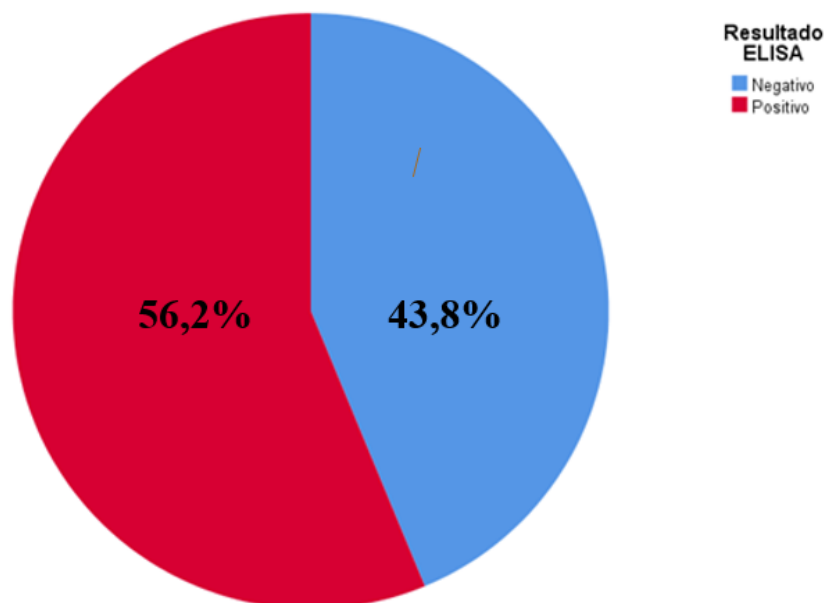


Gráfico 2 - Proporção de explorações positivas e negativas na amostra de acordo com os resultados laboratoriais

2.3.3. Relação entre a doença e o tamanho do efetivo

De todo o universo da amostra, podemos constatar que o tamanho do efetivo varia consideravelmente, como podemos confirmar no gráfico 1.

Por forma a avaliar a influência desta variável nos resultados serológicos, apresenta-se na Tabela 8, a distribuição das explorações segundo a sua classe relativa ao tamanho do efetivo e os resultados no teste ELISA.

Tabela 8 - Distribuição das classes de explorações em função do resultado serológico

		≤ 100	>100	Total
Resultado ELISA	Negativo	3	4	7
	Positivo	3	6	9
Total		6	10	16

Tabela 9 - Resultado Laboratorial em função do efetivo.

Tamanho do Efetivo	Resultado Laboratorial				
	Positivo (+)	Fr (+)	Negativo (-)	Fr (-)	Total (F _A)
≤ 100	3	18,8%	3	18,8%	6
>100	6	37,4%	4	25%	10
Total	9	56,2%	7	43,8%	16

Com a avaliação estatística destas variáveis constatou-se que a doença pode surgir em qualquer dimensão do efetivo. As explorações com um efetivo superior a 100 animais apresentam maior quantidade de explorações positivas. Estas explorações apresentaram, a maior representatividade de toda a amostra com 37,4%.

Apesar dos resultados obtidos, com relação positiva entre a classe de tamanho de efetivo superior e a sua classificação como positiva, esta apresenta uma relação estatística não significativa. ($p > 0,05$; teste *Mann-Whitney*)

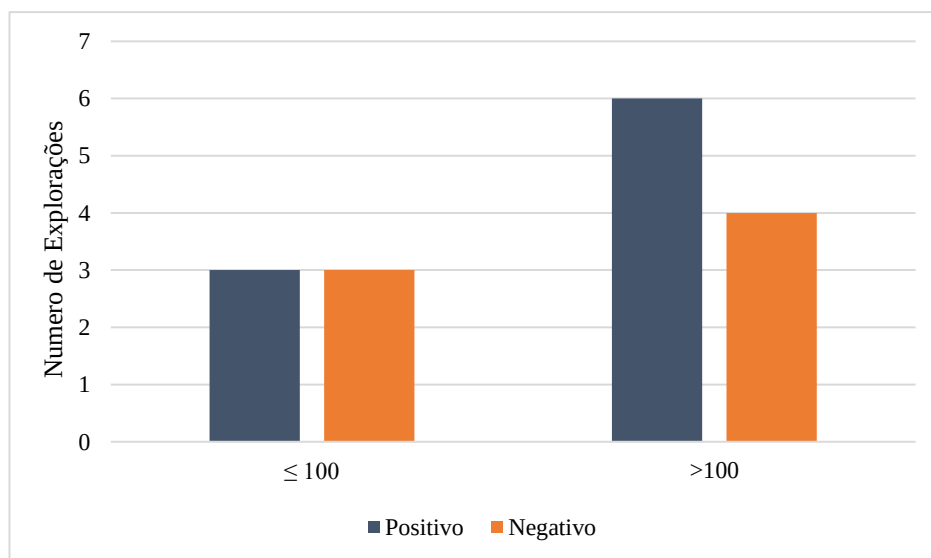


Gráfico 3 - Distribuição das explorações positivas e negativas no teste ELISA em função da sua classe de tamanho de efetivo

2.3.4. Quantidade de Amostras Positivas por Amostra

Independentemente do tamanho do efetivo, o tamanho da amostra manteve-se constante com a recolha de 5 amostras animais por exploração.

Todas as explorações que apresentaram resultado positivo apresentaram unicamente um soro com presença de anticorpos anti - *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* á exceção da exploração #16.

Tabela 10 - Número de soros positivos na exploração #16.

Nº ID Exploração	Nº de soros positivos na amostra (5 soros)	Total de animais na exploração
#16	3	631

Apenas uma exploração apresentou mais que um soro positivo na amostra. Esta exploração integra-se na classe > 100 animais, apresentou 3 soros positivos na amostra. De todas as explorações, esta era a que possuía o maior efetivo com 631 indivíduos.

2.3.5. Distribuição por raça

Para avaliar uma hipotética influência da raça dos rebanhos na sua classificação como positivos ou negativos, foi estabelecida a sua correlação. O estudo abrangeu as seguintes raças de caprinos: Charnequeira, Malaganha, Serpentina, Florida, Murciana, e rebanhos compostos por animais sem raça definida, classificados como Cruzadas.

A Tabela 11 apresenta todas as raças abrangidas assim como a quantidade individual de rebanhos estudados e a quantidade de resultados positivos relativos à raça.

Tabela 11 - Distribuição das explorações pelas diferentes raças e o resultado obtido no teste de pesquisa de anticorpos anti-Map.

Raça	Nº de explorações	Explorações Positivas	Total %
Charnequeira	4	4	100%
Malaganha	2	1	50%
Serpentina	1	1	100%
Florida	1	0	0%
Murciana	2	1	50%
Cruzadas	6	2	33,3%

Tabela 12 - Distribuição das explorações por raças com resultado positivo no teste de pesquisa de anticorpos anti-Map.

Raças	Nº de Explorações	Nº Explorações Positivas	Total %
Autóctones	5	5	100%
Exóticas	11	4	36%
Total	16	9	

Com a análise desta variável estatística, pode-se constatar que, de entre todas as raças abrangidas pelo estudo, as explorações compostas por animais de raças autóctones portuguesas, nomeadamente a raça Serpentina e Charnequeira apresentaram na sua totalidade resultado positivo. Com a análise estatística dos resultados obtidos, estes apresentam uma relação estatisticamente não significativa ($p > 0,05$; teste *Mann-Whitney*)

À exceção da raça Florida, todas as raças de caprinos apresentaram pelo menos um dos rebanhos positivos. Este resultado sugere que qualquer raça de caprino está suscetível á enfermidade.

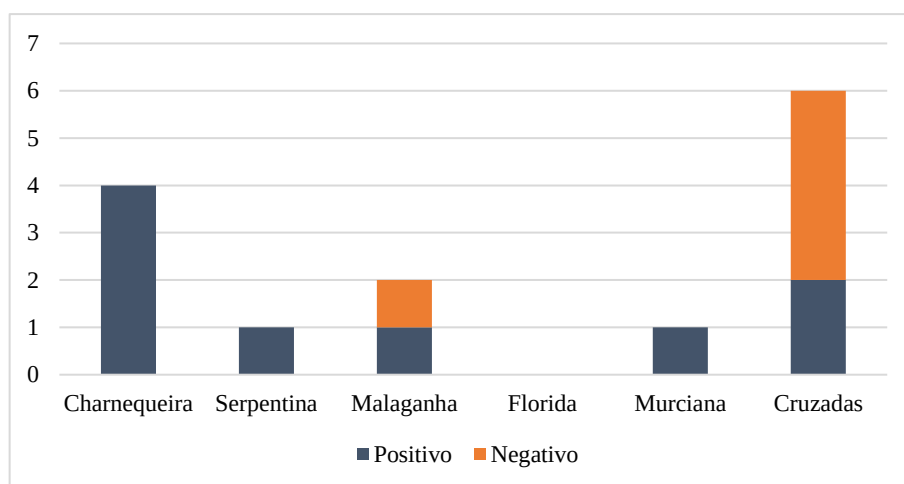


Gráfico 4 - Relação entre as diferentes raças de caprinos e o resultado no teste ELISA.

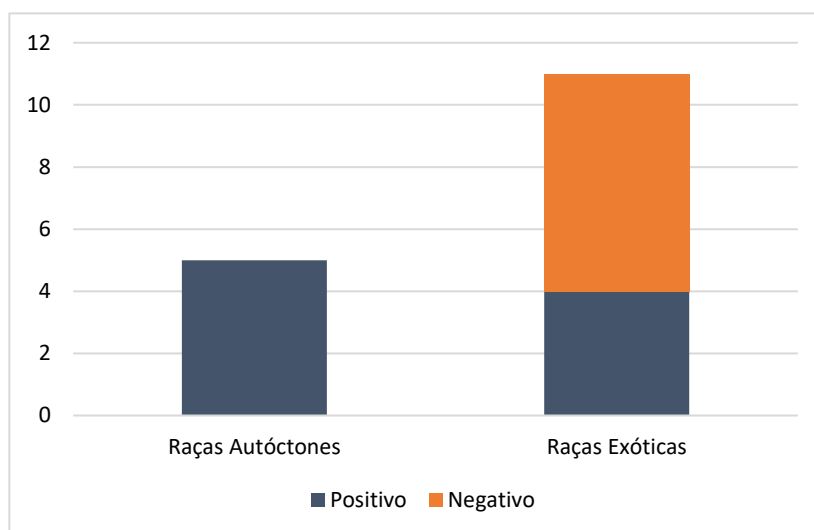


Gráfico 5 - Relação entre as raças de caprinos autóctones portuguesas e as consideradas exóticas e os resultados no teste ELISA nestes dois grupos.

2.3.6. Relação entre a raça e a % de anticorpos

Através da pesquisa serológica de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* mediante o método ELISA, os resultados foram apresentados sob a forma de um valor percentual. Os resultados apresentaram uma grande variação dentro de todo o universo da amostra, podendo variar entre valores percentuais entre 19,6% e 161,5%.

Com intuito de estudar a relação entre a percentagem de anticorpos na amostra individual e a raça, foram correlacionadas as duas variáveis no Gráfico 6.

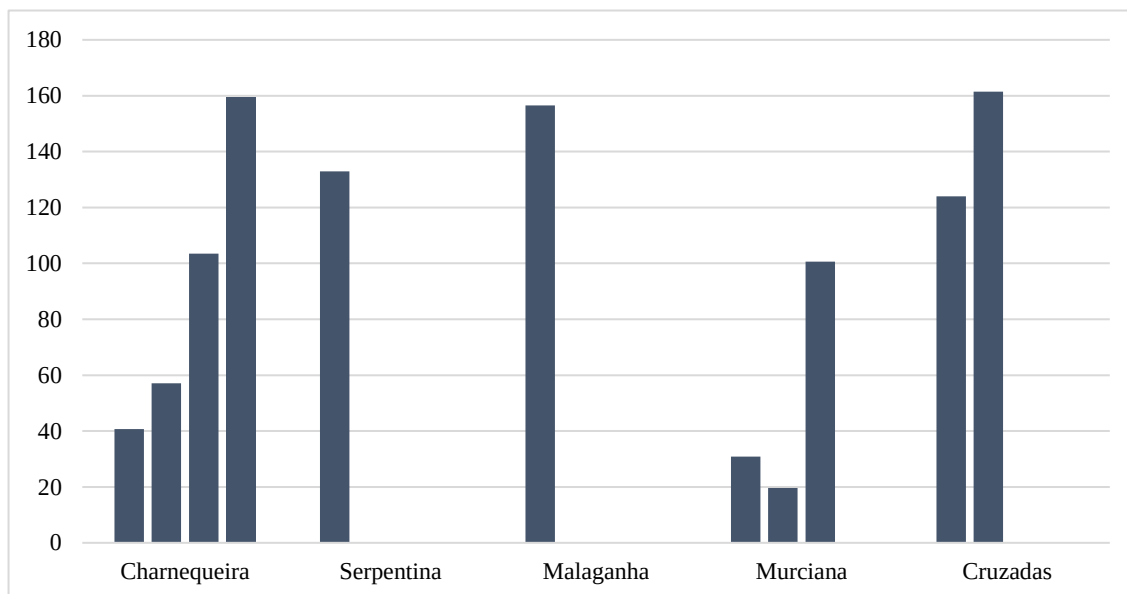


Gráfico 6 - Variação da percentagem de anticorpos na amostra individual positiva e a raça

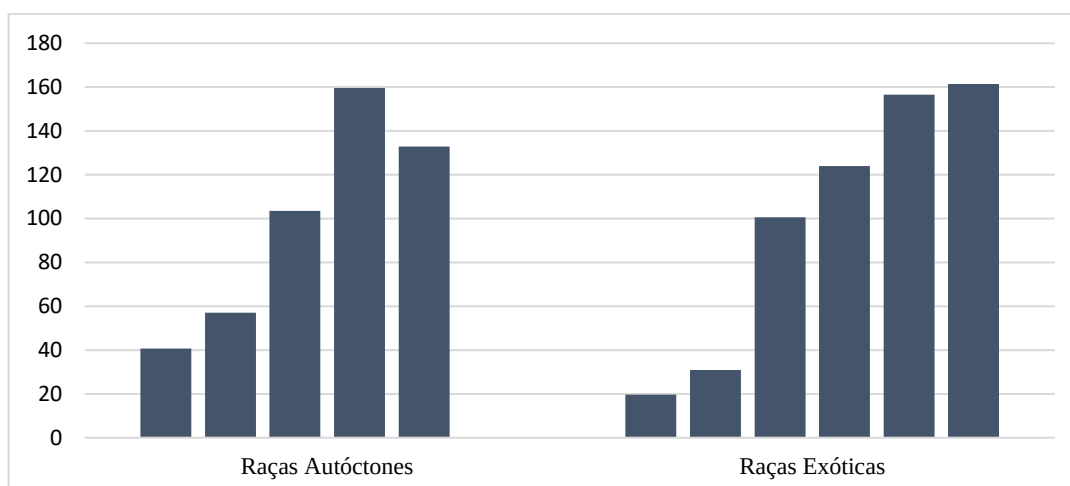


Gráfico 7 - Percentagens de anticorpos obtidos nas duas classes de raças de caprinos

Podemos observar o resultado mais elevado na categoria de Cruzadas com 161,5%. Também as raças Charnequeira e Malaganha apresentaram cada uma delas, um resultado muito próximo deste valor máximo.

2.3.7. Relação entre tamanho de efetivo e % anticorpos

Com intuito de estudar a influência do tamanho de efetivo no resultado percentual de anticorpos do teste ELISA, foram correlacionadas as duas variáveis.

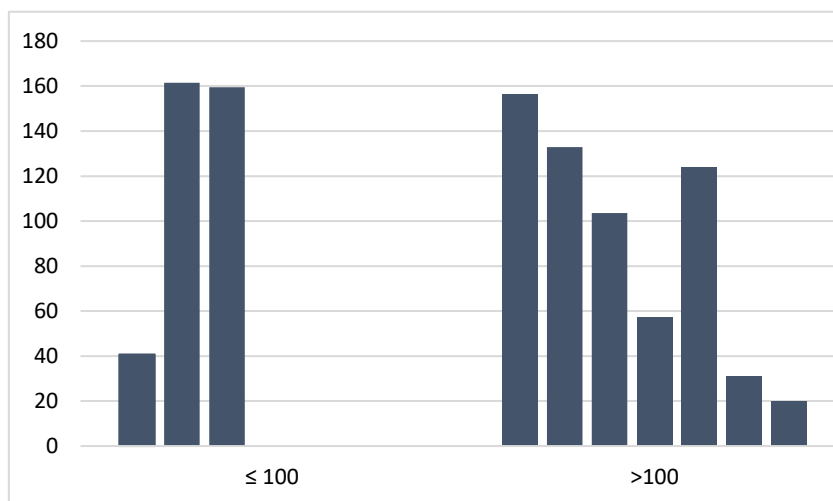


Gráfico 8 - Valores de percentagem de anticorpos de amostras individuais positivas em função da classe de tamanho de efetivo.

No Gráfico 8 podemos observar a distribuição de percentagens de anticorpos encontradas nas amostras pelas diferentes classes.

O valor percentual mais alto foi obtido na classe de tamanho de efetivo mais baixa, correspondente às explorações com menor número de animais. Os restantes valores mais altos encontram-se distribuídos pelas duas classes.

O rebanho de maiores dimensões, com 631 indivíduos apresentou 3 soros positivos que apresentaram os seguintes valores: 19,6%, 30,9% e 100,6%. Estes valores encontram-se distantes dos valores máximos observados no universo da amostra, confirmando por isso a ausência de correlação entre o tamanho do efetivo e a percentagem de anticorpos verificados nas amostras individuais.

A análise destes resultados evidenciou também o resultado percentual de anticorpos mais baixo, verificado na exploração com maior efetivo.

2.4. Discussão

A Paratuberculose, para além de ser uma doença infecciosa que afeta principalmente ruminantes (Whittington *et al.*, 2019), apresenta-se também como uma doença com um possível potencial zoonótico, sendo considerado um patógeno de origem alimentar (Chaubey *et al.*, 2017). Contudo o seu impacto na saúde pública não pode ainda ser quantificado. (Whittington *et al.*, 2019)

Apesar de terem sido realizados programas de saúde animal envolvendo a indústria dos lacticínios e da carne por toda a Europa, os investigadores concluem que estes apenas são realizados com propósito de saúde animal e respetivas razões económicas, sem justificações de saúde pública. Estas medidas implementadas visam o controlo da doença em animais, reduzindo assim a exposição do agente aos humanos. (Whittington *et al.*, 2019)

Os caprinos foram a espécie escolhida para este rastreio devido à disponibilidade de explorações ainda por rastrear a doença e também pelo facto de o local geográfico do estudo englobar um dos maiores encabeçamentos de uma das raças autóctones portuguesa de caprinos, a cabra Charnequeira.

Nas 16 explorações amostradas, foi observada uma proporção de 56,2% (IC: 32,4% – 78,2%) com animais positivos ao teste serológico (n=9) para um nível de confiança de 95%.

Dada a disponibilidade de estudo sero-epidemiológicos de Paratuberculose em caprinos realizados em Portugal, analisaram-se as prevalências encontradas nos vários estudos por forma de conhecer a situação epidemiológica do país.

A análise de 971 caprinos provenientes de 95 explorações realizada no nordeste de Portugal em 2011 referida no estudo de Afonso *et al.*, (2014) apresentou uma elevada presença do agente, com 70 explorações positivas. Foram consideradas como positivas as explorações com pelo menos um dos animais positiva ao teste serológico ELISA. Do estudo foi possível obter uma prevalência de 73,7%. Neste estudo, a amostragem foi realizada de forma aleatória em animais com idade superior a 2 anos, enquanto que no estudo efetuado na Beira Interior, a amostra foi direcionada para os animais mais velhos do rebanho ou os que apresentavam algum dos sinais clínicos compatíveis com a doença, sendo o mais evidente a fraca condição corporal individual. No entanto a prevalência verificada no estudo de Afonso *et al.*, (2014), contrariamente ao que seria de esperar apresentou-se superior á prevalência obtida na Beira Interior.

No presente estudo realizado na Beira Interior, foi estudada a presença da doença nas diferentes classes de tamanho das explorações. Neste foram encontradas prevalências mais elevadas nas explorações com maior efetivo ($n=6$). Nesta classe, onde se inserem explorações com mais de 100 animais, apenas 40% das explorações apresentaram resultado negativo o que pode ser explicado pelo facto de estes tipos de rebanhos serem usualmente associados a medidas de manejo em massa, onde os cuidados individuais são escassos devido à dificuldade de os prestar. (Coelho *et al.*, 2010) O facto de as características de alojamento serem transversais a todas as classes, permite que a variável do tamanho do efetivo seja mais relevante. Esta densidade revela-se num fator importante uma vez que quando esta se verifica elevada, as cargas bacterianas ambientais aumentam, aumentando consequentemente as chances de transmissão da doença. (Coelho *et al.*, 2010) O facto de ser praticado um manejo tradicional, passando pela omissão de medidas higio-sanitárias e biossegurança dos rebanhos pode agravar a transmissão da doença.

Em diversos estudos de seroprevalência realizados, foi também encontrada uma correlação entre o tamanho do efetivo e o risco de infeção por Map. Nestes estudos foi confirmada a maior probabilidade de Map estar presente em explorações de maiores dimensões que em explorações de menores dimensões. (Stau *et al.*, 2012; Wolf *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2017)

Este facto foi também constatado no estudo realizado na Beira Interior, no qual cerca de 66% das explorações positivas integram a classe de maiores dimensões de efetivo. O que poderá ser justificado também pela necessidade de explorações com dimensões de efetivo superiores terem necessidade de adquirir um maior número de animais de reposição, havendo necessidade de recorrer à introdução de animais descurando quarentenas e rastreios de doenças, aumentando por isso o risco de introduzir animais infetados. (Stau *et al.*, 2012)

De entre as raças que integram o quadro da amostra, estão incluídas duas raças autóctones de Portugal. Uma delas, a raça Serpentina, oriunda da região sul do país e a outra, a raça Charnequeira, originária da região onde foi realizado o estudo, justificando por isso a sua maior representatividade.

Com análise estatística dos resultados serológicos em função da raça de caprinos foi possível observar que todas as explorações de raças autóctones que integraram a amostra do estudo apresentaram serologia positiva no teste ELISA. As apresentaram uma proporção de resultados positivos inferior.

À exceção da raça Florida, todas as outras raças de apresentaram pelo menos uma exploração com serologia positiva. O facto de a amostra apenas integrar uma exploração com a raça que apenas apresentou serologia negativa não permite tirar qualquer conclusão. A classe de Cruzadas foi assim classificada uma vez que nestas explorações estão integradas raças autóctones, uma ou mais raças exóticas e animais resultantes do cruzamento entre as duas raças, impossibilitando a segmentação em classes dentro da mesma exploração.

Outros estudos reportaram prevalências mais elevadas em indivíduos de raças exóticas e seus cruzamentos. (Mainar-Jaime & Vásquez-Boland, 1998; Jakobsen *et al.* 2000,) Á semelhança do resultado observado no presente estudo, também Coelho *et al.*, 2010) num estudo sero-epidemiológico realizado em ovinos na região norte de Portugal, observou uma maior prevalência em indivíduos de raças autóctones.

Como justificação pode apresentar-se o facto de as raças exóticas que, de forma geral apresentam um valor acrescido, sejam logradas com práticas de manejo mais elaboradas. (Coelho *et al.*, 2010)

Estas duas raças autóctones, partilham o facto de integrarem programas de melhoramento genético devido á escassez de indivíduos destas raças. Devido a esta escassez, a dificuldade em obter indivíduos para reposição e promoção de uma maior variabilidade genética do rebanho torna-se acrescida. Este facto promove a endogamia, ocorrida principalmente pela permanência de machos reprodutores durante várias épocas reprodutivas sem a devida substituição. A reduzida variabilidade genética pode justificar uma maior suscetibilidade à doença.

Verificado noutras espécies como humanos ou mamíferos selvagens, a endogamia foi associada a um aumento de suscetibilidade de infeção por outras micobactérias. (Benton *et al.*, 2018)

Apenas uma das 16 explorações amostradas apresentaram mais que um resultado positivo dentro da amostra, sendo verificadas 3 amostras positivas no caso desta exploração. Esta exploração conjuga dois fatores que demonstram relação positiva com a presença da doença. Está inserida na classe de maior tamanho de efetivo, sendo de todas as explorações a que apresenta o maior efetivo com 631 animais. Para além deste facto, esta é a única exploração que apresenta um confinamento diferente. Nesta os animais estão permanentemente confinados ao interior da nave da exploração, não realizando por isso o pastoreio no exterior como as restantes explorações. Este facto potencia o aumento dos níveis de exposição ao agente etiológico, contribuindo para uma maior disseminação da doença pela exploração.

Num estudo realizado por Liu *et al.*, (2017), foram comparadas as prevalências de explorações de bovinos em regime intensivo e em extensivo. Os resultados comprovaram que as prevalências se apresentavam significativamente mais altas em explorações intensivas, tanto a prevalência de rebanhos como a prevalência dentro da exploração.

A variável do resultado percentual foi estudada em relação ao tamanho do efetivo e aos diferentes tipos de raças integrantes do estudo. Ambas não mostraram qualquer relação, havendo uma distribuição dos vários resultados percentuais sem qualquer relação pelas classes de tamanho de efetivo e pelos tipos de raça.

Os resultados variaram entre 19,6% e 161,5%. Estes valores acompanham na sua proporção a excreção fecal de Map.

Na condição de doença infecciosa, a Paratuberculose revela-se num grande desafio para o sector agropecuário e também para a Medicina Veterinária. Com base no princípio antigo, a única maneira de eliminar uma doença infecciosa é erradicar o seu agente etiológico. Contudo este princípio é difícil de executar no caso de Map. (Bastida & Juste., 2011)

Dependendo do objetivo dos programas de controlo de Map, tais como a redução dos casos clínicos e/ou redução da prevalência podem ser adotadas medidas base. A introdução de medidas de manejo estritas que passam por melhorar as medidas de biossegurança da exploração, através de melhorias a nível higio-sanitário, especialmente com neonatos com manejo de colostro/leite estrito e evitar contaminação fecal-oral. A identificação de animais-problema, capazes de disseminar o agente dentro da exploração através da testagem e refugo de animais em estágio clínico e subclínico, bem como o rastreio de todos os animais que vão entrar na exploração. (Bastida & Juste, 2011; Whittington *et al.*, 2019)

A vacinação revela-se numa importante ferramenta para controlar Map nas explorações de pequenos ruminantes. Esta permite reduzir a incidência clínica da doença, aumenta a produção de leite e reduz a excreção fecal do agente, reduzindo assim a transmissão da doença e consequentes perdas económicas. (Bastida & Juste, 2011; Shippy *et al.*, 2016; Whittington *et al.*, 2019) Esta revela-se na medida sanitária com melhor custo-benefício. (Bastida & Juste., 2011)

3. EFICIÊNCIA DO DIAGNÓSTICO DE PARATUBERCULOSE COM BASE NO HISTORIAL CLÍNICO E EPIDEMIOLÓGICO

3.1. Objetivos

Este estudo pretende avaliar a importância das informações como a sintomatologia clínica e historial clínico fornecidas ao Médico Veterinário atingir o diagnóstico da doença.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Estudo Epidemiológico

Foi realizado um estudo analítico e descritivo sob a forma de rastreio sero-epidemiológico.

3.2.2. Caracterização da Amostra

A amostragem do estudo foi realizada na região da Beira Interior. Nesta foram selecionadas exploração (de # 17 a #31) que demonstravam sinais e/ou historial clínico compatíveis com Paratuberculose.

Esta seleção foi efetuada por Médicos Veterinários que exerciam Clínica de Espécies Pecuárias na região do estudo. A seleção das explorações foi realizada no momento de visita sanitária no âmbito do plano de erradicação de Brucelose em Pequenos Ruminantes ou durante a visita em âmbito clínico solicitada pelo proprietário.

3.2.3. Seleção de Explorações para amostra

Para a inclusão das explorações na amostra teriam de ser observados sinais clínicos e/ou historial clínicos tais como: presença de diarreias intermitentes ou persistentes, baixa produções para o expectável, taxas de mortalidade altas, fracas condições corporais contudo plano alimentares adequados e desparasitações em dia.

Durante a prática clínica, particularmente em explorações com elevada mortalidade foram realizadas necropsias.

3.2.4. Seleção de Animais para Amostragem

Quando se reuniam as características da exploração necessárias para integrar a amostra, os animais eram selecionados e amostrados individualmente.

Os animais que apresentassem sintomatologia clínica no momento da recolha da amostra eram automaticamente selecionados. No caso de não estar presente sintomatologia clínica eram selecionados os animais de idade mais avançada presentes no efetivo assim como animais com fraca condição corporal.

3.2.5. Teste Laboratorial

Os soros foram processados mediante o método ELISA para a pesquisa de anticorpos específicos para *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Foi utilizado o teste comercial PrioCHECK MAP Ab 2.0 Plate Kit (Thermo Fisher Scientific) que permite detetar a presença de anticorpos específicos para o agente em ruminantes, quer no soro ou no leite.

Para impedir reações cruzadas com anticorpos de outras micobactérias, o teste possui *M. phlei* que permite removê-los por absorção

3.2.6. Especificidade e sensibilidade do teste

O teste utilizado possui uma elevada sensibilidade e especificidade. Os valores obtidos pelo teste, quando realizado no soro de ovinos apresentam valores de 86,1% relativos à Sensibilidade e 99,4% relativos à Especificidade.

Apesar do teste utilizado para a pesquisa do agente não ser considerado o “Gold Standard” para o diagnóstico, o fabricante apresenta uma correlação de PrioCHECK MAP Ab 2.0 Plate Kit com o teste de cultura fecal, ao qual apresenta uma elevada concordância, apresentando um valor de 96%.

3.2.7. Interpretação de Resultados

Os resultados obtidos na pesquisa do agente em soros que apresentam valores iguais ou acima de 15% são considerados positivos. Uma exploração é considerada positiva se nela tiver sido detetado pelo menos um animal seropositivo.

3.2.8. Análise Estatística

As estatísticas foram calculadas e foi criada uma tabela com as explorações integrantes da amostra e o respetivo resultado laboratorial.

A tabela foi contruída com o software estatístico SPSS®.

3.3. Resultados

Foram analisados dados estatísticos relativos á pesquisa do agente com base no quadro clínico da doença.

Realçando a importância da suspeita clínica para o diagnóstico da doença, foram cruzados dados estatísticos de Médicos Veterinários que realizam clínica de campo na área geográfica do estudo anterior. Neste estudo pode avaliar-se a importância do enquadramento da sintomatologia geral da exploração no momento de colher amostras e solicitar análises serológicas.

Nas necrópsias realizadas foram encontradas linfadenomagalias dos linfonodos mesentéricos. Este é um dos sinais, conjugado elevadas taxas de mortalidade, com diagnóstico diferencial de Paratuberculose.



Figura 3 - Durante uma necropsia é detetada a presença de linfonodos mesentéricos edemaciados

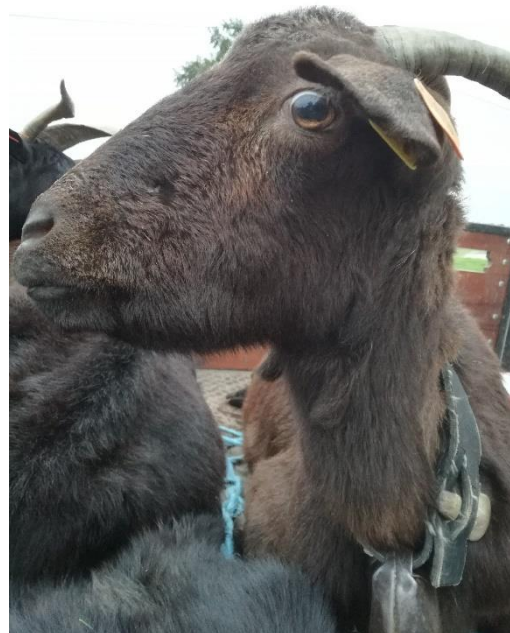


Figura 4 - Demonstração um caprino de raça Charnequeira com edema submandibular, sendo uma consequência da emaciação.

Tabela 13 - Explorações que apresentavam sintomatologia clínica e/ou historial clínico compatível com Paratuberculose e o resultado laboratorial na pesquisa da doença.

	Frequência	Percentagem	Percentagem válida	Percentagem acumulativa
Negativo	1	6,7	6,7	6,7
Positivo	14	93,3	93,3	100,0
Total	15	100,0	100,0	

De um universo de amostra de 15 explorações de caprinos que apresentavam sintomatologia clínica como elevada mortalidade, fraca condição corporal dos animais e diarreias intermitentes e/ou historial clínico semelhante, 14 explorações apresentaram resultado positivo no rastreio serológico de pesquisa de anticorpos anti – *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, sendo traduzido nuns conclusivos 93,3 % de resultados positivos.

Este resultado evidencia uma correlação entre a importância na observação do estado geral do rebanho bem como o seu historial e sintomatologia clínica, no diagnóstico da enfermidade.

3.4. Discussão

Com base na classificação dos estádios da doença, permutáveis com a cronicidade da infecção, a sua observação pode ser um importante meio complementar no diagnóstico da doença, direcionando a lista de diagnósticos diferenciais para Paratuberculose.

Durante o período de desenvolvimento da doença, que usualmente dura um período variável compreendido entre 2 e 7 anos (Stau *et al.*, 2012), os sinais clínicos surgem essencialmente no final do terceiro e durante quarto estágio de doença. É a partir destes que é possível o diagnóstico assertivo da presença da doença por métodos indiretos. Isto verifica-se porque nesta fase, a modulação da resposta imunitária já está completamente desenvolvida, sendo por isso detetada no método de ELISA (van den Esker & Koets., 2019), sendo este um importante método de diagnóstico, devido á facilidade de recolha de amostras, elevada eficiência na deteção do agente e um preço acessível.

Uma vez que se apresenta como uma doença crónica, o historial da exploração revela-se numa das informações com maior importância. Informações tais como: produtividade baixa, baixa condição corporal do efetivo, contudo apetite normal, incidência de diarreias, taxa de mortalidade alta, são fortes indicativos que a Paratuberculose poderá estar presente. (van den Esker & Koets., 2019)

As 15 explorações amostradas foram selecionadas uma vez que apresentavam historiais e/ou sintomatologia clínica compatíveis com os acima mencionados. Foram realizadas recolhas de soro dos animais que apresentavam idades mais avançadas, com menor condição corporal ou que apresentassem diarreia no momento da recolha. As amostras foram processadas segundo o método de ELISA.

Das 15 explorações, 14 apresentaram resultado positivo na pesquisa de anticorpos anti – *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, sendo por isso possível afirmar que 93,3% das suspeitas de Paratuberculose foram confirmadas.

Este resultado evidencia uma correlação positiva entre o historial clínico da exploração, bem como a presença de sinais clínicos no diagnóstico de Paratuberculose. Este facto evidencia também a importância da experiência do Médico Veterinário, no diagnóstico da doença seja este no momento de visita em âmbito clínico ou em âmbito sanitário, uma vez que estes desempenham um importante papel no aconselhamento dos produtores, especialmente dos pequenos produtores, que realizam a atividade pecuária segundo o método tradicional.

4. CONCLUSÃO

Com a revisão bibliográfica efetuada, revelou um interesse crescente pela Paratuberculose a nível mundial, manifestado pela crescente quantidade e diversidade de publicações relativas à doença. Esta atenção crescente da comunidade científica poderá estar relacionada com a crescente preocupação com a economia e sustentabilidade do setor, saúde pública e as doenças de origem alimentar.

Revela-se ainda atualmente, uma doença ainda muito sub-diagnosticada, principalmente em Portugal onde a maioria das explorações permanecem ainda por rastrear. Contudo, apesar dos esforços crescentes na divulgação da doença, com a educação de produtores agropecuários, aconselhamento por parte do Médico Veterinário de exploração, a prevalência da Paratuberculose continua a ser conhecida com pouca precisão.

Os quadros de infeção prolongados, o desenvolvimento tardio de um quadro clínico inespecífico, podendo por vezes estar ausente, conjugados com a falta de informação, são alguns dos fatores contribuintes para a subnotificação da incidência. Isto dificulta a elaboração de programas de controlo do agente dentro da exploração, assim como a ideia de a doença integrar um programa de erradicação está longe de uma realidade plausível de momento.

Embora a dimensão da amostra realizada no estudo da Beira Interior, os resultados obtidos apontam para uma presença efetiva de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* em explorações de caprinos da região. A cronicidade da doença impede a efetividade na realização de quarentena na aquisição de animais, contudo o teste dos animais recém-adquiridos é possível, nomeadamente através da técnica de PCR, capaz de detetar o agente de uma forma mais precoce. A introdução de animais infetados pode ser uma das principais vias de introdução do agente numa exploração.

O Médico Veterinário de exploração desempenha cada vez mais um papel educativo do produtor agropecuário. Este pode alertar para a possibilidade da presença da doença e incentivar ao rastreamento. Com os resultados obtidos no presente estudo, os Médicos Veterinários desempenharam um papel crucial no diagnóstico da doença, onde demonstraram elevada assertividade no enquadramento do historial e sintomatologia clínica no momento de decisão.

A vacinação revela-se numa importante ferramenta para o controlo da doença, ao revelar-se numa medida sanitária de fácil execução e com uma relação custo-benefício razoável. Isto faz com que seja uma das medidas mais frequentemente adotadas. Contudo, esta medida

profilática de forma isolada não permite o controlo estrito do agente. Quando devidamente aplicada em conjunto com medidas estritas de biossegurança e medidas higio-sanitárias dentro da exploração, constituem um importante plano para a redução dos impactos da doença e possivelmente tentar erradicá-la da exploração.

A criação de estatutos sanitários que rotulassem explorações e dos seus produtos como “Livre de Map” poderia constituir um ponto de partida para um possível programa de erradicação do agente das explorações.

5. BIBLIOGRAFIA

- Afonso, A., Valentim, R., Vila, A., Prendes, S., Maurício, R., Mendonça, A., *et al.* (2014). Seroprevalência de *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* em caprinos de raça Serrana em Portugal
- Agdestein, A., Jones, A., Flatberg, A., Johansen, T., Heffernan, I., Djønne, B., *et al.* (2014). Intracellular growth of *Mycobacterium avium* subspecies and global transcriptional responses in human macrophages after infection. *BMC Genomics*, pp. 15-58.
- Balows, A., Hausler, J., Herrmann, L., Isenberg, D., Shadomy, J., (1991). *Mycobacterium*. In: American Society of Microbiology (Ed.) Manual of clinical Microbiology. 5ª edição ed. Washington, DC, American Society for microbiology, pp. 304-340.
- Barasona, J. (2013). Effectiveness of cattle operated bump gates and exclusionfences in preventing ungulate multi-host sanitary interaction
- Bastida, F., & Juste, R. (2011). Paratuberculosis control: a review with a focus on Vaccination
- Beaver, A., Sweeney, R., Hovingh, E., Wolfgang, D., Gröhn, Y., Schukken, Y. (2017). Longitudinal relationship between fecal culture, fecal quantitative PCR, and milk ELISA in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infected cows from low-prevalence dairy herds
- Benton, C., Delahay, R., Smith, F., Robertson, A., McDonald, R., Young, A. *et al.* (2018). Inbreeding intensifies sex-and age-dependent disease in a wild mammal
- Boersema, S., Mee, J., Noordhuizen, J., Silva, J. (2010). Farm health and productivity management of dairy young stock. Wageningen Academic Publishers.
- Bolster, C., Cook, K., Haznedaroglu, B., Walker, S. (2008). The transport of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* through saturated aquifer materials

Brooks, G., Butel, J., Morse, S. (2005). Micobactérias. In: The Mc Graw-Hill Companies (Ed.) *Microbiologia Médica*. 22ª edição ed., pp. 259-266.

Bryant, J., Thibault, V., Smith, D., McLuckie, J., Heron, I., Sevilla, I., *et al.* (2015). Phylogenomic exploration of the relationships between strains of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. BMC Genomics In press.

Buczinski, S., Arsenault, J., Kostoulas, P., Corbière, F., Fecteau, G., Dendukuri, N. (2019). Accuracy of paratuberculosis diagnostic tests in small ruminants: protocol for a systematic review and meta-analysis

Buergelt, C.D., Bastianello, S.S., Michel, A.L. (2004). Paratuberculosis. In Coetzer, J.A.W. & Tustin, R.C., Infectious Diseases of Livestock (2ª ed. pp. 1994-2004). Cape Town: Oxford University Press Southern Africa.

Cayrou C, Turenne C, Behr MA, Drancourt M. (2010). Genotyping of *Mycobacterium avium* complex organisms using multispacer sequence typing. Microbiology. 2010; 156:687–94.

Chaubey, K., Singh, S., Gupta, S., Singh, M., Sohal, J., Kumar, N., *et al.* (2017). *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* - an important food borne pathogen of high public health significance with special reference to India: an update

Coelho, A., Pinto, M., Coelho, A., Aires, A., Rodrigues, J. (2010). A seroepidemiological survey of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in sheep from North of Portugal

Coetsier, C., Vannuffel, P., Blondeel, N., Denef, J., Cocito, C., Gala, J. (2000). Duplex PCR for differential identification of *Mycobacterium bovis*, *M. avium*, and *M. avium* subsp. *paratuberculosis* in formalin- fixed paraffin-embedded tissues from cattle. J Clin Microbiol 38(8): 3048-3054.

Cook, K., Bolster, C., Britt, J., Rothrock, M. (2010). Effect of Watering Trough Chlorination on Persistence of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*

Cook, K., Britt, J., Bolster, C. (2009). Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in biofilms on livestock watering trough materials

Corbett, C., De Buck, J., Orsel, K., Barkema, H. (2017). Fecal shedding and tissue infections demonstrate transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in group-housed dairy calves

Daniels, M., Henderson, D., Greig, A., Stevenson, K., Sharp, J., Hutchings, M. (2003). The potential role of wild rabbits *Oryctolagus cuniculus* in the epidemiology of paratuberculosis in domestic ruminants

de Juan, L., Mateos, A., Domínguez L, Sharp, J., Stevenson, K. (2005). Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates from goats detected by pulsed-field gel electrophoresis. *Vet Microbiol* 106:249–257.

Dhand, N., Toribio, J., Whittington, R. (2009 a). Adsorption of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* to Soil Particles

Dhand, N., Eppleston, J., Whittington, R., Toribio, J. (2009 b) Association of farm soil characteristics with ovine Johne's disease in Australia

Driemeier, D., Cruz, C., Gomes, M., Corbellini, L., Loretti, A., Colodel, E. (1999). Aspectos clínicos e patológicos da Paratuberculose em bovinos no Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 19(3/4): 109-115. Sector de Patologia Veterinária, Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

Facciuolo, A., Gonzalez-Cano, P., Napper, S., Griebel, P., Mutharia, L. (2016). Marked Differences in Mucosal Immune Responses Induced in Ileal versus Jejunal Peyer's Patches to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Secreted Proteins following Targeted Enteric Infection in Young Calves

Fernandez, B., Colavecchia, S.B., Ingrassia, G.G., Jolly, A., Stempler, A., Fortuny, M.L., *et al.* (2019). Early IgG2 in calves experimental infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

Garcia, A., & Shalloo, A. (2015). *Invited review: The economic impact and control of paratuberculosis in cattle*

González-Pérez, M., Mariño-Ramírez, L., Parra-López, C., Murcia, M., Marquina, B., Mata-Espinoza, D., *et al.* (2013). Virulence and immune response induced by *Mycobacterium avium* Complex Strains in a Model of Progressive Pulmonary Tuberculosis and Subcutaneous Infection in BALB/c Mice. *Journal Infection and Immunity*, 81(11), pp.4001-4012.

Grant, I., Ball, H., Rowe, M. (2002). Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in bulk raw and commercially pasteurized cows' milk from approved dairy processing establishments in the United Kingdom. *Appl Environ Microbiol* 68(5): 2428-2435

Hansen, S., Roller, M., Alslim, L., Böhlken-Fascher, S., Fechner, K., Czerny, C. *et al.* (2019). Development of Rapid Extraction Method of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* DNA from Bovine Stool Samples

Harris, N., & Barletta, R. (2001). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(3): 489-512.

Hett, E., & Rubin, E. (2008). Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective. *Microbiol Mol Biol Rev* 72(1): 126-156, table of contents.

Jakobsen, M., Alban, L., Nielsen, S. (2000). A cross-sectional study of paratuberculosis in 1155 Danish dairy cows.

Johnson, M., & Odell, J. (2014). Nontuberculous mycobacterial pulmonary infections. *Journal of Thoracic Disease*, 6(3), pp.210-220.

- Li, L., Bannantine, J., Zhang, Q., Amonsin, A., May, B., Alt, D., *et al.* (2005). The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*.
- Liu J., Barry C. E., Besra, G., Nikaido, H. (1996). Mycolic Acid Structure Determines the Fluidity of the Mycobacterial Cell Wall, *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 271, pp 29545–29551.
- Liu, X., Li, J., Yang, X., Wang, D., Wang, J., Wu, J. (2017). The seroprevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy cattle in Xinjiang, Northwest China
- Lombard, J. (2011). Epidemiology and economics of paratuberculosis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 27(3): 525-535.
- Madigan, M., Martinko J., Dunlap P., Clark, D. (2009). *Brock Biology of Microorganisms*. 12th ed. Pearson Education Inc.
- Magombedze¹, G., Ngonghala, C., Lanzas, C. (2016). Evaluation of the “Iceberg Phenomenon” in Johne’s Disease through Mathematical Modelling
- Mainar-Jaime, R & Vázquez-Boland, J. (1998). Factors associated with seroprevalence to *Mycobacterium paratuberculosis* small ruminants’ farms in the Madrid regions (Spain).
- Matos, A., Figueira, L., Martins, M., Loureiro, F., Pinto, M., Matos, M., *et al.* (2014). Survey of *Mycobacterium avium* subespecies *paratuberculosis* in road-killed wild carnivores in Portugal
- Matos, A., Figueira, L., Martins, M., Matos, M., Álvares, S., Mendes, A., *et al.* (2017). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in kidney samples of red deer (*Cervus elaphus*) in Portugal: Evaluation of different methods
- McNees, A., Markesich, D., Zayyani, N., Graham, D. (2015). *Mycobacterium paratuberculosis* as a cause of Crohn's disease

- Mendes, S., Boinas, F., Albuquerque, T., Fernandes, L., Afonso, A., Amado, A. (2004). Epidemiological studies on Paratuberculosis in small ruminants in Portugal
- Mura, M., Bull, T., Evans, H., Sidi-Boumedine, K., McMinn, L., Rhodes, G., *et al.* (2005). Replication and Long-Term Persistence of Bovine and Human Strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* within *Acanthamoeba polyphaga*
- National Research Council 2003. *Diagnosis and Control of Johne's Disease*. Washington, DC: The National Academies Press
- Olsen, I., Barletta, R., Thoen, C. (2010). *Mycobacterium*. In Gyles, C., Prescott, J., Songer, G., Thoen, C. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals (4thed. pp. 113-126) Iowa: Blackwell Publishing.
- Pickup, R., Rhodes, G., Arnott, S., Sidi-Boumedine, K., Bull, T., Weightman, A., *et al.* (2004). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the Catchment Area and Water of the River Taff in South Wales, United Kingdom, and Its Potential Relationship to Clustering of Crohn's Disease Cases in the City of Cardiff
- Punati, R., Mallepaddi, P., Poonati, R., Maity, S., Sohal, J., Polavarapu, K., *et al.* (2019). Development and evaluation of LAMP-coupled lateral flow device for the detection of MAP in livestock at point of care resource-limited areas
- Quinn, P., Markey, B., Leonard, F., FitzPatrick, E., Fanning, S., Hartigan, P. (2011). Veterinary Microbiology and Microbial Disease pp. 250- 262
- Reis, A. (2015). On the trail of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium bovis* in mainland Portugal: a microbiological and molecular survey in wildlife
- Rhyan, J., & Spraker, T. (2010). Emergence of Diseases from Wildlife Reservoirs

Salgado, M., Alfaro, M., Salazar, F., Badilla, X., Troncoso, E., Zambrano, A., *et al.* (2015). Application of cattle slurry containing *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) to grassland soil and its effect on the relationship between MAP and free-living amoeba

Salgado, M., Alfaro, M., Salazar, F., Troncoso, E., Mitchell, R., Ramirez, L., *et al.* (2013). Effect of Soil Slope on the Appearance of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Water Running of Grassland Soil after Application of Contaminated Slurry

Salgado, M., Collins, M., Salazar, F., Kruze, J., Bolske, G., Soderlund, R., *et al.* (2011). Fate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* after Application of Contaminated Dairy Cattle Manure to Agricultural Soils

Salem, M., Heydel, C., El-Sayed, A., Ahmed, S., Zschöck, M., Baljer, G. (2013). *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: an insidious problem for the ruminant industry. *Trop Anim Health Prod* 45(2): 351-366.

Salem M, Heydel C, El-Sayed A, Ahmed SA, Zschöck M, Baljer G. (2012). *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: an insidious problem for the ruminant industry. *Trop Anim Health Prod* 45:351-366.

Samba-Louaka, A., Robino, E., Cochard, T., Branger, M., Delafont, V., Aucher, W., *et al.* (2018). Environmental *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Hosted by Free-Living Amoebae

Sardaro, R., Pieragostini, E., Rubino, G., Petazzi, F. (2017). Impact of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* on profit efficiency in semi-extensive dairy sheep and goat farms of Apulia, southern Italy.

Scherrer, S., Stephan, R., Zumthor, J., Kipar, A., Seehusen, F. (2019). Morphological and Molecular Characterization of a New *Mycobacterium avium* Subsp. *paratuberculosis* S-Type Strain Genotype in Goats

Schorey, J., & Sweet, L. (2008). The mycobacterial glycopeptidolipids: structure, function, and their role in pathogenesis. *Glycobiology*, 18(11), pp.832-841.

Shippy, D., Lemke, J., Berry, A., Nelson, K., Hines, M., Talaat, A. (2016). Superior Protection from Live-Attenuated Vaccines Directed against Johne's Disease

Sonawane, G., & Tripathi, N. (2018). Comparative diagnosis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in the tissues of clinical and subclinical sheep of paratuberculosis endemic farm

Stabel, J., & Bannantine, J. (2005). Development of a nested PCR method targeting a unique multicopy element, ISMap02, for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in, fecal samples. J Clin Microbiol 43(9): 4744-4750

Stau, A., Seelig, B., Walter, D., Schroeder, C., Ganter, M. (2012). Seroprevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in small ruminants in Germany

Stevenson, K. (2015). Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and the influence of strain type on infection and pathogenesis: a review. Vet Res 46:64.

Stevenson, K. (2010) Comparative Differences between Strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Em Behr, M., Collins, D. Paratuberculose: Organism, Disease, Control. London, UK; 2011: 126-133.

Tasara, T., & Stephan, R. (2005). Development of an f57 sequence-based real-time PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. Appl Environ Microbiol 71(10): 5957-5968.

The Center for Food Security & Public Health – Iowa State University – (2017) Paratuberculosis

Thorel, M., Krichevsky, M., Frébault, V. (1990). Numerical Taxonomy of Mycobactin-Dependent Mycobacteria, Emended Description of *Mycobacterium avium*, and Description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology, 40(3):254-260.

Timms, V., Gehring, M., Mitchell, H., Daskalopoulos, G., Neilan, B. (2011). How accurately can we detect *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection? J Microbiol Meth 85:1-8.

Turenne, C., Collins, D., Alexander, D., Behr, M. (2008). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. avium* subsp. *avium* are independently evolved pathogenic clones of a much broader group of *M. avium* organisms. J Bacteriol 190(7): 2479-2487.

University of Wisconsin – Madison. School of Veterinary Medicine (2019) Johne's Information Center. Acedido a 17 outubro de 2019 em <https://johnes.org/general-information/history/>

van den Esker, M., & Koets, A. (2019). Application of Transcriptomics to Enhance Early Diagnostics of Mycobacterial Infections, with an Emphasis on *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*

Van Metre, D., Tennant, B., Whitlock, R. (2008). Johne's Disease (Paratuberculosis). In Divers, T.J. & Peek, S.F., Rebhun's diseases of dairy cattle (2^aed. pp.279-283). St. Louis: Saunders Elsevier.

van Schaik, G., Rossiter, C., Stehman, S., Shin, S., Schukken, Y. (2003). Longitudinal study to investigate variation in results of repeated ELISA and culture of fecal samples for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in commercial dairy herds

Whan, L., Grant, I., Rowe, M. (2006). Interaction between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and environmental protozoa

Wiethoelter, A. (2014). Global trends in infectious diseases at the wildlife–livestock interface

Whittington, R., Donat, K., Weber, M., Kelton, D., Nielsen, S., Eisenberg, S., *et al.* (2019). Control of paratuberculosis: who, why and how. A review of 48 countries

Whittington, R., Marshall, D., Nicholls, P., Marsh, I., Reddacliff, L. (2004). Survival and Dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the Environment

Whittington, R., Marsh, I., Reddacliff, L., (2005) - Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Dam Water and Sedimen

Whittington, R., Marsh, I., Whitlock, R. (2001). Typing of IS1311 polymorphisms confirms that bison (*Bison bison*) with paratuberculosis in Montana are infected with a strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* distinct from that occurring in cattle and other domesticated livestock. Mol Cell Probes 15:139–145.

Whittington, R., Marsh, I., Taylor, P., Marshall, D., Taragel, C., Reddacliff, L. (2003). Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from environmental samples collected from farms before and after destocking sheep with paratuberculosis

Wolf, R., Barkema, H., De Buck, J., Slomp, M., Flaig, J., Haupstein, D., *et al.* (2014). High herd-level prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Western Canadian dairy farms, based on environmental sampling

Zarei-Kordshouli, F., Geramizadeh, B., Khodakaram-Tafti, A. (2019). Prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* IS 900 DNA in biopsy tissues from patients with Crohn's disease: histopathological and molecular comparison with Johne's disease in Fars province of Iran