

Pedro Vargas Madeira Palma Amaro

**Estudo da presença de *Mycobacterium avium*
subespécie *paratuberculosis* numa exploração
leiteira no Litoral Centro de Portugal Continental**

Orientador: Dr. José Pedro Lima

Co-orientadora: Prof. Dra. Ângela Dâmaso

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia

Departamento de Medicina Veterinária

Lisboa

2013

Pedro Vargas Madeira Palma Amaro

**Estudo da presença de *Mycobacterium avium*
subespécie *paratuberculosis* numa exploração
leiteira no Litoral Centro de Portugal Continental**

Tese apresentada para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária no curso de Mestrado integrado em Medicina Veterinária conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.

Orientador: Doutor José Pedro Lima
Co-Orientadora: Professora Doutora
Ângela Dâmaso

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Departamento de Medicina Veterinária

Lisboa

2013

Todas as afirmações efetuadas no presente documento são da exclusiva responsabilidade do autor, não cabendo qualquer responsabilidade à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias pelos conteúdos nele apresentados.

Agradecimentos

A realização e conclusão deste estudo não teria sido possível sem a intervenção e a colaboração de algumas pessoas às quais gostaria de agradecer de forma sentida.

Em primeiro lugar um agradecimento especial à minha família, principalmente aos meus pais, que me deram a possibilidade de frequentar o curso de Medicina Veterinária e por serem responsáveis pelo que sou hoje.

À minha namorada, pela força que sempre me transmitiu e acima de tudo pela sua amizade e confiança que sempre demonstrou desde que nos conhecemos.

Ao Dr. Miguel Madeira, pela disponibilidade e pelo apoio que sempre me deu ao longo da realização deste trabalho.

Ao Dr. José Pedro Lima, agradeço a disponibilidade, a paciência, a amizade e acima de tudo a transmissão de conhecimentos durante o estágio curricular bem como a possibilidade de adquirir experiência na área em que trabalha.

À Professora Doutora Ângela Dâmaso, pela disponibilidade e o apoio prestado ao longo da realização deste estudo.

Ao senhor Álvaro Resende e sua esposa Silvina, que para além de me permitirem realizar este trabalho na sua exploração me acolheram em sua casa como se um amigo de longa data se tratasse.

Para finalizar, um agradecimento aos meus amigos mais chegados e colegas de curso, que de alguma maneira contribuíram para a minha formação, pessoal e profissional.

Resumo

A Paratuberculose, conhecida também como Doença de Johne, é uma afeção infecciosa que provoca uma enterite granulomatosa crónica causada pelo agente *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* (Map). É uma doença de carácter contagioso, de distribuição mundial, atingindo os mamíferos, particularmente os pequenos e grandes ruminantes, equinos, suínos, búfalos, coelhos, etc.

Tem um grande impacto económico, nomeadamente na redução da produção leiteira, na redução dos teores de proteína no leite, na susceptibilidade a outras doenças, no refugo de animais e no aumento dos custos na sanidade.

Pensa-se que também terá impacto a nível de Saúde Pública uma vez que o Map pode estar associado á doença de Crohn em humanos em que o leite cru, leite em pó ou leite pasteurizado podem ser os veículos de transmissão, porém não existem estudos suficientes para sustentar este acontecimento.

A técnica de diagnóstico “Gold Standard” é a cultura microbiológica de fezes, no entanto é um procedimento muito demorado podendo levar até 4 meses para se observarem as colónias bacterianas, uma vez que o seu crescimento é muito lento. Deste modo, existem outros testes, tais como o PCR e ELISA, com elevada especificidade para o agente que fornecem resultados mais rápidos e que permitem minimizar os falsos-positivos, apesar da sua reduzida sensibilidade (por volta dos 50%).

Este estudo é baseado na observação das instalações da exploração e consequente comparação com parâmetros analisados e documentados em literatura. Para além disso, são utilizadas informações fornecidas pelo Software da exploração com o intuito de estudar a incidência da Paratuberculose, ao longo dos anos, de modo a comprovar se as medidas de manejo e de higiene adotadas pela exploração afetada contribuem ou não de alguma maneira para o controlo/erradicação da doença de Johne.

Palavras-chave: Map, *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis*, Enterite Granulomatosa crónica, Doença de Crohn, Paratuberculose.

Abstract

Paratuberculosis, known as well as Johne's Disease, it's an infectious affection that cause a chronic granulomatous enteritis by the *Mycobacterium avium* subspecie *paratuberculosis* (Map) agent. It's a contagious disease, with global distribution, which affects mammals, especially all kinds of ruminants, horses, pigs, buffalos, rabbits, etc.

Cause great economic impact as the reduction of milk production, milk protein decrease, others disease susceptibility, rejected animals and the increase of sanity costs.

Seems to have impact into public health, since the Map can be associated to Crohn's Disease in humans in which the raw milk, powdered milk or pasturated milk can be the transmission vehicles, however there are no studies that prove this event.

The gold standard diagnostic test is the microbial culture, however is a lengthy procedure that takes around 4 months to observe the bacterial colonies because of his very slow growth. The PCR and ELISA tests, that have a very high specificity to the agent, presents more quickly results than others and also allow the reduce of false-positive results despite his low sensibility which is about 50%.

This study is based on the observation of each farm areas and the consequent comparison with analyzed parameters and information from literature. In addition, information from dairy farm Software is used to study the Paratuberculosis incidence over the years, to prove the efficiency of management and hygiene measures applied on this dairy farm and if they contribute for the control or eradication of Johne's disease.

Keywords: Map, *Mycobacterium avium* subspecie *paratuberculosis*, chronic granulomatous enteritis, Crohn Disease, Paratuberculosis.

Lista de Siglas e Abreviaturas

AAR – Álcool-ácido-resistente

ADN – Ácido desoxirribonucleico

AGID – Agar Gel Immunodiffusion

CD – Crohn Disease

DGS – Direção Geral de Saúde

DGV – Direção Geral de Veterinária

ELISA - Enzyme-linked immunosorbent assay

GALT - Gut-Associated lymphoid tissue

GEDII – Grupo de Estudos da Doença Inflamatória Intestinal

HACCP – Hazard Analysis and Critical Control Points

HEYM - Herrold's Egg Yolk Medium

IgG – Imunoglobulina tipo G

IL - Interleucina

LAM - Lipoarabinomannan

Map – Mycobacterium avium subespécie paratuberculosis

PCR – Polimerase Chain Reaction

TNF – Fatores de Necrose Tumoral

UHT – Ultra High Temperature

UE – União Europeia

TAC – Tomografia Axial Computorizada

® - Produto registado

γ-INF – Gama Interferão

Lista de símbolos

dl - Decilitro

Kb – Kilo-base pair

Kg- Quilograma

L – litro

µm – Micrómetro

mm – Milímetro

€ - Euro

mg - Miligrama

% - Percentagem

cm - Centímetro

°C – Graus Celsius

Índice Geral

Agradecimentos	1
Resumo	2
Abstract	3
Lista de Siglas e Abreviaturas	4
Lista de símbolos	5
Índice Geral	6
Índice de Figuras	8
Índice de Tabelas	9
Introdução	10
1. Paratuberculose	10
1.1. Nota Histórica	11
1.2. Classificação e descrição do agente etiológico	13
1.2.1. Caracterização do agente	13
1.2.2. Localização e multiplicação da bactéria no hospedeiro	16
1.3. Manifestação em ruminantes	19
1.3.1. Sinais Clínicos	19
1.3.2. Achados de necrópsia	21
1.4. Diagnóstico laboratorial da Paratuberculose	23
1.4.1. Pesquisa direta do agente	26
1.4.1.1. Isolamento por cultura microbiológica convencional	26
1.4.1.2. Isolamento por cultura microbiológica radiométrica (Sistema BACTEC)	27
1.4.1.3. Técnica de amplificação genética através da prova de PCR	28
1.4.1.4. Exame histopatológico de biopsias intestinais e de linfonodos mesentéricos	28
1.4.2. Pesquisa indireta do agente	29
1.4.2.1. ELISA	29
1.4.2.2. Fixação do Complemento	30
1.4.2.3. Teste AGID (Agar Gel Immunodiffusion)	30
1.4.2.4. Teste de Gamma- Interferão	30
1.4.2.5. Teste de sensibilidade através de inoculação intradérmica	31
1.4.2.6. Teste de Transformação de Linfócitos	31
1.5. Epidemiologia	31
1.5.1. Transmissão entre animais e fontes de infeção	31
1.6. Medidas de Biossegurança	33
1.7. Controlo da doença e medidas profiláticas	34
1.7.1. Tratamento e profilaxia	34

1.7.1.1. Antibioterapia	34
1.7.1.2. Profilaxia através de vacinação	35
1.7.2. Intervenções sanitárias	36
1.7.2.1. Maneio na exploração	36
1.7.2.2. Higienização da exploração	37
1.7.2.3. Pasteurização do leite	38
1.8. Paratuberculose em Portugal	39
2. Material	41
2.1. Caracterização da exploração e dos animais em estudo	41
2.1.1. Produção leiteira	42
2.1.2. Maneio da exploração	42
2.1.2.1. Estabulação	42
2.1.2.2. Alimentação	43
3. Métodos	44
3.1. Observação da exploração e recolha de dados	44
3.1.1. Maneio nos parques	44
3.1.2. Maneio de controlo de animais seropositivos e seronegativos a ELISA	45
3.1.3. Maneio na ordenha	45
3.1.4. Maneio da pastagem	45
3.1.5. Dados obtidos do Software de gestão da exploração	46
3.1.6. Cálculos a partir dos dados do Software	46
3.1.7. Análise estatística	46
4. Resultados	47
4.1. Medidas de maneio profilático e sua avaliação	47
4.1.1. Maneio nos parques	47
4.1.2. Maneio de controlo de animais seropositivos e seronegativos a ELISA	49
4.1.3. Maneio na sala de ordenha	50
4.1.4. Maneio da pastagem	51
4.2. Dados obtidos através do Software de gestão da exploração	53
4.2.1. Efetivo na exploração	53
4.2.2. Número de animais refugados anualmente por Paratuberculose	54
4.3. Análise estatística	55
4.3.1. Variação do efetivo anual na exploração	55
4.3.2. Taxa de refugo anual	56
Discussão	57
Conclusão	60
Bibliografia	61

Índice de Figuras

Figura 1 - Mycobacterium Avium Paratuberculosis através de microscopia eletrónica de varrimento.....	14
Figura 2 - Genoma K-10 do Mycobacterium avium subespécie paratuberculosis.....	16
Figura 3 - Processo de fagocitose do Mycobacterium avium subespécie paratuberculosis por parte dos macrófagos (Adaptado de Barrow, 1997).....	19
Figura 4 - Silagem de milho produzida na exploração.....	43
Figura 5 - Amamentação dos vitelos na exploração.....	43
Figura 6 - Cubículos num dos parques de animais de produção da exploração.....	49
Figura 7 - Número de vacas refugadas por Paratuberculose desde 2008 a 2011.	54

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Animais positivos à Paratuberculose declarados á DGV entre 1998 e 2002.....	39
Tabela 2 - Grupos de animais da exploração e respetivo parque em Dezembro de 2011. ...	41
Tabela 3 - Produção diária da exploração em média em Dezembro de 2011.....	42
Tabela 4 - Avaliação do manejo nos parques.....	48
Tabela 5 - Avaliação do manejo de controlo de animais seropositivos e seronegativos a ELISA.	50
Tabela 6 - Avaliação do manejo na ordenha.	51
Tabela 7 - Avaliação do manejo da pastagem.....	52
Tabela 8 - Médias mensais do efetivo bovino da exploração desde Janeiro de 2008 até Novembro de 2011.	53
Tabela 9 - Efetivo anual da exploração desde Janeiro de 2008 a Novembro de 2011.....	55
Tabela 10 - Refugo de animais por Paratuberculose desde Janeiro de 2008 a Novembro de 2011.	56

Introdução

1. Paratuberculose

A Paratuberculose, ou Doença de Johne, tem sido descrita como uma afeição que implica grandes perdas económicas bem como representa uma ameaça para a Saúde Pública (Driemeier et al., 1999). Há cada vez mais evidências científicas que indicam que existe uma ligação entre a Paratuberculose em rebanhos leiteiros e doença de Crohn em humanos (Chamberlin et al., 2001).

O agente que causa a Paratuberculose, o *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis*, é reconhecido como uma micobactéria patogénica, intracelular, gram-positiva, com uma capacidade específica comprovada para iniciar e manter a infeção sistémica e inflamação crónica do intestino em muitas espécies animais, incluindo primatas e humanos. Os animais são geralmente infetados por ingestão, através do solo, ração, água e objetos existentes na exploração, que estejam contaminados com fezes de animais infetados (Chamberlin et al., 2001; Van Metre, 2008).

A susceptibilidade à doença é desencadeada por vários fatores de stress, nomeadamente doenças concomitantes, fatores genéticos, fatores ambientais, entre outros. Devido ao facto de a maioria dos animais serem assintomáticos e os casos clínicos que diminuem a produção serem abatidos antes de serem diagnosticados, a verdadeira incidência da doença de Johne é difícil de estimar. Esta bactéria é conhecida por sobreviver a condições ambientais adversas, principalmente em regiões com solos ácidos. (Van Metre et al., 2008).

A doença de Johne é uma doença de carácter crónico nos bovinos, caracterizada na sua generalidade por infeções subclínicas sem evidência de infeção, enquanto a pequena porção de casos clínicos representa uma pequena minoria (5%) do total de animais afectados pelo organismo numa exploração. Nos pequenos ruminantes, a doença clínica é semelhante á observada nos bovinos, exceto na ocorrência de diarreia. Noutros ruminantes, a doença tem um curso longo e provoca grandes perdas de massa corporal (Van Metre et al., 2008).

Vacas com sinais avançados da doença de Johne são mais fáceis de suspeitar de apresentarem a patologia devido á diarreia, hipoproteinémia, perda na produção, perda de peso e deterioração da condição corporal (Buergelt et al., 2004). A confirmação do diagnóstico clínico da doença de Johne deve focar-se na cultura microbiológica com Agar Gel Immunodiffusion (AGID), ELISA ou teste de PCR. As lesões macroscópicas e histológicas obtidas na necropsia ou no matadouro são extremamente úteis para determinar um diagnóstico definitivo (Buergelt et al., 2004).

Embora seja raro fazer-se tratamento, existem opções terapêuticas que geralmente são utilizadas em animais com grande valor genético com o intuito de aliviar os sinais clínicos da doença, bem como para evitar a transmissão para os outros animais da exploração. (Van Metre et al., 2008).

As vacinas para a doença de Johne têm sido utilizadas na Europa, Austrália e em alguns estados dos Estados Unidos da América. Contudo, a vacina não previne a infecção mas os animais vacinados excretam menos organismos nas fezes, assim como previne o aparecimento antecipado dos sinais clínicos nos animais vacinados (Van Metre et al., 2008).

1.1. Nota Histórica

O primeiro caso confirmado de Paratuberculose foi identificado em Dresden, na Alemanha, pelo Dr. Albert Johne e pelo seu colega, Dr. Langdon Frothingham, em 1894, cujo animal, proveniente de Odenberg, apresentava sintomas que coincidiam com sintomas característicos da Tuberculose, no entanto, com teste tuberculínico negativo. (Chiodini, 2005; Collins & Manning, 2001).

Para além das lesões descritas, Johne e Frothingham observaram, com a ajuda de um corante específico, a presença abundante de bactérias álcool-ácido-resistentes, corados de vermelho, nos tecidos inflamados analisados. Apesar destas bactérias se assemelharem com as células causadoras da Tuberculose, estas não originaram doença, quando amostras de tecido infetado contendo o agente foram injetadas em cobaias, levando à conclusão que a doença presente, apelidada de “enterite pseudogranulomatosa”, uma vez que se assemelhava à tuberculose intestinal causada pela bactéria *Mycobacterium Bovis*, tinha origem noutra bactéria, o *Mycobacterium avium* (Collins & Manning, 2001).

O nome de Paratuberculose surgiu em 1906, através do Professor Bernhard Bang (Collins & Manning, 2001). Este, através de testes de hipersensibilidade, descobriu que os animais doentes apresentavam uma resposta deficiente à injeção intradérmica de tuberculina provenientes do bacilo da Tuberculose, e no entanto pareciam responder à tuberculina aviária, o que poderia ajudar no diagnóstico desta nova patologia (Chiodini, 2005).

Alguns anos mais tarde, em 1910, o cientista britânico Frederick Twort foi o responsável pelo isolamento da bactéria da Paratuberculose, através de cultura microbiológica do agente (Chiodini, 2005). Um tanto ou quanto accidental, Twort conseguiu observar as pequenas colónias a crescer em redor de colónias de grandes dimensões de outras bactérias provenientes da falta de higiene do material que utilizou (Collins & Manning, 2001).

Após identificar as grandes colónias de bactérias contaminantes como sendo os bacilos presentes no feno, o *Mycobacterium phlei*, e suspeitando que a bactéria *M. phlei* estava a fornecer alguns nutrientes essenciais á nova bactéria, Twort destruiu as colónias de *M. Phlei* através do uso de uma fonte de calor no meio de cultura que iria depois utilizar no crescimento do novo agente. Assim sendo, provou que o novo meio de cultura que criou suportava o crescimento da nova bactéria, e decidiu chamá-la *Mycobacterium enteriditis chronicae pseudotuberculosis bovis* Johne (Collins & Manning, 2001; Chiodini, 2005).

No mesmo ano em que Twort conseguiu isolar a bactéria causadora da doença de Johne, Holth também merece parte do crédito desta descoberta dado que também conseguiu isola-lo independentemente de Twort. O isolamento realizado por Holth foi conseguido através de um plano experimental, e não ao acaso como foi no caso de Twort. Para além disso, Holth acreditava que poderia haver outras espécies deste organismo, o bacilo paratuberculoso segundo ele.

A partir deste momento, com o isolamento do agente etiológico da doença e a extração de seus antígenos, um novo caminho estava traçado na descoberta da biologia e patogenicidade deste organismo e no desenvolvimento de novos testes de diagnóstico, tais como a fixação de complemento, aglutinação, o teste de pele, entre outros.

Vallée Ringard, em 1923, através de testes de transmissão do agente, notou que a inoculação subcutânea do agente não desencadeava a doença. Essa descoberta rapidamente levou ao desenvolvimento de uma vacina inoculada por via subcutânea. No mesmo ano, foi publicada a primeira edição do “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology”, adaptando a nomenclatura de Bang e Holth, nomeando a doença de “*Paratuberculosis*” e o seu agente etiológico de *Mycobacterium paratuberculosis*.

Entre 1922 e 1935, alguns países começaram a executar algumas medidas de controlo, tendo mesmo a Organização Mundial da Saúde solicitado a sua classificação bem como normas de regulação como já tinha outrora acontecido com a brucelose (Chiodini, 2005).

Em 1951 o cientista holandês Jacob Jansen, foi o primeiro a descobrir a influência dos fatores ambientais na ocorrência da doença, mais propriamente a associação entre o pH do solo e a incidência de doença de Johne (Collins & Manning, 2001).

A década de 50 fica também marcada no que toca aos estudos relacionados com a vacinação, como forma de controlo da Paratuberculose.

No decorrer dos anos seguintes, foram feitas algumas descobertas epidemiológicas significativas relativamente á excreção do agente bem como a sua transmissão para outros animais (Collins & Manning, 2001).

Em 1984, foi descoberta a primeira evidência de uma relação entre o bacilo *M. paratuberculosis* em bovinos e a Doença de Crohn em humanos, embora já tivesse sido

observado, em meados de 1800, as semelhanças entre estas duas patologias (Chiodini, 2005).

Foi no ano de 1989 que se iniciou a nova era da pesquisa da Paratuberculose, com a descoberta de um elemento genético exclusivo do *M. paratuberculosis*, o IS900. Esta sequência de nucleótidos do DNA cromossômico do organismo foi descoberta de forma simultânea e independente por Des Collins, na Nova Zelândia, e pela equipa de pesquisa liderada por J.J. McFadden em Inglaterra (Collins & Manning, 2001).

Esta descoberta proporcionou o desenvolvimento de ferramentas genéticas para a deteção de *M. paratuberculosis*, sem necessitar de se cultivar a bactéria em laboratório, processo esse algo moroso, bem como a melhoria dos meios de diagnóstico (Collins & Manning, 2001; Chiodini, 2005).

Um ano depois, Marie Thorel e os seus colaboradores publicaram as suas descobertas relativas a análise da genoma do *M. paratuberculosis* e concluíram que o *M. paratuberculosis* pertencia ao complexo *M. avium*. Desta forma, sugeriram classificar o *M. paratuberculosis* como sendo uma subespécie de *M. avium*, passando a ter como nomenclatura *Mycobacterium avium subespécie paratuberculosis*, vulgarmente abreviado como Map (Chiodini, 2005).

Desde a década de 90 em diante, vários cientistas, por todo o globo, desenvolveram novos testes de diagnóstico, programas de controlo mais completos, através de colaborações eficazes entre instituições e países (Collins & Manning, 2001).

1.2. Classificação e descrição do agente etiológico

1.2.1. Caracterização do agente

Mycobacterium avium subespécie paratuberculosis, a causa da Paratuberculose, mais conhecida por doença de Johnne, é uma bactéria intracelular, Gram-positiva e álcool-ácido-resistente (Van Metre et al., 2008). Tanto nas fezes como nos tecidos onde se encontra, o agente apresenta-se sob a forma de aglomerados, uma característica que ajuda na sua identificação. Esse aglomerado de bacilos deve-se a existência de uma rede de filamentos intracelulares (Buergelt et al., 2004).

Pertence à ordem *Actinomycetales* e Família *Mycobacteriaceae*. O género *Mycobacterium* é constituído pelo complexo *Mycobacterium tuberculosis* (Tuberculose em Humanos), o complexo *Mycobacterium avium* e por outras micobactérias e numerosas espécies saprófitas presentes no solo e na água (Harris & Barletta, 2001; Thorel et al., 1990).

As espécies de *Mycobacterium* podem ser confundidas com outros géneros como é o caso do *Corynebacterium* spp, *Nocardia* spp ou *Rhodococcus* spp.

As bactérias causadoras da Paratuberculose são bacilos finos aeróbios com 0,2-0,7µm de diâmetro e 1- 10µm de comprimento, esporuladas, sem cápsula, quimiorganotróficos e as suas colónias são rugosas, de cor rosa, amarela ou laranja quando expostas á luz e são visíveis após 2-20 dias a temperaturas ótimas de crescimento (Gomes, 2011).

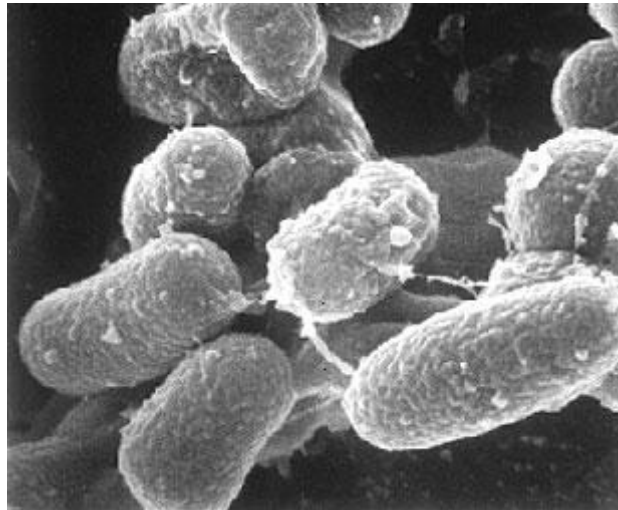


Figura 1 - *Mycobacterium Avium Paratuberculosis* através de microscopia eletrônica de varrimento (Adaptado de Collins & Manning, 2001)

As pequenas colónias primárias possuem 1 a 5 mm de diâmetro, são húmidas, convexas e geralmente são despigmentadas ou esbranquiçadas. A contagem dessas colónias pode fornecer informação quanto á quantidade de bactérias que está a ser excretada (Buergelt et al., 2004).

A aparência das colónias na cultura microbiológica vai contribuir para a distinção entre espécies de *Mycobacterium*. Para isso, é necessário garantir o crescimento destas espécies, favorecido pelo uso de piruvato de sódio e glicerol, permitindo posteriormente a sua diferenciação. Na deteção do Map é utilizada a micobactina, uma substância química sintetizada laboratorialmente por organismos vivos com o objetivo de transportar ferro para as células, já que é a única micobactéria dependente desta substância (Quinn et al., 2002). São organismos catalase-positivos, resistentes á liozina e distribuem-se amplamente pelo solo e pela água (Gomes, 2011).

As principais características microbiológicas do Map que permite a sua distinção das restantes bactérias são o seu crescimento lento e a sua dependência de micobactina exógena que é utilizada pela bactéria como um quelante de ferro na respiração. O Map

precisa de grandes níveis de ferro para realizar a sua multiplicação *in vitro*, ao contrário das restantes micobactérias (Buergelt et al., 2004).

São descritas como sendo álcool-ácido-resistentes, uma vez que, após a coloração, resistem ao efeito descolorizante do álcool ou de ácidos minerais fortes. Esta propriedade AAR está relacionada à grande quantidade de material lipídico bem como ácido micólico presente na parede celular, que tem um papel essencial na identificação das micobactérias. A técnica de coloração Ziehl-Neelsen deve ser cuidadosamente realizada, pois a coloração facilmente se desfaz (Olsen et al 2010; Gomes, 2011).

O ADN do Map é aproximadamente 99% idêntico ao do *Mycobacterium avium*. O genoma K-10 do Map foi totalmente descodificado, contendo uma alta proporção de guanina e citosina, cerca de 69%, e um grande número de sequências de inserção, sendo o IS900 a primeira sequência a ser descoberta em qualquer espécie de micobactérias, reconhecida como original do Map (Collins & Manning, 2001).

Estudos genéticos revelam que o Map é um clone de organismos estreitamente relacionados derivado do pai *Mycobacterium avium subespécie hominissuis*. Apesar da similaridade genética, o fenótipo permite distinguir o Map dos outros membros do complexo *Mycobacterium avium* (Collins & Manning, 2001).

Este organismo é extremamente resistente graças às paredes ricas em lípidos que tornam estes agentes hidrofóbicos, resistentes a ambientes adversos, durante períodos de aproximadamente um ano, na presença de baixas temperaturas e humidade, e resistente a desinfetantes. (Gomes, 2011; Quinn et al., 2002). Todavia, a viabilidade destes organismos decresce quando as temperaturas são mais elevadas e o ambiente é seco (Van Metre et al., 2008). Estes agentes podem ser encontrados no solo, na vegetação e na água (Quinn et al., 2002).

As técnicas utilizadas na diferenciação do Map relativamente às outras espécies de micobactérias são o PCR, juntamente com a cromatografia líquida de alta pressão, as análises bioquímicas e a genotipagem (Buergelt et al., 2004; Quinn et al., 2002). As provas genéticas utilizadas para a deteção do Map em amostras clínicas ou identificação do Map em culturas são muitas vezes baseadas na deteção de IS900. Para além desta sequência, existem outros marcadores genéticos exclusivos do Map também utilizados, como é o caso do Mav2 e do HspX (Collins & Manning, 2001).

Apesar de algumas micobactérias patogénicas exibirem uma preferência particular por certos hospedeiros, podem no entanto infetar outras espécies. Doenças provocadas por estes agentes em animais domésticos são geralmente progressivas e crónicas (Quinn et al., 2002).

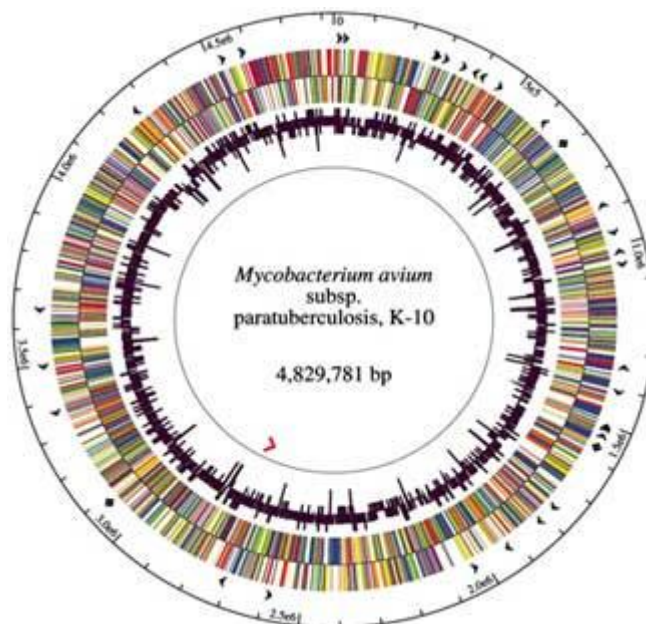


Figura 2 - Genoma K-10 do *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis*
(Adaptado de Behr & Collins, 2010).

1.2.2. Localização e multiplicação da bactéria no hospedeiro

Após a ingestão, o bacilo penetra na mucosa gastrointestinal do íleo e é fagocitado pelos macrófagos da Placa de Peyer (Quinn et al., 2002). Estas células epiteliais especializadas encontram-se na mucosa deste órgão, cuja função é a fagocitose, representando também um importante papel no transporte direto de macromoléculas e antígenos até aos tecidos linfóides do intestino (Buergelt et al., 2004).

Como acontece com outras micobactérias, o Map tem a capacidade de crescer no interior dos macrófagos. Como parte do sistema imunológico, os macrófagos são capazes de destruir uma grande variedade de patógenos bacterianos. As micobactérias, no entanto, são um dos poucos tipos de bactérias que conseguem sobreviver à digestão por parte dos fagolisossomas dos macrófagos, assim como crescer e multiplicar-se dentro destes últimos (Manning & Collins, 2001).

Após a fagocitose do Map, os macrófagos transferem-nos através da lâmina própria e submucosa ileal, e são apresentados como antígenos aos linfócitos do GALT até sensibilizarem o sistema imune intestinal quanto à presença de agentes estranhos no organismo. Este transporte via macrófagos é um evento que apenas é eficaz na fase inicial da infeção por Map (Buergelt et al., 2004).

A Ciência tem vindo a aproximar-se da compreensão dos mecanismos eficazes que levam à sobrevivência das micobactérias dentro dos macrófagos.

Existem três propriedades das micobactérias que explicam a sua resistência face aos macrófagos:

1) A sua parede celular que é quimicamente única, resistente à destruição ou à penetração;

2) A secreção de fatores por parte das micobactérias que evitam ou neutralizam as substâncias bactericidas produzidas no interior dos macrófagos;

3) A secreção de substâncias químicas que inibem ou modulam a resposta imune por parte do hospedeiro (Collins & Manning, 2001).

A sua multiplicação nos macrófagos resulta na libertação de moléculas imunoinibitórias e de moléculas ativadas. Os glicolipidos estruturais tais como os fosfoglicolipidos e os lipoarabinomanos presentes na parede celular destes organismos são particularmente eficazes como imunogénios (Buergelt et al., 2004).

Os fosfoglicolipidos estimulam a produção de células B, e atuam como captadores de oxigénio, radicais de óxido nitroso assim como fixantes do Complemento C3 que facilita a fagocitose. Os lipoarabinomanos são imunogénios das células B que inibem a proliferação linfocitária, diminuem a ativação do γ -Interferon e aumentam a produção dos Fatores de Necrose Tumoral (TNF). Esta substância origina o aumento da reação inflamatória e ajuda no desenvolvimento das lesões granulomatosas, assim como está envolvido na indução dos sinais clínicos tais como a caquexia e a pirexia (Buergelt et al., 2004).

Os macrófagos infetados estão envolvidos na indução da resposta das células T específicas, que induzem a proliferação das células T-Helper, células T supressoras e a subpopulação de células T citotóxicas.

Existem inicialmente dois subconjuntos de células T-Helper, as TH1 e TH2. Quando ativadas, estes dois conjuntos produzem citocinas diferentes que direcionam a propagação das imunidades, tanto celular como humoral. As células TH1 produzem predominantemente interleucina-2 (IL-2), TNF e γ -INF, que fazem parte da imunidade mediada por células, enquanto as células TH2 produzem IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 que são relativas á imunidade humoral. A manipulação dos dois subconjuntos de células T-Helper está sob a influência de IL-12 (Buergelt et al., 2004).

A Paratuberculose é considerada uma doença espectral e dinâmica que oscila entre períodos de intervenção da imunidade mediada por células, quando o hospedeiro consegue resistir aos agentes infecciosos, e por períodos liderados pela imunidade humoral, quando o hospedeiro já não tem resistência ao agente. A doença clínica da Paratuberculose é o reflexo da reação imunológica do hospedeiro e conseqüentemente durante a infeção há períodos de remissão e exacerbação da doença (Buergelt et al., 2004)

A imunidade protetora específica ocorre durante os primeiros estados de infeção. Depois, quando os organismos são libertados dos macrófagos lisados, vão estimular a resposta humoral onde a subclasse de imunoglobulinas IgG predomina. A imunidade

humoral não participa na destruição do Map mas, num ponto de vista de diagnóstico, é importante na demonstração serológica de infeção (Buergelt et al., 2004).

À medida que o animal infetado progride para a fase clínica da doença, a imunidade mediada por células é perdida e os animais tornam-se anérgicos. A anergia permite aos macrófagos infetados entrarem na corrente sanguínea, resultando numa bacteriemia e disseminação do agente infeccioso para os diversos órgãos do animal, nomeadamente o fígado, rins, pulmões, o trato reprodutivo e bexiga. Este cenário pode explicar a percentagem de 20% de infeções *in útero* nos bovinos (Buergelt et al., 2004).

Em experiências realizadas na investigação dos estados iniciais da patogénese da doença de Johne em bovinos, foi descoberto que as micobactérias, apesar de serem capturadas essencialmente pelo GALT ileal, também podem ser recolhidas pelo tecido linfóide tonsilar.

A localização predominante das placas de Peyer no íleo pode explicar o porquê das lesões intestinais se encontrarem localizadas nesta zona. Passados 6 a 14 meses, os linfonodos mesentéricos e ileocecais estão infetados e algumas micobactérias podem espalhar-se para o ceco, colón, fígado e outros tecidos (Buergelt et al., 2004).

Uma vez que os macrófagos são as células-alvo na Paratuberculose, a sua capacidade destruidora é dependente da presença das células T e da atividade das citoquinas produzidas.

Nos bovinos com infeção crónica, tem sido reportado um aumento da atividade de IL-1 dos monócitos do sangue. A fenotipagem dos linfócitos T em bovinos infetados indicou um aumento da presença de $\gamma\delta^+$ e do subconjunto das células T, as CD8+, relativamente as células CD4+, o que sugere que a imunidade mediada por CD4+ é suprimida (Buergelt et al., 2004).

A medição da expressão genética das citoquinas nos linfonodos intestinais e mesentéricos de animais infetados demonstrou um papel importante das γ -INF na prevenção da progressão da doença da fase assintomática para a fase clínica. A expressão de IL-4 não difere entre os grupos assintomáticos e clínicos, sendo o progresso da doença para o estado clínico associado à redução da expressão do γ -INF no local de infeção (Buergelt et al., 2004).

Num estudo realizado em cabras, ficou demonstrado que uma diminuição do número de linfócitos T CD4+ está geralmente associado à presença de macrófagos epiteliais do complexo de histocompatibilidade tipo II, contendo um grande número de bacilos. A informação obtida do estudo feito num conjunto de linfócitos T intestinais de cabras sugeriu que a Paratuberculose é a doença com mais influências sinérgicas e antagonistas na resposta imunitária, cujo balanço vai determinar o curso da doença (Buergelt et al., 2004).

Tanto a sobrevivência como a replicação da bactéria no animal hospedeiro são os pré-requisitos principais para o aparecimento da doença. A patologia resultante da infeção

destas bactérias é proveniente, em parte, dos componentes químicos e moleculares libertados pela parede celular destes organismos, assim como da resposta imunitária do hospedeiro relativamente á presença do Mapa (Collins & Manning, 2001).

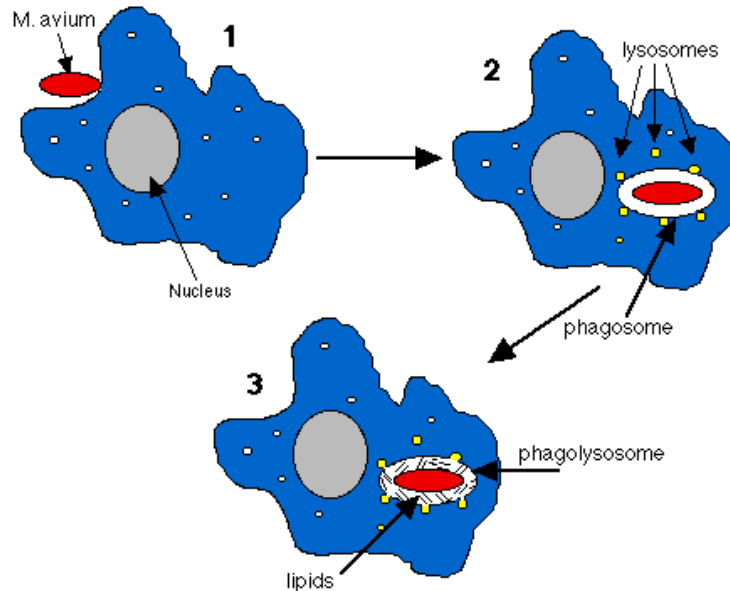


Figura 3 - Processo de fagocitose do *Mycobacterium avium* subespécie paratuberculosis por parte dos macrófagos (Adaptado de Barrow, 1997)

1.3. Manifestação em ruminantes

1.3.1. Sinais Clínicos

Apesar de a maioria dos animais permanecerem assintomáticos na Paratuberculose, vacas com sinais clínicos alertam tanto o veterinário como o proprietário da exploração para a possibilidade de haver um problema em todo o rebanho. Porém, se o animal com sinais clínicos proveio de outra exploração, significa que a magnitude do problema não é assim tão extensa.

Os sinais clínicos desenvolvem-se apenas depois de um período longo de incubação e geralmente aparecem entre os 2 e os 5 anos de idade. No entanto, já foram observados em novilhas com menos de 12 meses de idade e em vacas com mais de 8 anos. Se novilhas de 2 anos de idade de uma exploração apresentarem sinais clínicos de diarreia, isto vai sugerir que existe uma maior dose de exposição a Mapa em animais mais

jovens. Deste modo, a idade de início dos sinais clínicos ajudará o Médico Veterinário a avaliar a severidade do problema da exploração (Van Metre et al., 2008).

Nas ovelhas e cabras, a doença só é clinicamente evidente nos adultos enquanto nos veados os sinais clínicos desenvolvem-se rapidamente e podem evidenciar-se em animais com apenas um ano de idade (Quinn et al., 2002).

Numa exploração ou rebanho afetados, os animais podem ser agrupados em quatro categorias: casos clínicos, animais assintomáticos mas excretores, animais subclínicos (não-excretores) e animais não-infetados pela doença.

Apesar do facto de apenas 1- 2% dos animais da exploração ou rebanho manifestarem sinais clínicos, podem existir mais de 50% dos animais subclínicos, representando os casos reportados apenas a ponta do iceberg (Buergelt et al., 2004; Faries et al., 2002).

Um caso típico de Paratuberculose em bovinos é caracterizado por perda progressiva de peso por diarreia crónica esverdeada inicialmente intermitente, resultante de uma pobre absorção de nutrientes, que não responde a tratamento, originando uma hipoproteínemia com o apetite a manter-se inalterado (Faries et al., 2002). Ao longo do tempo, a diarreia tende a tornar-se contínua e profusa (Driemeier et al., 1999; Quinn et al., 2002).

As fezes são brandas ou aquosas, ocasionalmente podem conter muco, bolhas e apresentam mau cheiro (Van Metre et al., 2008). A diarreia pode diminuir em severidade durante o final da gravidez, aparecendo com uma maior agressividade pós-parto (Buergelt et al., 2004).

O início da doença, particularmente nos animais de alta produtividade, pode ser repentino. A produção leiteira diminui, assim como aumenta o número de células somáticas no leite, e o pêlo torna-se áspero ou pode mesmo ocorrer alopecia (Boersema et al., 2010; Van Metre et al., 2008). Pode desenvolver-se também um edema ventral que aparece em varias áreas anatómicas envolventes, podendo encontrar-se na mandíbula, mais conhecido como *bottle jaw*, no peito, úbere e no membro inferior em alguns animais, resultante da hipoproteínemia, enquanto a febre geralmente está ausente (Buergelt et al., 2004; Faries et al., 2002; Van Metre et al., 2008).

No estado final da doença, ocorre desidratação severa, emaciação, fraqueza muscular e após algumas semanas o animal acaba por morrer ou é abatido (Buergelt et al., 2004; Boersema et al., 2010).

Em ovelhas e cabras, a diarreia é menos marcada e pode estar ausente. Em veados infetados, pode ocorrer uma rápida perda de peso e um início repentino de diarreia, resultando na morte passado duas ou três semanas (Quinn et al., 2002).

Apesar da percentagem de animais infetados ser elevada, a mortalidade anual geralmente corresponde a menos de 1%, no entanto, os animais com a doença clínica

raramente sobrevivem mais de um ano após a deteção dos sinais clínicos (Buergelt et al., 2004; Quinn et al., 2002).

Podem ocorrer complicações clínicas secundárias associadas á Paratuberculose, nomeadamente mastites, infertilidade, bem como o deslocamento de abomaso que, seja em estados médios ou avançados da doença, pensa-se que tenha origem na estase gastrointestinal causada pela hipocalcémia e pelo consumo reduzido de matéria seca (Buergelt et al., 2004; Van Metre et al., 2008).

A susceptibilidade á doença é desencadeada por vários fatores de stress, nomeadamente doenças concomitantes, fatores genéticos, fatores ambientais, a dose e duração da exposição ao agente infeccioso, parto, má nutrição, o transporte, etc (Driemeier et al., 1999; Van Metre et al., 2008).

Os sinais que se desenvolvem frequentemente após o início da primeira, segunda ou terceira lactação sugerem que o stress no período de lactação pode ser suficiente para ampliar os sinais subclínicos e a hipoproteinémia para um estado clínico. Também é possível que esta observação seja simplesmente a reflexão feita resultante de um maior controlo do apetite, da produção e da condição corporal em animais em lactação ao contrário do que se passa nas vacas secas ou novilhas.

O stress no período de lactação não é um pré-requisito para o desenvolvimento de sinais clínicos, uma vez que a presença da doença de Johne em touros e novilhos é um exemplo disso mesmo.

Muitas vacas com sinais da doença de Johne são abatidas devido á fraca produção mesmo antes de ser diagnosticada a patologia, sendo especialmente frequente quando os animais estão a campo em que a consistência das fezes de uma vaca pode não ser tão óbvia como se observa nos parques convencionais ou individuais. Vacas com infeção clínica ou subclínica também podem ter uma maior taxa de abate relativamente aos restantes membros do rebanho devido a mastites e falhas reprodutivas.

No entanto, esse aumento das mastites e dos problemas reprodutivos pode ser, em parte, explicado pela hipoproteinémia, pelo balanço energético negativo, pelo stress ou pela má condição corporal (Van Metre et al., 2008).

1.3.2. Achados de necrópsia

Nos casos clínicos, as lesões intestinais macroscópicas compatíveis com a Paratuberculose ocorrem em 50% dos bovinos com a doença e em 70% das ovelhas (Buergelt et al., 2004).

Em bovinos adultos, a micobactéria causa enterite, sendo caracterizada pela inflamação da mucosa que se apresenta geralmente espessada e enrugada transversalmente, fazendo lembrar as circunvoluções do cérebro. (Driemeier et al., 1999; Van Metre et al., 2008) Estas alterações macroscópicas, tanto nos bovinos como nas ovelhas, são geralmente reconhecidas na porção distal do jejuno e do íleo, no entanto, em casos mais avançados da doença em ovinos, as lesões podem ser encontradas desde o duodeno até ao Ceco (Faries et al., 2002; Quinn et al., 2002).

O espessamento da mucosa intestinal é menos marcado nas ovelhas, e pode existir necrose de caseificação nos linfonodos regionais. As lesões nos veados são similares às lesões observadas nas ovelhas (Quinn et al., 2002).

Outra característica que ressalta á vista no exame de necrópsia trata-se da inserção do mesentério nas ansas intestinais, e conterem zonas com edema gelatinoso e translúcido. Os vasos linfáticos na serosa intestinal e no mesentério das zonas afetadas estão mais evidentes (Driemeier et al., 1999).

Nos casos mais avançados, existe um espessamento óbvio do Íleo com edema e ondulação muito marcada da mucosa do intestino (Van Metre et al., 2008). Nestes animais também é observado o aumento severo dos linfonodos mesentéricos e ileocecais, que se apresentam edematosos, esbranquiçados, firmes e proeminentes, bem como o aumento da espessura da serosa intestinal (Burgelt et al., 2004; Driemeier et al., 1999; Quinn et al., 2002). Analisando os linfonodos alterados, é possível observar a palidez na sua região cortical enquanto a zona medular apresenta-se mais enegrecida.

À medida que a doença progride, forma-se edema na parede abomasal e há acumulação de fluidos nas cavidades peritoneal e abdominal, resultante da hipoproteïnemia, enquanto a palidez dos órgãos internos e das membranas mucosas reflete a anemia existente (Burgelt et al., 2004; Driemeier et al., 1999). Pode acontecer também em alguns animais a calcificação da serosa do rúmen, que evidencia lesões esbranquiçadas, estriadas e com a formação de placas sólidas no centro dessas mesmas lesões.

Os órgãos extraintestinais podem estar envolvidos, nomeadamente o fígado, que pode apresentar-se diminuído de tamanho, escuro e com os bordos delgados, assim como pode ocorrer a atrofia do lobo caudado em casos mais avançados da doença. Já o baço pode estar aumentado de volume e apresentar-se pulposo (Driemeier et al., 1999).

No entanto apenas os rins podem apresentar alterações macroscópicas (Burgelt et al., 2004).

Um fenómeno que também pode surgir nesta patologia é a calcificação da íntima da aorta ascendente, da artéria mesentérica e da carótida, que ocorre em mais de 25% dos animais afetados, onde há a presença de placas pálidas, opacas e irregulares que se salientam na superfície interna destes vasos. A válvula mitral, as válvulas semilunares da

aorta e o endocárdio do átrio esquerdo também podem estar afetados (Driemeier et al., 1999).

Pensa-se que os macrófagos ativados possuem um papel importante na síntese de vitamina D3, e que são depositados nos locais acima mencionados do sistema cardiovascular (Buergelt et al., 2004). Para além deste fenómeno presente neste sistema, é comum, em bovinos, ocorrer atrofia serosa dos depósitos de gordura, geralmente mais evidente no epicárdio (Driemeier et al., 1999).

Relativamente a outros órgãos que possam vir a ser afetados pela Paratuberculose, como é o caso do úbere e do trato genital, as lesões macroscópicas são ausentes (Buergelt et al., 2004).

Por fim, dada as lesões ocorrentes no sistema digestivo e á fraca absorção de nutrientes que advém dessas mesmas, surge a diarreia aquosa tipicamente observada em animais com esta doença (Faries et al., 2002).

Na necrópsia, a amostra ideal que se deve recolher para a confirmação histopatológica da doença é uma secção do Íleo, havendo uma percentagem de apenas 20% dos casos positivos poderem ser mal diagnosticados se for examinado somente o tecido do Íleo em comparação com o exame ao tecido ileal juntamente com os linfonodos ileocecais (Buergelt et al., 2004).

1.4. Diagnóstico laboratorial da Paratuberculose

A escolha dos testes de diagnóstico baseia-se muitas vezes em decisões económicas, o que leva à variação entre os vários países do mundo. Devido às diferenças na estrutura de ajudas económicas para testes laboratoriais entre países, é difícil concluir qual o teste mais eficaz economicamente (Collins, 1994).

Para além disso, ainda não é possível identificar todos os animais infetados pelo Mapa, mais propriamente os subclínicos. Apesar dos testes de diagnósticos existentes terem sido sujeitos a melhoramentos ao longo dos anos, a melhoria não é significativa para o que se espera desses mesmos testes (Chiodini, 1993).

Vacas com sinais avançados da doença de Johne são mais fáceis de suspeitar de apresentarem a patologia devido á diarreia, hipoproteinémia, perda na produção, perda de peso e deterioração da condição corporal. Existe uma variedade de testes de diagnóstico disponíveis que permitem a identificação do agente infeccioso diretamente (deteção da bactéria) ou indiretamente utilizando as respostas imunitárias específicas contra o agente por parte do hospedeiro (Buergelt et al., 2004; Ervin, 1994).

A deteção de anticorpos, a cultura bacteriana, convencional ou radiométrica, de amostras de fezes ou tecidos, as provas de DNA de amostras de fezes e a examinação de

tecidos na necrópsia são alguns dos meios de diagnóstico disponíveis na deteção da doença de Johne (Boersema et al. 2010; Collins, 1994; Ervin, 1994). Estas técnicas são geralmente mais dispendiosas, tanto em tempo como economicamente, podendo custar na ordem dos 5€-20€ por animal (Collins, 1994).

No entanto, a infeção inicial não é detetada pelos testes laboratoriais existentes, tais como ELISA, AGID, Fixação do Complemento, γ -Interferão, cultura fecal ou mesmo biopsia de tecidos (Faries et al., 2002).

Pode recorrer-se a bioquímicas sanguíneas todavia, as únicas anomalias detetadas são a hipoalbuminémia, a hipoproteinémia e ocasionalmente a hiperfosfatémia (> 7 mg/dl) que não permite confirmar o diagnóstico quanto à doença em questão (Van Metre et al., 2008).

Devido ao espectro da resposta imunitária relativa ao Mapa no hospedeiro, que flutua entre uma resposta inicial mediada por células e uma imunidade humoral na fase terminal da doença, é recomendada a utilização de dois ou mais testes simultaneamente para a confirmação da infeção por Mapa (Buergelt et al., 2004). A confirmação do diagnóstico clínico da doença de Johne deve focar-se na cultura microbiológica com Agar Gel Immunodiffusion (AGID), juntamente com o teste ELISA ou/e o teste de PCR. Tipicamente, mais de 85% das vacas com doença clínica vão ser positivas nos testes de ELISA ou AGID, enquanto aproximadamente 100% devem aparecer como positivas quando utilizado o teste de PCR (Van Metre et al., 2008).

Estes testes referidos anteriormente são utilizados para demonstrar o estado de infeção numa exploração assim como permitem diagnosticar a doença em animais doentes com sinais clínicos evidentes. Uma vez que a produção de anticorpos não ocorre na fase inicial da doença, os testes sanguíneos não são fiáveis para a identificação de infeção em bovinos clinicamente normais ou grupos de bovinos jovens. A confirmação da infeção num animal adulto, sem sinais clínicos é feita através de cultura fecal (Faries et al., 2002).

Desta forma, a técnica considerada “Gold Standard” para diagnóstico do *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* é a cultura fecal por ser o teste mais sensível ao agente, contudo é uma técnica muito dispendiosa no que toca a período de espera até surgir um resultado fiável (12 a 16 semanas nos meios de cultura sólidos e 30 a 42 dias em meios de cultura líquidos) (Boersema et al., 2010; Van Metre et al., 2008).

Em vacas com a patologia, os locais de eleição para recolha de amostras para cultura são o íleo, os linfonodos ileocecais ou outros linfonodos mesentéricos. Esta técnica tem sido usada para identificar a doença de Johne em vacas infetadas em matadouros e para recolha de dados epidemiológicos sobre a prevalência da doença.

Embora a colheita de amostras dos linfonodos ileocecais seja um procedimento invasivo para os animais doentes, é extremamente importante nomeadamente em vacas compradas suspeitas de terem doença de Johne. Isso pode justificar as técnicas invasivas

para diagnosticar a situação em definitivo, especialmente quando a exploração não tem historial posterior da doença.

É feita uma laparotomia exploratória no flanco direito para recolha de Íleo com a espessura total com 1cm e um linfonodo ileocecal. A biopsia do Íleo e da metade do linfonodo são submetidos as técnicas de cultura e de histopatologia, incluindo a coloração Ziehl-Neelsen. A restante metade do linfonodo é utilizada em esfregaços que são corados com a coloração auramina-rodamina para deteção de organismos álcool-ácido-resistentes (Jeyanathan et al., 2006; Van Metre et al., 2008).

Um diagnóstico absoluto geralmente é possível através dos esfregaços, mas se esta técnica falhar ou o resultado for questionável, a histopatologia geralmente confirma ou nega o diagnóstico sem necessitar de tanto tempo de espera como é no caso das culturas microbiológicas.

Para vacas assintomáticas, a sensibilidade de todos os testes de diagnóstico da doença de Johne é mais reduzida comparando com vacas com sintomas da patologia (Van Metre et al., 2008).

Vacas em fase assintomática, antes do início da diarreia, aparecem tipicamente negativas em todos os testes para a patologia. Numa tentativa de determinar se essas vacas estão infetadas, testar vacas adultas na exploração de origem com coproculturas agrupadas ou testar amostras de fezes do ambiente através de PCR, são boas estratégias de despiste da doença nestes casos.

Em alguns países, está a optar-se por fazer culturas fecais em todos os animais adultos, especialmente aqueles produtores que fizeram alterações no manejo com vista a reduzir a transmissão da doença de Johne na sua exploração. Testes laboratoriais sem haver alterações no manejo para reduzir a transmissão da patologia não são recomendados, para além de serem dispendiosos tanto em tempo como economicamente (Van Metre et al., 2008).

Não existe atualmente nenhum teste disponível que detecte todos os animais infetados, uma vez que padecem do problema de falta de sensibilidade e/ou especificidade, que os impede de detetar todos os animais infetados assim como não lhes permite diferenciar entre infeções com outras micobactérias. Assim sendo, deve repetir-se os testes, de preferência anualmente, para detetar os animais doentes. Contudo, um teste negativo na deteção da doença de Johne não serve como prova de que o animal não se encontra infetado, apenas dá a informação de que mesmo que o Map esteja presente não foi detetado nessa altura (Buergelt et al., 2004).

Pesquisas recentes sugerem que amostras fecais de grupo e amostras de estrume do ambiente são ferramentas muito importantes na deteção de infeções nas explorações e indicam, no caso dos testes negativos, que a exploração se encontra num baixo risco relativamente á doença de Johne.

As lesões macroscópicas e histológicas obtidas na necrópsia ou no matadouro são extremamente úteis para determinar um diagnóstico definitivo.

Apesar do Mapa poder ser isolado noutros órgãos tais como o fígado, útero ou fetos em situações clínicas avançadas, é raro apresentar lesões granulomatosas. Contudo, as infeções disseminadas detetadas por culturas de Mapa em linfonodos pré-escapulares, supramamários ou popliteos, também acontecem em bovinos.

No que toca ao diagnóstico geral da doença, a Paratuberculose deve ser diferenciada do parasitismo crónico, coccidiose, salmonelose crónica, toxémias, neoplasias intestinais, insuficiência cardíaca, glomerulonefropatias, amiloidose renal, enterite eosinofílica e infeções crónicas de BVD, apesar destas patologias apresentarem sinais clínicos por vezes semelhantes (Van Metre et al., 2008).

1.4.1. Pesquisa direta do agente

1.4.1.1. Isolamento por cultura microbiológica convencional

O isolamento por cultura do *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* de amostras de fezes ou tecidos trata-se da ferramenta tradicional de diagnóstico e é considerada a técnica padrão quando comparada com os restantes testes.

Neste tipo de diagnóstico, as amostras fecais recolhidas devem ser transportadas para o laboratório num prazo nunca superior a quatro dias a uma temperatura a rondar os 4°C, caso contrário irá reduzir-se a viabilidade do organismo. Para além disto, é necessário realizar-se uma descontaminação com cloreto de benzalcónio das mesmas para proceder á eliminação das restantes bactérias e fungos aí presentes, bem como proceder á concentração das amostras por centrifugação (Burgelt et al., 2004; Quinn et al., 2002).

Na técnica convencional, é utilizado o meio de cultura *HEYM*, ou *Herrold's egg-yolk médium*, que é um meio de cultura sólido que contém micobactina, incubado a 37°C durante pelo menos doze semanas. Geralmente são inoculadas aerobicamente três placas por animal, com meios de cultura contendo micobactina e o teste é considerado positivo se as colónias de *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* crescerem em pelo menos uma das três placas de meio de cultura (Burgelt et al., 2004; Quinn et al., 2002). As colónias devem ter menos de 1 mm de diâmetro, geralmente incolores e os esfregaços têm de ser positivos ao teste de coloração Ziehl Neelsen (Quinn et al., 2002).

A vantagem deste teste é a sua elevada especificidade (100%), no entanto apresenta uma sensibilidade a rondar os 40% e necessita de muito tempo para o desenvolvimento das

colónias deste agente, o que requer uma observação periódica ao longo dessas semanas de espera (Quinn et al., 2002, Van Metre et al., 2008).

Culturas fecais positivas em vacas não infetadas podem acontecer como resultado da presença de outros animais, excretadores de grandes quantidades de Map na exploração. Mais de 50% das culturas fecais positivas podem ser uma consequência de um ou mais animais excretadores do agente na exploração (Van Metre et al., 2008).

1.4.1.2. Isolamento por cultura microbiológica radiométrica (Sistema BACTEC)

O primeiro sistema de cultura líquida utilizado para a deteção de *M. paratuberculosis* em amostras clínicas foi o sistema BACTEC 460 com base num meio de cultura modificado radiométrico (Sung Jae Shin et al., 2007). Esse meio de cultura, o *Middlebrook 7H9*, é utilizado juntamente com ácido palmítico marcado pelo carbono¹⁴. Este método possui a grande desvantagem de utilizar material radioativo (Almeida et al., 2005).

O sistema BACTEC TB 460 foi previamente substituído pelo novo sistema não radiométrico BACTEC MGIT 960 (com tubo indicador de crescimento de micobactérias), concebido para a deteção de espécies de micobactérias comumente encontrados em amostras clínicas humanas, através da medição da reação da concentração de oxigénio com o meio de cultura (Almeida et al., 2005; Sung Jae Shin et al., 2007).

O sistema usa um sensor de oxigénio fluorescente em conjunto com algoritmos do software para determinar quando os tubos são "positivos", ou seja, quando ocorreu crescimento bacteriano significativo.

Este sistema foi adaptado para a deteção de *M. paratuberculosis* em amostras clínicas veterinárias, usando um novo meio de cultura específico para *M. paratuberculosis*, o meio de cultura MGIT ParaTB, e um algoritmo modificado feito pelo aparelho MGIT 960 para a interpretação de medições de fluorescência, feitas de hora em hora para cada tubo de cultura.

O instrumento apresenta resultados fiáveis no espaço de horas ou dias. Tal como o sistema BACTEC, são necessários testes adicionais para confirmar a identidade das micobactérias encontradas, normalmente através de coloração álcool-ácido-resistente e/ou PCR (Sung Jae Shin et al., 2007).

1.4.1.3. Técnica de amplificação genética através da prova de PCR

Esta técnica tem sido utilizada na deteção do Map através de amostras de fezes (Quinn et al., 2002).

A sua especificidade é aproximadamente 100%, que contrasta com a sua baixa sensibilidade (35%). Outra grande desvantagem desta técnica é o seu custo ser muito elevado, cerca de 20 euros por animal, que requer um técnico especializado e material específico. O desenvolvimento desta técnica tem permitido a rápida identificação do Map num período de apenas três dias (Buergelt et al., 2004).

As sondas utilizadas que contêm elementos repetitivos de ADN são usadas para medir o grau de parentesco genético entre os agentes isolados da mesma espécie. (Tom Ervin, 1994) A deteção do IS900, uma sequência específica de ADN de 1,5 Kb, presente em 15 a 20 cópias do genoma do Map, foi uma descoberta notável na procura de um marcador genético para este organismo (Buergelt et al., 2004).

O uso de técnicas de identificação de DNA com base no genoma IS900 tem sido particularmente bem sucedido na caracterização das linhagens de *Mycobacterium avium paratuberculosis*. A identificação das linhagens de Map permite não só a monitorização de ambos os tipos de infeção entre animais, vertical ou horizontal, assim como permite também analisar a origem dos animais infetados importados e a transmissão do agente entre animais domésticos e selvagens (Buergelt et al., 2004).

1.4.1.4. Exame histopatológico de biopsias intestinais e de linfonodos mesentéricos

As lesões características da Paratuberculose são mais proeminentes no córtex dos linfonodos mesentéricos. As amostras de tecidos são coradas com o corante Hematoxilina-Eosina, e coloração Ziehl Neelsen, ou, em alternativa, são processadas imunohistoquimicamente antes do exame microscópico. No entanto têm algumas desvantagens, como é o caso de ser um procedimento dispendioso economicamente, necessitar de um laboratório com material específico e por vezes o diagnóstico apenas é alcançado *post-mortem* (Collins & Manning, 2001, Van Metre et al., 2008).

A histopatologia confirma enterocolite granulomatosa com macrófagos e células epiteliais na submucosa e na mucosa. A coloração Ziehl-Neelsen confirma a presença de Map no intestino e nos linfonodos. Contudo, a cultura destas amostras de tecidos tem uma maior sensibilidade para detetar o agente relativamente à histopatologia (Van Metre et al., 2008).

Os critérios atualmente aceites para um diagnóstico histológico positivo da doença de Johne são a presença de células epitelióides e/ou células gigantes de Langerhans nos tecidos e a apresentação dos bacilos álcool-ácido-resistentes nestas células (Buergelt et al., 2004).

1.4.2. Pesquisa indireta do agente

Os testes de deteção de anticorpos no soro foram desenvolvidos devido ao facto das culturas microbiológicas tradicionais e o isolamento dos organismos pelo meio de cultura HEYM necessitarem de incubação e períodos de observação de 2 a 4 meses, uma vez que o Map tem um crescimento muito lento.

No entanto, a utilização exclusiva de testes serológicos pode não ser suficiente para controlar a doença utilizando o sistema teste-abate, nomeadamente em explorações com grande prevalência de Paratuberculose.

Este tipo de testes tem como principal função a monitorização, tanto da prevalência da doença numa determinada exploração como também no controlo da doença em explorações cujo agente foi erradicado ou está sob vigilância (Tom Ervin, 1994).

1.4.2.1. ELISA

Para além de apresentar um alto grau de especificidade (aproximadamente 100%), o teste ELISA têm demonstrado também que, repetidamente, apresenta o mais alto grau de sensibilidade (48% em animais não-excretores, 66% em excretores) quando comparado com os outros testes serológicos existentes na pesquisa deste agente, bem como o fácil acesso por parte dos produtores através de “kits” relativamente baratos (Buergelt et al., 2004; Ervin, 1994;).

Até hoje, a elevada especificidade do teste ELISA nunca foi atingida devido não só ao baixo limite de deteção de anticorpos da tecnologia ELISA, como também á elevada prevalência de anticorpos contra as micobactérias em vacas e à reatividade cruzada com outras micobactérias (Ervin, 1994).

Neste teste, o soro ou leite, é utilizado com uma suspensão de *Mycobacterium phlei* para melhorar a especificidade e sensibilidade do exame, o que o torna um teste fiável no que toca ao diagnóstico de animais infetados subclínicos (Buergelt et al., 2004; Quinn et al., 2002).

O principal fator determinante na eficácia do teste de ELISA depende do tipo de antígeno utilizado, tais como a Lipoarabinomannan (LAM), um polipéptido recombinante (a362) ou mesmo um antígeno específico purificado (Buergelt et al., 2004).

Desta forma, é o meio mais rentável de avaliar a taxa de infeção da exploração, para além de que é capaz de detetar a maioria dos animais excretadores do agente infeccioso. Por isso, com um pequeno investimento por animal, o produtor pode saber aproximadamente a prevalência da Paratuberculose, assim como proceder ao abate dos animais positivos ao teste ELISA (Collins, 1994).

Uma vez que os testes de ELISA não são 100% específicos, devem submeter-se amostras fecais de vacas com teste de ELISA positivo a testes de cultura e PCR's paralelamente. Geralmente, um terço das culturas feitas em animais ELISA-positivos apresentam resultado positivo ao agente. (Van Metre et al., 2008)

1.4.2.2. Fixação do Complemento

Este teste é utilizado oficialmente na fase de exportação/importação, para verificar se os animais em questão estão livres da doença. No entanto, possui algumas desvantagens, nomeadamente uma baixa sensibilidade e especificidade bem como há a possibilidade de reações cruzadas com outras bactérias do Género *Corynebacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*. (Buergelt et al., 2004; Quinn et al., 2002)

1.4.2.3. Teste AGID (Agar Gel Immunodiffusion)

O AGID é um teste serológico pouco dispendioso economicamente e possui uma especificidade muito elevada a rondar os 100%, que contrasta com a sua baixa sensibilidade de cerca de 17-40% em animais subclínicos e 56% em animais com a doença clínica, cujo período de recolha ronda as 48 horas (Buergelt et al., 2004; Quinn et al., 2002).

1.4.2.4. Teste de Gamma- Interferão

Este teste mede a Gama Interferon, que se trata de uma citocina produzida por linfócitos especificamente sensibilizados. *Mycobacterium avium* é usado no teste como “estimulogénio”. Não é tecnicamente fácil de executar e deve ser realizado em células vivas e preservadas, mas tem o potencial de identificar casos subclínicos nos estágios iniciais da infeção (Buergelt et al., 2004).

A sensibilidade deste teste ronda os 70% enquanto a sua especificidade anda na ordem dos 97%. Este teste está disponível comercialmente em forma de “Kits” na deteção deste agente, no entanto é dispendioso (Quinn et al., 2002).

1.4.2.5. Teste de sensibilidade através de inoculação intradérmica

Este teste de campo foi utilizado durante muitos anos na deteção da doença de Johne, embora hoje em dia seja raramente utilizado (Quinn et al., 2002).

Trata-se de um teste que deve ser realizado durante o estado pré-clínico da patologia, uma vez que não tem utilidade quando os sinais clínicos já estão instalados. Uma reação positiva á inoculação da Johnina não fornece uma evidência clara que confirme a presença da infeção, isto porque pode ocorrer reações cruzadas com outras espécies de micobactéria, saprófitas ou patogénicas, assim como os animais cujo teste deu positivo possam ter sido vacinados contra a doença de Johne (Buergelt et al., 2004; Quinn et al., 2002).

1.4.2.6. Teste de Transformação de Linfócitos

O teste de Transformação de Linfócitos tem como finalidade a deteção in vitro de linfócitos especificamente sensibilizados (Buergelt et al., 2004).

É um teste pouco utilizado uma vez que necessita de material laboratorial avançado, requer muito trabalho, utiliza material radioativo e exige amostras frescas de sangue (Buergelt et al., 2004; Quinn et al., 2002).

1.5. Epidemiologia

1.5.1. Transmissão entre animais e fontes de infeção

A transmissão de *M. paratuberculosis* pode ocorrer por via-intrauterina, no período após o parto através do colostro e, sobretudo através das fezes contaminadas de animais infetados (Driemeier et al., 1999; Sweeney, 1996).

A bactéria pode passar para o feto de uma vaca assim como pode ser excretada pelas fezes ou pelo leite de um animal infetado. A transmissão para os vitelos pode ocorrer como resultado de uma infeção na maternidade ou mesmo através da ingestão de fezes

contaminadas presentes nas tetas da vaca, na água, na ração ou no pêlo do próprio animal. Os vitelos com menos de 30 dias estão mais susceptíveis á infecção pelo *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis*, cuja susceptibilidade vai diminuindo com a idade (Faries et al., 2002).

No processo de infecção, a bactéria invade a parede dos intestinos e aí se multiplica durante dois ou mais anos, mantendo-se como doença subclínica. No entanto, a bactéria pode ser excretada pelas fezes ou pelo leite mesmo antes de o animal apresentar sinais clínicos, o que significa que os animais subclínicos são a principal fonte de transmissão e a mais difícil de controlar (Faries et al., 2002).

O animal infetado pode excretar o agente durante pelo menos 18 semanas sem qualquer evidência de sinais clínicos. Esta bactéria não se multiplica no ambiente, no entanto, graças á sua resistência, pode sobreviver no solo ou na água durante mais de um ano (Faries et al., 2002; Quinn et al., 2002).

A infecção é adquirida pelos vitelos durante as primeiras 48 horas, através da ingestão do agente infeccioso presente em fezes excretadas de animais infetados.

A doença clínica raramente é encontrada em animais com menos de 2 anos de idade, assim como os sinais clínicos nem sempre aparecem em todos os animais infetados, mantendo-os subclínicos e a excretar a bactéria para o ambiente (Quinn et al., 2002).

O facto de uma grande variedade de animais, tanto ruminantes como não ruminantes, serem susceptíveis á infecção pelo *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis*, há a possibilidade de os animais não-ruminantes possivelmente servirem de reservatório do agente e desempenharem um papel importante na disseminação da Doença de Johne.

Existem vários fatores que contribuem para a susceptibilidade dependente da idade dos animais mais jovens no que toca á infecção pelo agente. Os vitelos na altura do aleitamento, têm uma maior acidez intestinal comparativamente a um animal adulto, o que favorece a sobrevivência da micobactéria. Para além disso, a sobrevivência da micobactéria aumenta com a presença de lactoferrina e transferrina, presentes no colostro, que têm um papel importante no fornecimento de ferro que possibilita a síntese de micobactina por parte das bactérias, essencial para a multiplicação bacteriana.

Os vitelos podem ser infetados por via uterina, por ingestão de leite de vacas infetadas ou através das tetas das mães, conspurcadas de fezes com o agente, ou mesmo por objetos ou pastagens contaminados pelo *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis*.

Este agente já foi isolado a partir de sémen de bovinos machos, embriões e de fetos. O stress parece ser o principal fator de desencadeamento da doença clínica, nomeadamente no período do parto, no transporte, ou mesmo por deficiências nutritivas.

Parece haver também uma relação entre a prevalência da doença de Johne e o tipo de solo onde se encontra, ou seja, existe um aumento da propagação da doença em explorações cujos solos apresentam condições ácidas ao contrário do que acontece em solos mais alcalinos. Deste modo, é possível proceder a uma correção da acidez dos solos através do uso de cal com o intuito de elevar o pH para diminuir a sobrevivência desta micobactéria.

O progresso da Paratuberculose é explicado por três fases de desenvolvimento:

No primeiro estado de infeção, não existe excreção fecal do agente significativa nem tão pouco desenvolvimento de sinais clínicos evidentes.

A fase seguinte, estado de desenvolvimento dois, trata-se da fase de excreção subclínica do agente, que vai infetar o ambiente, sem a manifestação de doença clínica por parte do animal responsável pela excreção.

Finalmente, a fase número três do desenvolvimento da Paratuberculose manifesta-se com o aparecimento da doença clínica por parte dos animais infetados, observando-se uma perda de peso acentuada e uma diarreia onde ocorre excreção contínua ou intermitente do *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis*.

A duração de cada fase de desenvolvimento da doença está dependente da idade do animal no período de exposição ao agente assim como a quantidade ingerida de micobactérias. A doença clínica representa apenas a “ponta do iceberg” relativamente ao total de animais infetados pelo *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* na exploração (Buergelt et al., 2004).

1.6. Medidas de Biossegurança

Embora os princípios para a erradicação possam ser simples, podem não ser praticáveis ou acessíveis economicamente em algumas explorações. Os compromissos numa erradicação permitem controlar e não eliminar a doença, continuando a comprometer as oportunidades de venda de animais em explorações, principalmente de raça pura (Van Metre et al., 2008).

Os vitelos devem nascer em maternidades limpas e desinfetadas e devem ser retirados de imediato das mães. Estes devem ser criados de um modo totalmente separado dos animais adultos. Todos os vitelos devem ser alimentados com colostro ELISA-negativo ao agente, ou de vacas com culturas fecais negativas.

A compra de vacas provenientes de explorações com estado sanitário desconhecido relativo á doença de Johne continua a representar o maior fator de risco de introdução ou reintrodução da patologia numa exploração (Van Metre et al., 2008).

Minimizar a contaminação fecal da ração, da água, das pastagens, bem como minimizar a exposição dos vitelos às fezes dos animais adultos é essencial e deve constar nos princípios base de higiene de uma exploração. O equipamento utilizado na limpeza do estrume ou que esteve em contacto com este deve manter-se separado das zonas de alimentação e da zona onde se encontram os vitelos.

Assim que o diagnóstico para a doença de Johne for confirmado, o produtor deve ser aconselhado em relação às implicações económicas e às opções para o controlo ou erradicação da doença. Há que ter em consideração todos os fatores que possam penalizar o produtor, nomeadamente os casos clínicos e os subclínicos, a venda ou compra de animais infetados mas que aparentam normais, a transferência de embriões e os riscos inerentes, a diminuição de produtividade, entre outros (Van Metre et al., 2008).

Atualmente, existem programas destinados ao controlo da doença de Johne que ajudam financeiramente os produtores na realização de testes na exploração para deteção de animais infetados. Para isso, é necessário que o veterinário responsável pela exploração determine qual o risco que esta apresenta em termos de contaminação de Map e exista um plano de manejo para controlo da patologia, para que os fundos sejam fornecidos para realização dos testes de diagnóstico (Van Metre et al., 2008).

1.7. Controlo da doença e medidas profiláticas

1.7.1. Tratamento e profilaxia

1.7.1.1. Antibioterapia

Embora seja raro fazer-se tratamento, existem opções terapêuticas para animais com um considerado valor que valham a pena a despesa, assim como evitar a transmissão para os outros animais da exploração (St-Jean & Jernigan, 1991).

A Clofazimina e Isoniazid têm sido usados com sucesso para aliviar os sintomas clínicos da doença de Johne em bovinos e pequenos ruminantes. Apesar de estes medicamentos reduzirem a excreção do agente pelas fezes, a infeção mantém-se. Geralmente, os animais sujeitos a tratamento ganham peso, a consistência das fezes aumenta e as proteínas do sangue são restauradas em poucas semanas (Van Metre et al., 2008).

É necessário um tratamento diário para manter o animal sem sinais clínicos (St-Jean & Jernigan, 1991).

Isoniazid, com a dosagem de 20mg/Kg oralmente uma vez por dia, tem sido utilizado tanto em dose única como em combinação com o Rifampin, a mesma quantidade. Para além deste tratamento, existe a Clofazimina, cujos resultados são semelhantes. O Isoniazid é a escolha mais económica mas pode ser necessária uma terapia adjuvante com Rifampin para alcançar as melhoras clínicas. No entanto, em casos mais graves pode optar-se por um aminoglicosídeo durante um período de três a oito semanas (St-Jean & Jernigan, 1991; Van Metre et al., 2008).

Todas as terapias para a doença de Johne envolvem tratamentos prolongados, impedindo o uso de leite ou carne para o consumo humano, para além de ser um tratamento caro. Se o animal que está a ser tratado não for separado, vai continuar a excretar o agente e há o risco de infetar os restantes animais da exploração (St-Jean & Jernigan, 1991).

1.7.1.2. Profilaxia através de vacinação

As vacinas, apesar de não fornecerem imunidade absoluta aos animais, reduzem o número de casos clínicos assim como a quantidade de agentes excretados pelas fezes (Buergelt et al.; 2004).

Existem disponíveis vacinas adjuvantes inativadas, que reduzem os casos clínicos nos bovinos, mas no entanto não têm capacidade para erradicar a doença da exploração e até podem interferir com o teste da tuberculina (Boersema et al.; 2010; Quinn, 2002).

A imunidade facultada pela vacina tem a duração de aproximadamente 18 meses sendo a revacinação não recomendada. A abordagem mais realista na prevenção da doença através deste método deve ser a utilização de proteínas purificadas ou vacina oral. Idealmente, deve-se utilizar diferentes proteínas, tanto nas vacinas como nos teste de diagnóstico (Buergelt et al.; 2004).

Um bom método para controlar a doença de Johne é um maneio correto em termos de biossegurança aliado á vacinação (Boersema et al.; 2010).

1.7.2. Intervenções sanitárias

1.7.2.1. Maneio na exploração

Para controlar a doença de Johnne, há que implantar procedimentos na exploração com vista a reduzir ao máximo os animais infetados assim como o agente na exploração (Faries et al.; 2002).

Os animais que apresentem suspeitas de sinais clínicos sugestivos de Paratuberculose deve ser isolados dos restantes, e uma vez confirmados devem ser abatidos no imediato para evitar a excreção de largas quantidades de micobactérias, que contaminam os pastos, os parques e conseqüentemente os restantes animais da exploração (Boersema et al.; 2010; Quinn et al.; 2002). Para além disso, deve proceder-se ao isolamento dos vitelos recém-nascidos, cujo crescimento deve garantir-se em parques isolados dos restantes animais ou em vitleiros colocados em zonas secas e bem ventiladas (Collins, 1994).

Trata-se de um desafio, tanto para os veterinários como para os laboratórios, a deteção e a eliminação dos animais subclínicos. Os animais subclínicos são identificados através de culturas fecais com intervalos de cerca de 6 meses, ou então através da deteção do agente Map por provas de ADN (Faries et al.; 2002; Quinn et al.; 2002).

A distribuição dos animais na exploração deve ser tida em conta, nomeadamente na lotação dos parques, que não deve ultrapassar o limite máximo de animais por parque dependendo da área destes últimos. Para além disto, os animais doentes devem ser separados dos restantes como medida preventiva de transmissão de doenças, não só em relação á Paratuberculose como também a outras afeções, tais como pneumonias e diarreias com outra etiologia (Collins, 1994).

O contacto entre indivíduos infetados com os restantes pode ser prevenido através de alguns procedimentos, tais como o isolamento ou segregação de animais ou a quarentena, no caso de animais de substituição provenientes de outra exploração. Estes métodos de separação física de animais envolvem uma distância suficiente entre animais ou grupos de animais que evita a transmissão do agente (Chenoweth & Sanderson, 2005).

O isolamento é muito utilizado na indústria leiteira, nomeadamente na maternidade através dos vitleiros, que conferem proteção aos vitelos recém-nascidos relativamente a fontes de infeção do ambiente assim com permite a separação física entre vitelos com o objetivo de evitar a transmissão do agente entre eles.

A segregação trata-se de uma separação física mas utilizada entre grupos de animais na mesma exploração. A quarentena é um método utilizado em certas explorações, que compram animais de substituição provenientes de explorações com estado sanitário

indeterminado ou simplesmente por precaução. Trata-se de uma separação física de animais potencialmente infetados até que se confirme a ausência de doença. No entanto, a utilização única deste método não é muito eficaz no caso da doença de Johne, uma vez que o agente etiológico apresenta um período de incubação muito longo não permitindo a deteção fidedigna da doença no período de quarentena, no caso dos animais subclínicos (Chenoweth & Sanderson, 2005).

Desta forma, é necessário ter em atenção a compra de animais, que na possibilidade de estarem infetados com a doença de Johne, podem introduzir o agente numa exploração indemne ou aumentar os casos clínicos da afeção em questão. Se o método de quarentena não for possível de praticar, é recomendado a aquisição de vacas adultas provenientes de explorações sem história da presença desta doença ou então de vacas adultas cujo teste á doença de Johne tenha tido resultado negativo (Faries et al., 2002).

A prática de controlar a doença de Johne através do método teste-abate é utilizada em todas as partes do mundo e é uma técnica muito recomendada, dadas as características do agente Map. Grande parte do maneio profilático na doença de Johne é dirigido á maternidade e ao nascimento dos vitelos, uma vez que são estes os mais susceptíveis á doença (Buergelt et al., 2004).

1.7.2.2. Higienização da exploração

Trata-se de um ponto importante no que toca a transmissão do agente *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis*, por isso é recomendada a limpeza de todas as instalações da exploração com alguma regularidade (Collins, 1994).

As fezes têm de ser eliminadas dos parques onde os animais coabitam o mais prontamente possível, enquanto o alimento, a água e as pastagens frequentadas pelos animais devem ser avaliadas regularmente quanto á presença do *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* (Boersema et al., 2010; Buergelt et al., 2004).

Se a exploração tiver história de Paratuberculose, não é aconselhado espalhar o estrume nas pastagens a não ser que seja devidamente tratado. O alimento fornecido deve ser colocado em comedouros elevados para evitar a contaminação com fezes e as zonas de alimentação e de abeberamento devem estar limpas. Há que ter em atenção ao escoamento do estrume em zonas de água destinadas á rega, bem como a não utilização de equipamentos destinados á manipulação de estrume no fornecimento de alimento aos animais (Faries et al., 2002).

A zona dos partos deve estar sempre limpa e desinfetada e a limpeza das tetas das vacas deve ser garantida antes de o vitelo ingerir o colostro para este não ser contaminado

via-colostro. Se isto não for possível, o colostro pode ser fornecido através de biberão para garantir o mínimo de contaminação possível (Collins, 1994).

Os funcionários da exploração também têm que respeitar certas medidas de higiene, como é o caso do uso de calçado e vestuário adequado e sempre limpos, de preferência diferentes entre as zonas onde estão os animais adultos e a zona da maternidade e vitleiros (Boersema et al., 2010).

1.7.2.3. Pasteurização do leite

No caso do leite fornecido aos animais recém-nascidos, uma alternativa segura e eficaz ao uso de leite de substituição é a pasteurização do leite suspeito na própria exploração. Um estudo recente revelou não haver nenhuma diferença relativamente ao número de novos casos de doença de Johne provenientes de rebanhos leiteiros entre aqueles que pasteurizavam o leite e aqueles que utilizam leite de substituição (Collins & Manning, 2001).

O protocolo recomendado indica que o leite deve ser submetido a um tratamento a temperaturas elevadas durante um curto período de tempo (pelo menos 72 ° C por 15 segundos) ou a baixas temperaturas por um longo tempo (pelo menos 63 ° C por um período de 30 minutos) ou qualquer outra combinação de tempo e temperatura levando a um efeito equivalente. Em ambos os métodos, o leite deve ser agitado durante o processo para assegurar a distribuição uniforme do calor (Collins & Manning, 2001; Slana et al., 2008).

O processo de pasteurização neutraliza praticamente todos os Map que possam contaminar o leite cru, bem como outros agentes virais e bacterianos que possam afetar a saúde dos animais recém-nascidos (Collins & Manning, 2001).

Relativamente ao leite utilizado no consumo humano, de acordo com as normas da União Europeia, os gestores de unidades de processamento de alimentos que pretendam sujeitar o leite cru e colostro a tratamento térmico, devem levar em conta os procedimentos desenvolvidos em conformidade com os princípios da Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo, ou simplesmente HACCP.

O tratamento térmico de leite cru ou do colostro deve ser feito forma semelhante aos métodos utilizados no leite com destino aos animais recém-nascidos.

Para além destes métodos de pasteurização, existe o tratamento a temperaturas ultra-elevadas (UHT) que se caracteriza por um fluxo contínuo de aquecimento num período de tempo reduzido, em que a temperatura ronda os 135 ° C em combinação com um período de tempo de paragem adequado.

No entanto, a legislação da UE não proíbe a venda de leite proveniente de rebanhos infetados pela Paratuberculose, uma vez que o teste de leite para a presença do agente causador da Paratuberculose não é exigido por lei, embora recentemente, alguns países possam ter adotado programas de controlo e certificação da doença (Slana et al., 2008).

1.8. Paratuberculose em Portugal

Existe uma grande variedade de informações sobre programas que lidam com doenças infecciosas na Europa. Relativamente à doença de Johne, a abordagem à doença parece diferir significativamente de zona para zona, enquanto que a falta de uma definição clara de "Paratuberculose" e as diferenças nas condições dos alvos dos programas parecem confundir ainda mais a interpretação das informações recolhidas.

No entanto, a informação recolhida sugere que existe uma variedade de iniciativas a aplicar, embora haja pouca informação sobre a participação efetiva nestas iniciativas.

Em Portugal, um estudo realizado relativamente à prevalência da doença de Johne demonstrou que, embora alguns rebanhos (bovinos, ovinos e caprinos) tenham sido infetados, a prevalência geral era tão baixa que foi preferível dar prioridade a outras infeções, principalmente a Brucelose (Nielsen, 2009).

Tabela 1 - Animais positivos à Paratuberculose declarados à DGV entre 1998 e 2002. (Fonte: Direção Geral de Saúde [DGS], 2009)

Ano	Nº de Animais Declarados Positivos		
	Bovinos	Ovinos	Caprinos
1998	62	50	107
1999	248	17	12
2000	18	1	2
2001	28	29	70
2002	49	6	12

As iniciativas de sucesso ao combate a esta afeção ainda têm de ser efetivamente documentadas. A ausência de tal documentação pode bem ser a razão da existência de tantas iniciativas diferentes. Além disso, os casos de Paratuberculose são de baixa prioridade em vários países, e a falta de iniciativas de sucesso documentadas

também pode ser uma explicação para isso. Essa documentação será de fundamental importância para o futuro, em termos de abordagens ao controlo ou erradicação do Map (Nielsen, 2009).

A Paratuberculose tornou-se, nos dias que correm, uma das afeções com maior prevalência e impacto económico, a nível mundial, na indústria leiteira, bem como na indústria de consumo de carne de bovino de raça pura. Dada a prevalência desta afeção em Portugal ser baixa no geral, existem poucos estudos que demonstrem o verdadeiro impacto socioeconómico nas regiões afetadas por esta doença (Collins, 1994).

Com isto,

os objetivos do presente estudo são os seguintes:

- Estudar a incidência da Paratuberculose numa exploração leiteira em Portugal;
- Relacionar o grau de higiene das instalações com a incidência da doença;
- Relacionar o tipo de manejo com a incidência da doença;
- Descrever práticas de manejo que impliquem risco para a ocorrência de infeção de bovinos com *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis*.

2. Material

2.1. Caracterização da exploração e dos animais em estudo

A exploração em estudo localiza-se no Litoral Centro do País, cujo efetivo é constituído aproximadamente por 485 animais de raça Holstein-Friesian, ou mais conhecida por Turina, com aptidão leiteira.

Trata-se de um sistema semifechado, ou seja, com reposição de animais provenientes do exterior, embora na grande maioria essa reposição seja feita com animais da própria exploração.

Tabela 2 - Grupos de animais da exploração e respetivo parque em Dezembro de 2011.

Grupo	Parque	Total Animais
Alta Produção	1	88
Média Produção	2	50
Baixa Produção	3	49
Pós-Parto/Enfermaria	4	32
Pré-Parto	5	23
Vacas Secas	6	38
Novilhas Prenhas	7	27
Novilhas >150 kg	8	103
Vitelas 90-150 kg	9	9
Vitelas <90 kg	10	66

2.1.1. Produção leiteira

A exploração possui um sistema de duas ordenhas diárias, uma de manhã e outra de tarde, tendo sido alterado há pouco tempo uma vez que existiam três períodos de ordenha diária. A média de produção de leite diária por animal é cerca de 34 l por vaca, com uma produção diária total na ordem dos 7000-7500 l.

. Tabela 3 - Produção diária da exploração em média em Dezembro de 2011.

Grupo	Tempo Ordenha (Minutos)	Total Animais	Quantidade de leite por ordenha (l)	Média por vaca (l)
Alta Produção	180	80	1632	20,4
Média Produção	84	50	833	16,7
Baixa Produção	78	48	655	13,6
Pós-Parto/Enfermaria	90	32	575	18,0
Pré-Parto	10	1	8	8,1
Vacas Secas	10	12	83	6,9

2.1.2. Maneio da exploração

2.1.2.1. Estabulação

- Tanto os animais de alta produção como os de média produção, os de baixa produção e os da enfermaria/pós-parto estão estabulados em parques com cubículos cujas camas são de serrim – Parques 1 a 4, respetivamente (Tabela 3);
- As vacas em pré-parto, vacas secas e as novilhas encontram-se estabuladas em parques de cama livre com serrim – Parques 5, 6,7 e 8, respetivamente;
- Os vitelos, após o parto, são transferidos para a maternidade, constituída por viteiros individuais;
- Os animais não têm acesso aos pastos na periferia da exploração.

2.1.2.2. Alimentação

- A alimentação dos animais é constituída por um composto de alimentos processados no “Unifeed”, cujos componentes diferem em quantidade de acordo com o tipo de animal ou estado de produção;
- Alimento composto por palha, silagem de azevém, bagaço de colza, bagaço de soja 44, farinha de milho, polpa de citrinos, silagem de milho, massa de cerveja e núcleo de alta produção, sendo a maior parte dos componentes adquiridos do exterior da exploração.



Figura 4 - Silagem de milho produzida na exploração.

- Os vitelos são alimentados nas primeiras horas de vida por colostro de compra pasteurizado, e posteriormente alimentados com leite de vacas negativas ao teste ELISA para evitar o contacto com leite contaminado com o agente da Paratuberculose.



Figura 5 - Amamentação dos vitelos na exploração

3. Métodos

3.1. Observação da exploração e recolha de dados

Os dados referentes à incidência de Paratuberculose na exploração foram adquiridos com base no sistema informático que sustenta toda a informação que nesta é recolhida, nomeadamente, através do cruzamento de dados relativos aos animais refugados e aqueles, cujo teste ELISA se apresentou positivo à Paratuberculose.

A avaliação dos parâmetros em redor da higiene e do manejo da exploração foi realizada através da observação detalhada das várias áreas desta, durante num período de cerca de 4 meses, com a ajuda do veterinário da exploração, e através de informações fornecidas pelo produtor.

Uma vez que não existem tabelas com parâmetros de avaliação de graus de higiene e de manejo de outros autores, neste estudo foram criados parâmetros nas várias zonas da exploração, auxiliado pela literatura que suporta esta dissertação, com o intuito de avaliar as condições de higiene e o tipo de manejo efetuado em redor dos animais. A avaliação é feita consoante a seguinte escala:

Grau 1: Mau (Por exemplo: Tipo de cama inadequado, pouca ou nenhuma frequência de limpeza dos parques, excessiva densidade de animais, manutenção dos animais infetados com Paratuberculose na exploração, fraca limpeza da sala de ordenha, uso de estrume infetado como fertilizante)

Grau 2: Razoável (Por exemplo: Tipo de cama de qualidade razoável, frequência razoável de limpeza dos parques, densidade animal aceitável, não separação dos animais suspeitos de possuírem a doença, frequência de limpeza da sala de ordenha aceitável);

Grau 3: Excelente (Por exemplo: Tipo de cama de boa qualidade para este tipo de doença, grande frequência de limpeza dos parques, densidade animal indicada para o espaço existente em determinado parque, excelente frequência de limpeza da sala de ordenha, ausência do acesso dos animais às pastagens).

3.1.1. Maneio nos parques

Os seguintes parâmetros foram avaliados da seguinte forma:

1. Tipo de material das camas dos parques;

Serrim: Grau 3

2. Frequência de limpeza dos parques de produção:

- a. Cubículos: Grau 3
 - b. Corredores: Grau 3
 - c. Bebedouros e manjedouras: Grau 3
 - d. Maternidade: Grau 2
 - e. Viteiros: Grau 3
3. Densidade animal
- a. Parques de produção: Grau 3
 - b. Maternidade: Grau 3
 - c. Viteiros: Grau 3

3.1.2. Maneio de controlo de animais seropositivos e seronegativos a ELISA

Os seguintes parâmetros foram avaliados da seguinte forma:

- 1. Animais seropositivos: Grau 1
- 2. Animais com sintomatologia suspeita de Paratuberculose: Grau 2

3.1.3. Maneio na ordenha

Os seguintes parâmetros foram avaliados da seguinte forma:

- 1. Limpeza do parque de espera: Grau 3
- 2. Sequência de ordem de entrada à ordenha: Grau 3
- 3. Limpeza dos úberes: Grau 3

3.1.4. Maneio da pastagem

Os seguintes parâmetros foram avaliados da seguinte forma:

- 1. Acesso à pastagem: Grau 3
- 2. Fertilização das culturas agrícolas: Grau 1

3.1.5. Dados obtidos do Software de gestão da exploração

1. Efetivo mensal na exploração;
2. Número de animais refugados anualmente por suspeita de Paratuberculose (positivos ao teste de diagnóstico ELISA);
3. Produção leiteira;
4. Arraçoamento.

3.1.6. Cálculos a partir dos dados do Software

1. Taxa de refugo.

3.1.7. Análise estatística

1. Variação do efetivo anual da exploração;
2. Desvio padrão do efetivos anualmente;
3. Máximo e Mínimo do efetivo.

4. Resultados

4.1. Medidas de manejo profilático e sua avaliação

4.1.1. Maneio nos parques

No que toca á composição das camas dos parques, foi observado que, tanto nos cubículos como nos parques de cama livre, estas são compostas por serrim.

Quanto à limpeza das camas nos parques, nomeadamente das vacas em produção, constatou-se que estas são limpas cada vez que os animais de determinado parque se encontram na ordenha, isto é, duas vezes ao dia, uma de manhã e outra à noite, onde a sujidade é removida dos cubículos e é colocado um acrescento de serrim na zona onde repousa o úbere. Para além deste procedimento, é acrescentado mais serrim no cubículo, uma vez por semana.

Como complemento na limpeza destes parques, existem rodos automáticos que funcionam oito vezes por dia e que recolhem as fezes da zona de exercício para uma fossa comum.

Para além do cuidado com a higiene das camas, é feita uma limpeza bidiária dos bebedouros (Grau 3) bem como dos comedouros dos parques em questão, geralmente no período de ordenha das vacas de determinado parque.

O Parque das vacas secas e o Parque das vacas em pré-parto, Parques 6 e 5 respetivamente, possuem camas livres e a sua limpeza é realizada três vezes por semana, com um suplemento de serrim de cada vez que são limpos.

No parque 7 e 8, de cama livre, notou-se a utilização do serrim proveniente das camas das vacas em pré-parto e do pós-parto, como forma de reciclagem.

Quanto á densidade animal dos parques de produção constatou-se que é de Grau 3, uma vez que há mais cubículos do que animais em cada parque de produção. Na maternidade e nos viteiros a densidade animal também é de grau 3, já que no parque da maternidade a área é suficientemente espaçosa para os animais aqui existentes e os viteiros são individuais.

Relativamente aos viteiros, as camas são compostas de serrim e a frequência de limpeza é de Grau 3. Foi observado também a precocidade da separação dos vitelos de suas mães e o seu crescimento longe dos adultos.

Tabela 4 - Avaliação do manejo nos parques.

Parâmetros de controlo	Avaliação	Observações
Tipo de cama	3	<ul style="list-style-type: none"> O serrim é um material de boa qualidade para camas, de fácil manejo, alta durabilidade, confortável e de baixo custo.
Frequência de Limpeza nos parques de produção, maternidade e viteiros	<p><u>Cubículos:</u> 3</p> <p><u>Corredores:</u> 3</p> <p><u>Bebedouros e comedouros:</u> 3</p> <p><u>Maternidade:</u> 2</p> <p><u>Viteiros:</u> 3</p>	<ul style="list-style-type: none"> Adequada, tendo em conta os custos de mão-de-obra e de produção; Os rodos automáticos fazem limpeza oito vezes por dia, permitindo uma limpeza ótima dos corredores; Maternidade limpa 3 vezes por semana; Viteiros limpos com regularidade.
Densidade Animal	<p><u>Parques de produção:</u> 3</p> <p><u>Maternidade:</u> 3</p> <p><u>Viteiros:</u> 3</p>	<ul style="list-style-type: none"> Densidade animal adequada às dimensões dos parques.



Figura 6 - Cubículos num dos parques de animais de produção da exploração.

4.1.2. Maneio de controlo de animais seropositivos e seronegativos a ELISA

Segundo o produtor, quando algum animal com indícios de sinais clínicos característicos da Paratuberculose é detetado, este é imediatamente submetido a corticoterapia. Caso não responda positivamente ao tratamento, o animal é automaticamente vendido.

As vacas com diagnóstico positivo a Paratuberculose mas com os sinais clínicos controlados pela corticoterapia são colocadas no Parque 2, uma vez que apresentam boa produção leiteira.

Relativamente ao maneio reprodutivo destes animais, as vacas positivas ao agente nunca são inseminadas, sendo apenas cobertas pelos touros presentes na exploração, que para além de cobrirem estas vacas são também utilizados em animais com problemas de fertilidade. Estes touros são adquiridos do exterior da exploração para evitar a consanguinidade.

Tabela 5 - Avaliação do manejo de controlo de animais seropositivos e seronegativos a ELISA.

Parâmetros de controlo	Avaliação	Observações
Animais seropositivos	1	<ul style="list-style-type: none"> • Se mantiverem boa produção leiteira são mantidos na exploração; • Caso contrário, são vendidos.
Animais com sintomatologia suspeita de Paratuberculose	2	<ul style="list-style-type: none"> • Não são separados; • Apenas sujeitos a corticoterapia.

4.1.3. Maneio na sala de ordenha

Este ponto é apenas aqui discutido como advertência para explorações que utilizem o leite desta como alimento dos vitelos recém-nascidos, os mais susceptíveis de contrair a doença. Visto que esta exploração fornece colostro comprado aos animais recém-nascidos e leite de vacas negativas a Paratuberculose ao teste ELISA aos vitelos, os seguintes parâmetros avaliados têm pouca relevância quanto à possibilidade de infeção dos vitelos desta exploração.

A sala de ordenha encontra-se no centro da exploração, cujo pátio de espera dá acesso aos parques dos animais em produção.

Foi observada a sua limpeza, que é realizada por pessoal qualificado e com formação nesta área, que utilizam como produto desinfetante o *Hiprocloro Hipracyd®*, à base de Hipoclorito de Sódio.

Durante o período de ordenha, foi perceptível que a limpeza inicial dos úberes é feita através do pré-dipping à base de sabão azul derretido em água quente, enquanto no final da ordenha os animais são sujeitos ao pós-dipping que é feito com iodopovidona.

Quanto à manutenção do material de ordenha, esta é feita segundo o Manual de Manutenção da *Combirepair®*, segundo o produtor.

Relativamente à sequência de entrada dos animais, constatou-se que esta é feita de acordo com a produção dos animais, ou seja, os animais de alta produção são os primeiros a entrar á ordenha (Parque 1) e assim sucessivamente até ao Parque 4 que é composto por vacas com um número de células somáticas aumentado ou algum tipo de afeção.

Tabela 6 - Avaliação do maneiio na ordenha.

Parâmetros de controlo	Avaliação	Observações
Limpeza do parque de espera	3	<ul style="list-style-type: none"> • Limpo ao fim de cada ordenha.
Sequência da ordem de entrada	3	<ul style="list-style-type: none"> • Ordem correta de acordo com produção leiteira.
Pré-Dipping e Pós-Dipping	3	<ul style="list-style-type: none"> • Realizado corretamente; • Insuficiente para o combate ao agente.

4.1.4. Maneio da pastagem

Observou-se a realização de culturas de Milho e de Azevém com o intuito de realizar silagens das mesmas. As silagens são feitas na própria exploração (Figura 4).

Segundo o produtor, estas culturas são posteriormente adubadas com estrume e chorume proveniente dos animais da exploração, que não sofre qualquer tipo de tratamento relativamente ao agente *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis*.

Constatou-se também, graças a informações provenientes do produtor, que os animais frequentavam as pastagens num período anterior ao aparecimento da Paratuberculose, mas atualmente isso já não acontece.

Tabela 7 - Avaliação do manejo da pastagem

Parâmetros de controlo	Avaliação	Observações
Acesso à pastagem	3	<ul style="list-style-type: none">• Não tem acesso às pastagens.
Fertilização das pastagens	1	<ul style="list-style-type: none">• Estrume proveniente dos animais da exploração é utilizado como fertilizante nas culturas.

4.2. Dados obtidos através do Software de gestão da exploração

4.2.1. Efetivo na exploração

As seguintes tabelas demonstram o número do efetivo desde Janeiro de 2008 a Novembro de 2011:

Tabela 8 - Médias mensais do efetivo bovino da exploração desde Janeiro de 2008 até Novembro de 2011.

Mês	Número total de vacas da exploração			
	2008	2009	2010	2011
Janeiro	519,3	464,6	436,3	447,3
Fevereiro	520,8	457,7	439,9	455,3
Março	524,3	458,9	438,8	458
Abril	527,5	461,1	444,2	456,9
Maio	532,3	458,1	456,6	464
Junho	525,5	451,7	452,9	463,6
Julho	525,8	449,3	453,2	461
Agosto	514,2	444,5	448,6	464,8
Setembro	501,8	445,5	449,6	470,3
Outubro	494	446,2	447,9	478,2
Novembro	481,4	441,9	444,8	480,8
Dezembro	478,6	437	442,4	-

Nota: Os números apresentados na tabela anterior apresentam casas decimais uma vez que provêm de um cálculo mensal da média dos animais presentes na exploração ao longo do referido mês.

4.2.2. Número de animais refugados anualmente por Paratuberculose

A seguinte figura apresenta os valores relativos ao número de animais identificados com a Doença de Johne e posteriormente eliminados, **desde 2008 até final de 2011**:

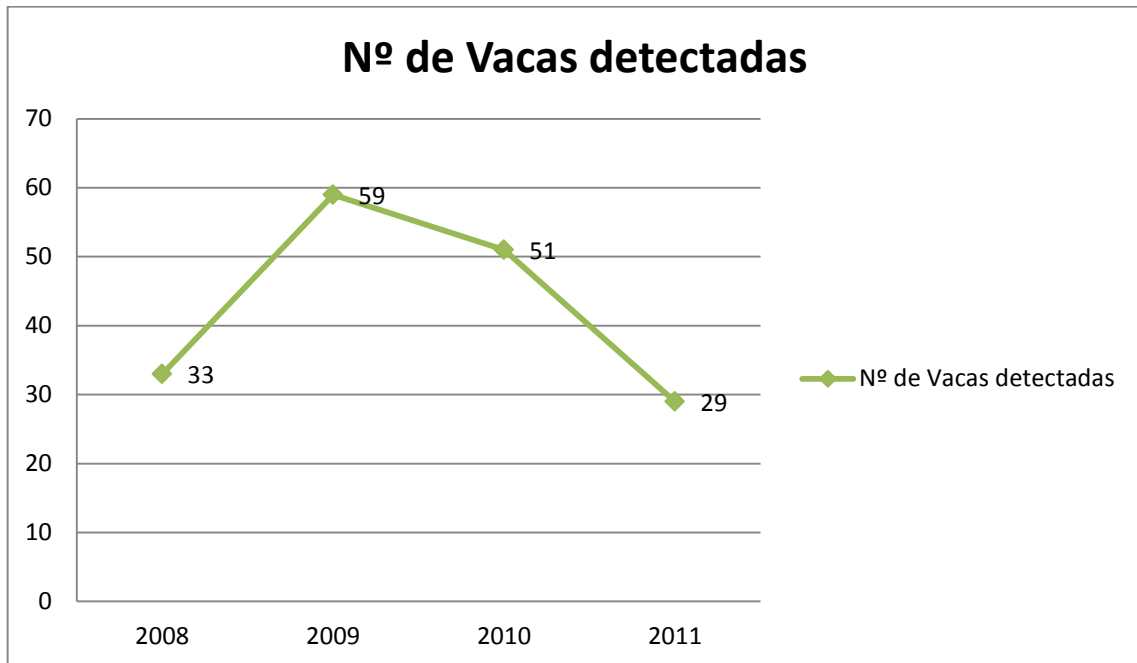


Figura 7 - Número de vacas refugadas por Paratuberculose desde 2008 a 2011.

Nota: Segundo a figura 7, do ano 2008 para o ano 2009, o aumento do número de animais refugados é resultante do tempo necessário até as medidas de controlo da doença começarem a ter o efeito desejado. A partir do ano 2009 até final de 2011, é notório o efeito positivo dessas mesmas medidas.

4.3. Análise estatística

O estudo estatístico realizado nesta dissertação permitiu essencialmente estudar a relação entre o número de animais existentes na exploração desde a descoberta da patologia na exploração e os animais refugados ao longo desse mesmo período, utilizando dados fornecidos pelo Software da exploração. Através desta análise, foi possível perceber melhor a importância de um bom plano de controlo no que toca à Paratuberculose.

O auxiliar de cálculo utilizado neste trabalho foi o programa informático Microsoft EXCEL®.

4.3.1. Variação do efetivo anual na exploração

A tabela seguinte representa os valores referentes à média e desvio-padrão do número do efetivo animal da exploração desde Janeiro de 2008 a Novembro de 2011:

Tabela 9 - Efetivo anual da exploração desde Janeiro de 2008 a Novembro de 2011.

Ano	2008	2009	2010	2011
Média	512,1	451,4	446,3	463,7
Desvio Padrão	18,6	8,6	6,3	9,9

4.3.2. Taxa de refugo anual

As seguintes tabelas demonstram as alterações nos valores de animais refugados ao longo do período referido e posterior análise estatística:

Tabela 10 - Refugo de animais por Paratuberculose desde Janeiro de 2008 a Novembro de 2011.

Vacas refugadas com teste positivo á Paratuberculose				
Ano	2008	2009	2010	2011
Animais refugados	33	59	51	23
Taxa anual de refugo (%)	6,4	13,01	11,43	4,96

Discussão

Relativamente à observação e avaliação das várias zonas da exploração que são expostas ao agente, notou-se que existem alguns pontos críticos de controlo que é necessário discutir, apesar de no geral a abordagem à doença esteja a ser feita de modo correto no que toca a medidas de controlo e higiene.

Quanto ao manejo nos parques, de um modo geral, as medidas executadas com o intuito de controlar a Paratuberculose estão corretas, existindo alguns pontos que é necessário retificar.

O material utilizado nas camas dos animais, o serrim, é de boa qualidade, fácil manejo e de baixo custo, o que é aconselhável neste tipo de afeção (Portaldbo, 2012). No que toca à frequência de limpeza dos parques de produção, maternidade e viteiros, todos são limpos com regularidade à exceção da maternidade cuja cama é limpa e substituída três vezes por semana, o que possibilita uma permanência maior de fezes neste parque e consequentemente maior risco de contágio aos animais recém-nascidos. Para além disso, os bebedouros e manjedouras são inspecionados e limpos com alguma regularidade. Quanto à densidade animal, o número de animais é adequado às dimensões, tanto dos parques de produção como da maternidade e viteiros (Boersema et al., 2010; Buergelt et al., 2004; Collins, 1994).

O manejo dos animais diagnosticados pelo meio de diagnóstico ELISA ou simplesmente suspeitos a terem Paratuberculose têm algumas falhas no que toca ao controlo da doença, nomeadamente o facto de os animais seropositivos, aquando em boa produção, serem colocados em parques de produção consoante o seu rendimento juntamente com os restantes animais são e continuarem a libertar o agente causador da doença para o ambiente, quando deveriam ser eliminados (Collins, 1994). Relativamente aos animais suspeitos de possuírem Paratuberculose, para além de não serem separados dos restantes para evitar contágio, apenas são sujeitos a tratamento de corticoterapia. Do ponto de vista prático e económico é compreensível, dados os custos inerentes ao isolamento e ao refugio de animais, sendo necessário o produtor juntamente com o veterinário, terem de ajustar este procedimento em função do estado clínico de determinado animal, como é o caso nesta exploração (Chenoweth & Sanderson, 2005; Collins, 1994).

No processo da ordenha, que geralmente padece de grande cuidado no que toca a higiene e controlo de intempéries, dado que existe a possibilidade de infeção dos vitelos quando alimentados com leite contaminado, tudo é feito de acordo com as normas de higiene e limpeza de uma sala de ordenha, apesar de o agente da Paratuberculose ser resistente à maioria dos desinfetantes utilizados nestes procedimentos. Uma vez que os animais recém-nascidos nesta exploração são alimentados com colostro pasteurizado de

compra e os restantes vitelos com leite de vacas negativas ao teste ELISA relativamente ao Map, não há o perigo de contágio por esta via.

No entanto, em explorações que utilizem o leite para alimentação de vitelos sem qualquer controlo de contaminação deste, convém ter alguns cuidados em algumas zonas da sala de ordenha, nomeadamente na sequência de entrada dos animais e na limpeza dos úberes. A sequência de entrada dos animais deve ser feita de acordo com a produtividade dos animais, isto é, as vacas com maior produção são ordenhadas primeiro e as últimas são aquelas que apresentam um número elevado de células somáticas ou apresentam alguma patologia posterior. A limpeza dos úberes deve ser feita com rigor de maneira a não contaminar o leite retirado (Collins, 1994).

Relativamente ao manejo da pastagem, o facto de se utilizar o estrume e chorume da própria exploração para fertilização das culturas origina um ponto crítico de controlo grave e que necessita de ser retificado, uma vez que existe a possibilidade das silagens produzidas virem a ser contaminadas pelo agente presente nas plantas cultivadas. É necessário o uso de fertilizantes de origem química ou estrume proveniente de outras explorações livres do Map ou então a correção da acidez dos solos para evitar a multiplicação do agente e infeção dos animais. No entanto, o facto dos vitelos e novilhos não frequentarem essas pastagens diminui um pouco o risco de infeção (Buergelt et al., 2004, Faries et al., 2002).

Dos dados recolhidos do Software da exploração, nomeadamente através do número do efetivo desde 2008 a final de 2011 e do número de animais refugados em igual período, foi perceptível estimar a curva de alteração da taxa de refugo ao longo destes anos e perceber o efeito do programa de controlo da Paratuberculose adotado pela exploração. Notou-se um aumento gradual do número de animais refugados de 2008 para 2009, justificado pelo tempo que levam as medidas de controlo começarem a ter efeito, bem como pelo facto de a doença ter um carácter silencioso e haver sempre animais subclínicos. A partir de 2010 foram sendo refugados menos animais, como consequência das medidas adotadas de combate à Paratuberculose, das quais a alimentação dos vitelos recém-nascidos com colostro pasteurizado de compra e posteriormente com leite de vacas negativas ao agente pelo teste ELISA, foi a mais importante. A alteração das camas livres dos parques de produção para cubículos, permitindo uma limpeza mais assídua e frequente o que implica um menor transporte de Map para a maternidade, local de maior importância no que toca a infeção de animais, a limpeza diária das manjedouras e bebedouros, a precocidade da separação dos vitelos de suas mães e posterior crescimento longe dos adultos, bem como a limpeza dos cubículos a cada ordenha e uma higiene e limpeza exigentes na ordenha também contribuíram para o controlo da doença e consequente diminuição de novos casos de Paratuberculose. Em 2011 foram refugados 29 animais, o

que demonstra que o programa de controlo tem vindo a ser eficaz, com uma taxa de refugo de aproximadamente 4,96%.

Apesar de tudo, é de salientar que o número de animais detetados no diagnóstico com Paratuberculose pode ser superior devido ao teste ELISA apresentar uma sensibilidade baixa, o que implica um maior número de falsos negativos.

Conclusão

Após revisão da bibliografia sobre o tema, foi notória a ausência de um estudo de carácter semelhante ao efetuado, tanto a nível nacional como internacional, que permitisse comparar resultados, no que toca a bovinos de leite.

Este estudo incidiu maioritariamente no tratamento de dados recolhidos do sistema informático da exploração e observação do manejo profilático da exploração com o intuito de controlar/erradicar a Paratuberculose, numa exploração intensiva, o qual decorreu durante o período de Outubro de 2010 a Fevereiro de 2011.

Como agente zoonótico que é, graças a sua extrema resistência ambiental e a desinfetantes, o *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* representa um sério risco na produção animal com grandes perdas económicas.

Perante os resultados obtidos neste estudo, pode afirmar-se que as medidas de controlo adotadas numa exploração, quando bem executadas, têm grande impacto no controlo da Paratuberculose.

Uma correta e célere abordagem ao problema, por parte do produtor juntamente com o veterinário da exploração, é fundamental para o rápido controlo da doença, que apesar da sua resistência, consegue-se alcançar bons resultados como demonstra este estudo.

Apesar de ser uma afeção de carácter silencioso no que toca à deteção do problema, é importante a observação dos sinais clínicos e a reportação ao veterinário de modo a realizarem-se os testes laboratoriais necessários para confirmação do diagnóstico e conseqüente proceder ao tratamento/controlo da doença.

Bibliografia

Almeida, E.A., Santos, M.A.A., Afiune, J.B., Spada, D.T.A., Melo, F.A.F. (2005). Rendimento da cultura de escarro na comparação de um sistema de diagnóstico automatizado com o meio de Lowenstein-Jensen para o diagnóstico da tuberculose pulmonar. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. Volume 31, número 3. Acedido a 10 de Dezembro de 2011 em http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1806-37132005000300009&script=sci_arttext.

Barrow, W.W. (1997). Processing of Mycobacterial Lipids and Effects on Host Responsiveness. *Frontiers in Bioscience* 2, d387-400. Acedido a 28 de Maio de 2011 em <http://www.bioscience.org/1997/v2/d/barrow/barrow.pdf>.

Boersema, S., Mee, J., Noordhuizen, J., Silva, J. C., (2010). Farm health and productivity management of dairy young stock. Wageningen Academic Publishers.

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

Chamberlin, W., Graham, D.Y., Hulten, K., El-Zimaity, H.M., Schwartz, M.R., Naser, S., Shafran, I., El-Zaatari, F.A. (2001). Review article: Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis as one cause of Crohn's disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 15(3): 337-346.

Chenoweth, P.J., Sanderson, M.W. (2005). *Beef Practice: Cow-calf Production Medicine* (pp. 82-87). Blackwell Publishing Company.

Chiodini, R.J. (2005). The History of Paratuberculosis. Acedido em 29 de Abril de 2011 em <http://www.paratuberculosis.info/web/images/stories/pdfs/114>.

Collins, M.T. (1994). Clinical approach to control of bovine paratuberculosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 204(2): 208-210.

Collins, M.T., Manning, E. (2001). Johne's Information Center. Acedido a 29 de Setembro de 2011 em <http://www.johnes.org/index.shtml>.

Direcção Geral de saúde (DGS). (2009). http://www2.dgv.min-agricultura.pt/saude_animal/docs/boletim-zoosanitario.pdf. Acedido a 24 de Novembro de 2011 em <http://www.dgs.pt/>.

Driemeier, D., Cruz, C.E.F., Gomes, M.J.P., Corbellini, L.G., Loretto, A.P., Colodel, E.M. (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.

Ervin, T. (1994). New Advances in the Diagnosis of Bovine Paratuberculosis. Acedido a 12 de Setembro de 2011, em <http://www.addl.purdue.edu/newsletters/1994/bp.shtml>.

Faries, F.C., Roussel, A.J., Thrift, T.R., Gill, R.J., Magee, D.D. (2002). Bovine Paratuberculosis of Beef Cattle: A wasting condition, commonly called Johne's disease. Acedido a 21 de Março de 2011 em http://roberts.agrilife.org/files/2011/06/bovine_paratuberculosis_6.pdf.

Gomes, M.J.P. (2011). Genero *Mycobacterium* spp.. Acedido a 2 de Abril de 2011 em <http://www6.ufrgs.br/labacvet/files/Mycobacterium201102.pdf>

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

Jeyanathan, M., Alexander, D.C., Turenne, C.Y., Girard, C. Behr, M.A. (2006). Evaluation of in situ methods used to detect *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in samples from patients with Crohn's disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(8): 2942-2950.

Manning, E.J.B., Collins, M.T. (2001). *Mycobacterium avium* subsp. Paratuberculosis: pathogen, pathogenesis and diagnosis. Acedido a 16 de Maio de 2011 em <http://www.oie.int/doc/ged/D9350.PDF>.

Manning, E.J.B., Collins, M.T. (2010). History of Paratuberculosis. In Behr, M.A. & Collins, D.M., *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control* (1ª ed. Pp. 1-7). CAB International.

Nielsen, S.S. (2009). Programmes on Paratuberculosis in Europe. Acedido a 20 de Outubro de 2011 em <http://www.paratuberculosis.info/web/images/stories/pdfs/348.pdf>.

Olsen, I., Barletta, R.G., Thoen, C.O. (2010). Mycobacterium. In Gyles, C.L., Prescott, J.F., Songer, G. & Thoen, C.O., Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals (4ª ed. pp. 113-126) Iowa: Blackwell Publishing.

PortalDBO (2012). Cama confortável. Acedido a 20 de Dezembro de 2012 em <http://www.portaldbo.com.br/Portal/MundoDoLeite/EDICAO+ATUAL/5275,,Cama+confortave+I+.aspx>.

Quinn, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E., Donnelly, W.J.C., Leonard, F.C. (2002). Veterinary Microbiology and Microbial Disease (1ª ed. Pp. 97-105). Blackwell Science.

Shin, S.J, Han, J.H., Manning, E.J.B., Collins, M.T. (2007). Rapid and Reliable Method for Quantification of Mycobacterium paratuberculosis by Use of the BACTEC MGIT 960 System. Journal of Clinical Microbiology, 45(6): 1941-1948.

Slana, I., Paolicchi, F., Janstova, B., Navratilova, P., Pavlik, I. (2008). Detection methods for Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in milk and milk products: a review. Veterinarni Medicina 53(6): 283–306.

St-Jean, G., Jernigan, A.D. (1991). Treatment of Mycobacterium paratuberculosis infection in ruminants. Acedido a 14 de Novembro de 2011 em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1760762>.

Sweeney, R.W. (1996). Transmission of paratuberculosis. The Veterinary Clinics of North America, 12(2): 305-312.

Thorel, M.F., Krichevsky, M., Frébault, V.V.L. (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.

Van Metre, D.C., Tennant, B.C., Whitlock, R.H. (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.