



**UNIVERSIDADE DE ÉVORA**

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

**Paratuberculose: associação dos dados clínicos  
com os dados de rejeição de carcaças de bovino  
no matadouro por caquexia.**

**Catarina Lourenço da Cruz**

Orientador interno: Prof. Doutor Luís Martins

Orientador externo: Doutor Carlos Pinto

**Mestrado Integrado em Medicina Veterinária**

Relatório de estágio

Évora, 2015



**UNIVERSIDADE DE ÉVORA**

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

**Paratuberculose: associação dos dados clínicos  
com os dados de rejeição de carcaças de bovino  
no matadouro por caquexia.**

**Catarina Lourenço da Cruz**

Orientador interno: Prof. Doutor Luís Martins

Orientador externo: Doutor Carlos Pinto

**Mestrado Integrado em Medicina Veterinária**

Relatório de estágio

Évora, 2015

*À minha Avó Chica.*

## AGRADECIMENTOS

Um muito obrigada ao Professor Luís Martins por me ter aceitado como tutoranda e por todos os conhecimentos que transmitiu durante o curso. Agradeço pela paciência e disponibilidade em orientar-me perante as minhas dúvidas relacionadas com o estágio.

Obrigada ao Doutor Carlos Pinto pela disponibilidade em orientar o meu estágio e dissertação, pela paciência, vastos conhecimentos transmitidos e ainda pelas oportunidades que me proporcionou de conhecer novos profissionais e novas realidades e sobretudo por abrir os meus horizontes profissionais. Agradeço especialmente pela incansável disponibilidade em me guiar na redação do presente documento e em ajudar no esclarecimento das minhas dúvidas.

Agradeço ao Dr. Hélder Dinis pela paciência a ensinar-me e pela disponibilidade em esclarecer todas as dúvidas. Obrigada por sempre me permitir por as “mãos na massa”.

Ao Dr. André e Dr.<sup>a</sup> Andreia, à Dr.<sup>a</sup> Ana e à Natividade do Matadouro de São Miguel pela disponibilidade em ajudar no estudo desenvolvido, por transmitirem os seus conhecimentos e pela amizade demonstrada. À Dr.<sup>a</sup> Ana agradeço ainda pela bibliografia disponibilizada.

Agradeço à Doutora Ana Botelho por ter aceitado o meu estágio extracurricular no INIAV (Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária) e à Célia Leão pelas preciosas lições de laboratório, pela bibliografia disponibilizada e pelo conhecimento sobre *Mycobacterium avium* subspécie *paratuberculosis* transmitido.

Obrigada à D. Filipa por me ter recebido em sua casa como se fosse da família. Obrigada por ser a minha avó de Évora.

À Ana Isabel, Leonor e Ana Rita por serem as minhas companheiras do Ensino Secundário, pelos momentos de risota e por ainda hoje mantermos a amizade. Ao Pedro e Andreia pela boa disposição e todas as cusquices.

A todos os meus colegas de curso e especialmente de turma, pelos momentos de diversão e descontração de passámos juntos. Um especial obrigada às minhas Just por me acompanharem nesta empreitada durante os cinco anos, pelas noites de estudo conjunto, pelo apoio nos momentos mais difíceis e por sempre me fazerem sorrir. Vocês são a família que escolhi.

Aos colegas da Residência das Laranjeiras, bloco 2 por me terem recebido de braços abertos e se tornarem a minha família por seis meses.

Obrigada à Raquel, Victor e D. Lurdes pelo carinho com que me receberam, apesar de ser uma desconhecida.

Obrigada à minha família, em especial à minha mãe, que nunca me fez esquecer os meus objetivos e sempre me apoiou incondicionalmente, e ao João que sempre fizeram todos os possíveis para que este sonho fosse tornado realidade. Obrigada por tornarem isto possível. Aos meus avós, pois foi com eles que aprendi a gostar e conviver com animais. Ao avô Jacinto porque sem ele também não seria possível finalizar o curso. À minha Tita que me acompanhou e encorajou em todo o meu percurso académico. Aos meus manos, Artur e Alice, porque sempre me enchem de alegria quando os vejo e por serem mais um incentivo para prosseguir e não desistir. São a luz dos meus olhos!

Ao Toni por sempre me fazer ver o caminho certo, mesmo quando nem eu era capaz de o fazer, por me fazer esquecer de todos os problemas nos momentos certos e por me lembrar deles sempre que foi preciso, por ouvir todos os meus lamentos ao longo dos cinco anos de curso.

## **RESUMO**

O presente relatório refere-se às atividades no estágio curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Apresentam-se as atividades no âmbito de sanidade animal, clínica de espécies pecuárias e inspeção sanitária.

No âmbito da sanidade animal foram acompanhados os procedimentos do plano de erradicação da brucelose nos Açores. Foram ainda acompanhados casos clínicos de várias áreas de intervenção, principalmente em bovinos de leite. A componente de inspeção sanitária foi desenvolvida no Matadouro de São Miguel, onde foram observados e praticados os procedimentos de inspeção sanitária.

Como tema de desenvolvimento optou-se pela paratuberculose (PT) bovina que se manifesta pelo emagrecimento progressivo e diarreia crónica. Colheram-se amostras de sangue, junção ileocecal e fezes a 116 bovinos que apresentavam sinais clínicos compatíveis com PT, sendo que 66,38% dos animais tiveram uma das análises (ELISA ou histopatologia) positivas.

Mais estudos devem ser feitos a fim de averiguar o comportamento da doença na ilha de São Miguel.

Palavras-chave: bovino, paratuberculose, emagrecimento, diarreia crónica.

## ABSTRACT

### **“Bovine paratuberculosis: association between clinical data and rejection data in slaughterhouse for cachexia.”**

This document describes the activities during the curricular traineeship of the Master Degree in Veterinary Medicine. Activities carried out on animal health, food animal clinic and meat inspection are presented in this report.

In relation to animal health the procedures from the plan of eradication of brucellosis in Azores as well as the clinical cases from several areas of intervention, especially in dairy cattle were followed. The procedures for meat inspection were learned at São Miguel Slaughterhouse.

The subject chosen was bovine paratuberculosis (PT). This disease is manifested by progressive weight loss e chronic diarrhea. In the present study 116 cattle samples (blood, ileo-cecal junction a feces) were collected from animals with clinical signs compatible with PT. The results show that 66,38% had one of the tests (ELISA or histopathology) positive.

More studies must be carried out to acknowledge the disease behavior in São Miguel Isle.

Key words: bovine, paratuberculosis, weight loss, chronic diarrhea.

# ÍNDICE

AGRADECIMENTOS .....	II
RESUMO .....	IV
ABSTRACT .....	V
ÍNDICE .....	VI
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	VIII
ÍNDICE DE TABELAS .....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE ABREVIATURAS .....	XI
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. ENQUADRAMENTO.....	3
3. SANIDADE ANIMAL .....	6
3.1. Brucelose bovina .....	6
3.2. Plano de Erradicação da Brucelose nos Açores.....	7
4. CLÍNICA DE ESPÉCIES PECUÁRIAS .....	11
4.1. Casos clínicos em bovinos.....	11
4.1.1. <i>Reprodução, obstetrícia e glândula mamária</i> .....	12
4.1.2. <i>Neonatologia</i> .....	15
4.1.3. <i>Gastroenterologia</i> .....	18
4.1.4. <i>Doença metabólica</i> .....	21
4.1.5. <i>Doença respiratória</i> .....	23
4.1.6. <i>Outras áreas de intervenção</i> .....	25
4.2. Casos clínicos noutras espécies .....	28
5. INSPEÇÃO SANITÁRIA.....	30
5.1. <i>Inspeção ante mortem</i> .....	30
5.2. <i>Inspeção post mortem</i> .....	34
5.3. Bem-estar animal .....	44
6. PARATUBERCULOSE BOVINA: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	48

6.1.	Caracterização do agente etiológico .....	48
6.2.	Epidemiologia.....	51
6.3.	Patogenia .....	53
6.4.	Sinais clínicos .....	56
6.5.	Diagnósticos diferenciais.....	59
6.6.	Aspetos anatomo-histopatológicos .....	59
6.7.	Meios de diagnóstico .....	61
6.7.1.	<i>Testes diretos</i> .....	62
6.7.2.	<i>Testes indiretos</i> .....	64
6.8.	Tratamento.....	67
6.9.	Controlo.....	69
6.10.	Vacinação .....	75
6.11.	Impacto económico.....	79
6.12.	Saúde Pública .....	81
7.	ESTUDO EM PARATUBERCULOSE BOVINA EM SÃO MIGUEL, AÇORES.....	84
7.1.	Objetivos.....	84
7.2.	Materiais e métodos.....	85
7.3.	Resultados.....	87
7.4.	Discussão .....	95
7.5.	Conclusão .....	98
8.	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	100
9.	BIBLIOGRAFIA .....	101
	ANEXO 1.....	110
	ANEXO 2.....	111

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Distribuição de casos clínicos de bovinos por áreas de intervenção ...	11
Gráfico 2: Distribuição do número de casos pelas restantes áreas de intervenção	26
Gráfico 3: Causas de rejeição total de carcaças e vísceras .....	40
Gráfico 4: Causas de rejeição total de pulmões .....	41
Gráfico 6: Causas de rejeição total de rins .....	42
Gráfico 7: Causas de rejeição total de coração .....	42
Gráfico 8: Causas de rejeição total do rúmen .....	43
Gráfico 9: Causas de rejeição total da língua.....	43
Gráfico 10: Distribuição dos positivos ao teste ELISA por idades.....	89
Gráfico 11: Distribuição dos positivos na histopatologia por idades.....	90
Gráfico 12: Distribuição por idades dos animais positivos no teste ELISA e na histopatologia.....	91
Gráfico 13: Resultados da cultura de fezes conforme os resultados da serologia e histopatologia.....	92
Gráfico 14: Resultado do PCR de fezes conforme os resultados de serologia e histopatologia.....	93
Gráfico 15: Explorações agrupadas por número de animais positivos em cada uma delas .....	95

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Frequências absolutas e relativas de casos de reprodução acompanhados .....	12
Tabela 2: Frequências absolutas e relativas de casos de neonatologia acompanhados .....	15
Tabela 3: Agentes etiológicos das diarreias dos vitelos e respetivo tempo de vida em que se manifestam os sinais clínicos, adaptada de Metre <i>et al.</i> , 2008 .....	17
Tabela 4: Frequências absolutas e relativas de casos de gastroenterologia acompanhados.....	18
Tabela 5: Frequências absolutas e relativas de casos de doença metabólica acompanhados.....	22
Tabela 6: Frequências absolutas e relativas de casos de doença respiratória acompanhados.....	23

Tabela 7: Etiologias para doença respiratória em bovinos adultos, adaptada de Maillard <i>et al.</i> , 2006.....	24
Tabela 8: Procedimentos de inspeção obrigatórios em bovinos, adaptada do Regulamento (CE) N.º 854/2004 .....	37
Tabela 9: Características fenotípicas e epidemiológicas das estirpes de <i>MAP</i> , adaptada de Stevenson, 2010 .....	50
Tabela 10: Lista de diagnósticos diferenciais para PT, adaptada de Radostits <i>et al.</i> , 2006 e Savey <i>et al.</i> , 2009 .....	59
Tabela 11: Relação entre os estágios de PT e os resultados dos testes diagnóstico, adaptada de Radostits <i>et al.</i> , 2006.....	61
Tabela 12: Testes diagnóstico recomendados conforme o propósito do teste, adaptada de Collins, 2011a .....	67
Tabela 13: Princípios e medidas de manejo a tomar de modo a prevenir novas infeções na exploração, adaptada de Radostits <i>et al.</i> , 2006 e Garry, 2011 .....	72
Tabela 14: Testes realizados e respetivo número de amostras.....	87
Tabela 15: Amostras enviadas para cultura de fezes e <i>Nested PCR</i> .....	87
Tabela 16: Distribuição por idades dos animais testados .....	88
Tabela 17: Resultados das amostras enviadas para análise serológica e histopatológica.....	89
Tabela 18: Amostras positivas nos animais reprovados em vida.....	89
Tabela 19: Resultados das amostras para análise por ELISA e histopatologia de um mesmo animal .....	90
Tabela 20: Resultados obtidos na cultura de fezes e <i>Nested PCR</i> .....	93
Tabela 21: Número de animais por exploração e casos de PT detetados em cada uma delas .....	94

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Intestinos do feto que se encontram expostos devido à alteração da parede abdominal.....	14
Figura 2: Feto após a resolução da distócia por fetotomia.....	15
Figura 3: Lesão na extremidade distal de bovino detetada aquando da inspeção <i>ante mortem</i> .....	31
Figura 4: Bovino rejeitado em vida por caquexia .....	33

Figura 5: Tumor de bexiga detetado em bovino no MSM.....	40
Figura 6: Relações filogenéticas entre as diferentes micobactérias com base nas sequências do gene ribossomal 16S, adaptado de Savey <i>et al.</i> , 2009 .....	49
Figura 7: Distribuição média dos animais em termos de manifestação clínica e excreção em rebanhos infetados, adaptado de Savey <i>et al.</i> , 2009 .....	57
Figura 8: Lesões hemorrágicas e espessamento da mucosa intestinal em junção ileocecal colhida de animal suspeito de PT .....	60
Figura 9: Evidente espessamento da mucosa intestinal com aspeto cerebroide. Lesões hemorrágicas e aumento do tamanho de linfonodo mesentérico.....	60
Figura 10: Distribuição geográfica das explorações afetadas, cortesia de Paulo (SDASM).....	88
Figura 11: Aspeto do crescimento das colónias de MAP no meio HEYM com micobactina.....	91

## LISTA DE ABREVIATURAS

BAAR: bacilos ácido-álcool resistentes  
BVDV: Bovine Viral Diarrhea Virus (Vírus da Diarreia Viral Bovina).  
DAD: Deslocamento de Abomaso à Direita  
DAE: Deslocamento de Abomaso à Esquerda  
EHEC: *E. coli* enterohemorrágica  
ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Ensaio Isoenzimático de Absorção)  
ETEC: *E. coli* enterotoxigénica  
FCT: Teste Fixação do Complemento  
HEYM: Herrold's *Egg Yolk Medium* (Meio de Herrold com Gema de Ovo)  
IFN  $\gamma$ : interferão gamma  
IL-10: interleucina 10  
IL-4: interleucina 4  
IL-5: interleucina 5  
JIC: Junção Ileocecal

RAA: Região Autónoma dos Açores  
*MAP*: *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis  
MSM: Matadouro de São Miguel  
OIE: World Organisation for Animal Health  
PCR: Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)  
PT: Paratuberculose  
RBT: Teste Rosa Bengala  
RMF: Retenção de Membranas Fetais  
SDASM: Serviços de Desenvolvimento Agrário de SÃO Miguel  
SNIRA: Sistema Nacional de Informação e Registo Animal  
TGF  $\beta$ : Transforming Growth Factor Beta (Fator de Transformação do Crescimento)  
TNF  $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor Alfa (Fator de Necrose Tumoral Alfa)

## **1. INTRODUÇÃO**

O presente documento tem como objetivo descrever e demonstrar as atividades desenvolvidas ao longo do Estágio Curricular. Este teve lugar na ilha de São Miguel, Açores, entre o dia 23 de setembro de 2013 e o dia 25 de março de 2014, tendo sido feita uma interrupção entre os dias 23 de dezembro de 2013 e 8 de janeiro de 2014 para as celebrações do Natal e Ano Novo. Este estágio teve como orientador externo e coordenador o Doutor Carlos Pinto, técnico superior do Serviço de Desenvolvimento Agrário de São Miguel (SDASM).

O estágio englobou várias áreas: Clínica de Espécies Pecuárias, Inspeção Sanitária e Sanidade Animal. Como tal, foram estipulados dias da semana para o desenvolvimento de atividades em todas estas áreas. Assim, às terças-feiras e sextas-feiras deslocava-me até ao Matadouro Industrial de São Miguel de modo a adquirir alguma prática nos procedimentos de Inspeção Sanitária. Um dia por semana fui para o SDASM onde me dediquei à organização de dados, pesquisa bibliográfica do estudo que irei apresentar no final do relatório e foram acompanhados alguns procedimentos de Sanidade Animal. Nos restantes dias dediquei-me à Clínica de Espécies Pecuárias acompanhada pelo Dr. Hélder Dinis, médico veterinário da Associação Agrícola de São Miguel.

Numa primeira fase do trabalho irei descrever um pouco das características únicas da ilha de São Miguel, como a origem da sua formação geológica, características de fauna e flora e socioeconómicas. De seguida, será apresentada a casuística observada no campo, os resultados das inspeções acompanhadas no matadouro e uma descrição dos procedimentos de sanidade animal acompanhados.

Finalmente, serão apresentados os resultados do estudo realizado em pataruberculose (PT) acompanhados de uma revisão bibliográfica sobre a doença. O objetivo deste estudo foi investigar a possível associação entre os casos observados, quer na prática clínica, quer na inspeção sanitária no Matadouro, de diarreia crónica e emagrecimento progressivo com a presença de PT na ilha de São Miguel. Os dados recolhidos não são ainda representativos do panorama da PT nesta ilha.

A PT é uma doença debilitante dos animais afetados que causa grandes perdas na exploração e tem como principais sinais clínicos diarreia crónica e emaciação progressiva. Adicionalmente, tem sido ao longo dos anos apontada como uma possível zoonose

devido ao facto das lesões observadas no intestino dos animais afetados serem muito semelhantes às observadas em pacientes humanos com Doença de Chron (Kruiningen, 2011).

## 2. ENQUADRAMENTO

O arquipélago das Açores está situado no oceano Atlântico entre 37<sup>0</sup> e 40<sup>0</sup> latitude norte e 25<sup>0</sup> e 30<sup>0</sup> de longitude oeste. É composto por nove ilhas agrupadas em três grupos: grupo oriental (São Miguel e Santa Maria), grupo central (Terceira, Graciosa, São Jorge, Pico e Faial) e grupo ocidental (Flores e Corvo). Integram ainda o arquipélago os minúsculos ilhéus das Formigas e uma série de pedregulhos inóspitos que se estendem por uma área de 10 km. A área total do arquipélago é de 2300,385 km<sup>2</sup> e as ilhas maiores são a de São Miguel, a do Pico e por último a da Terceira. A ilha com menor área é a do Corvo (Ribas, 1984).

O clima é temperado e húmido, mesmo chuvoso, com uma precipitação anual compreendida entre os 900 e os 3000 mm/m<sup>3</sup>. As temperaturas do ar são moderadas, com uma média anual de 17 °C e com amplitude térmica anual e diária reduzida (máximo 10 °C). Mais de 50% da superfície da ilha de São Miguel é montanhosa. Os solos são do tipo andossolos, com o pH ácido e são normalmente carenciados em azoto, fosforo e cobalto (Ribas, 1984)

A data de descoberta dos Açores é 1427, sendo Santa Maria a primeira ilha a ser descoberta. Posteriormente, e de oriente para ocidente, as restantes ilhas foram sendo avistadas pelos navegadores portugueses. Devido ao clima ameno e à fertilidade dos solos, o arquipélago atraiu numerosos povoadores oriundos do Minho ao Algarve, mas também estrangeiros, nomeadamente flamengos e espanhóis (Pinto, 2010)

A ilha de São Miguel tem 795,41 km<sup>2</sup> de área, com 65 km de comprimento e 16 km de largura. O seu povoamento iniciou-se em 1444, após o Infante D. Henrique ter ordenado a colocação de gado em todas as, então, sete ilhas. A capitania foi entregue a Gonçalo Velho, cavaleiro e frade da Ordem de Cristo (Relatório do Estado e do Ordenamento do Território, 2003; Garcia, 2012).

Os primeiros habitantes provieram das províncias da Estremadura, Alto Alentejo e Algarve. Mais tarde vieram-se-lhes a juntar habitantes provenientes da Madeira, judeus, mouros e possivelmente franceses (Relatório do Estado e do Ordenamento do Território, 2003; Garcia, 2012).

A fertilidade do solo e a sua posição geográfica entre a Europa, a África e a América são os fatores que contribuem para uma rápida expansão económica centrada na cultura do trigo, na cana-de-açúcar, nas plantas tintureiras pastel e urzela, no vinho e nos

lacticínios. Cem anos mais tarde a batata-doce, o milho, o inhame, o linho e a laranja ampliaram a produção agrícola na ilha (Relatório do Estado e do Ordenamento do Território, 2003; Garcia, 2012).

No final do século XVI e parte do século XVII, São Miguel é vítima de ataques de corsários franceses, ingleses e argelinos. É ocupada por tropas espanholas em 1582. Com a Restauração, em 1640, recupera a sua posição de centro comercial desenvolvendo contactos com o Brasil, para onde seguem colónias de emigrantes. A cultura da laranja, importada da Inglaterra, traz a São Miguel grande prosperidade no final do século XVIII, mas a partir de 1860 é exterminada por uma praga. Depressa são introduzidas novas culturas como tabaco, chá, espadana, chicória, beterraba sacarina e ananás por força da iniciativa local (Relatório do Estado e do Ordenamento do Território, 2003; Garcia, 2012).

Após a Segunda Guerra Mundial desenvolve-se a atividade pecuária, resultando em extensas áreas de pastagem em detrimento das culturas agrícolas, assim como no extraordinário crescimento do efetivo bovino e de unidades industriais de transformação do leite. Todos estes fatores conduziram esta atividade a uma nova monocultura com todas as consequências inerentes à dependência de um sector produtivo (Relatório do Estado e do Ordenamento do Território, 2003; Garcia, 2012).

Este fenómeno que caracteriza a história económica dos Açores designa-se de “monocultura colonial de exportação”. Como se pode observar pelo acima citado, desde o início do povoamento que aos ciclos de especializações agrícolas se sucederam crises e perturbações socioeconómicas que marcaram os períodos intermédios, resultantes do esgotamento dos solos, do aparecimento de pragas e outras causas de cariz comercial. Estes ciclos de exportação marcaram profundamente a paisagem das ilhas e ditaram uma utilização exagerada dos recursos naturais (Relatório do Estado e do Ordenamento do Território, 2003; Garcia, 2012).

Atualmente a economia dos Açores é baseada na agropecuária, sendo a produção leiteira e os lacticínios o mais importante setor. Existem 51 967 vacas leiteiras na ilha de São Miguel distribuídas por 1417 explorações (POSEI Vacas Leiteiras, 2013). Apesar da tendência atual ser a fixação das explorações num só local, a grande maioria das explorações de bovinos leiteiros dos Açores são, normalmente, fragmentadas e dispersas em pequenas parcelas de pastoreio. As vacas leiteiras deslocam-se regularmente entre as dife-

rentes parcelas de terreno de pastagem que fazem parte da exploração, processo designado por transumância. A ordenha é feita em unidades móveis que acompanham as manadas. As vacas em lactação são suplementadas com alimento concentrado na hora da ordenha. Nas unidades fixas as vacas são estabuladas temporariamente durante o período da ordenha com distribuição de alimentos concentrados e forragem em sistemas *unifeed* (Pinto, 2010).

O facto das explorações se encontrarem dispersas em pequenas parcelas exige mais mão-de-obra, implica maior dispêndio energético, dificulta a ordenha em boas condições higiénicas e, como consequência, representa um importante entrave ao desenvolvimento económico e modernização da exploração (Pinto, 2010).

### 3. SANIDADE ANIMAL

Nos SDASM foi possível acompanhar as funções de um médico veterinário no âmbito do Plano de Erradicação da Brucelose Nacional. Incluiu a colheita anual de sangue para a análise através do teste Rosa Bengala e a vacinação dos animais com a vacina RB51.

#### 3.1. Brucelose bovina

Nos bovinos, a bactéria *Brucella abortus* é o principal agente etiológico da brucelose, porém outras bactérias do mesmo gênero também podem raramente causar a doença, como sejam a *B. melitensis* e *B. suis* (Garry, 2008). Este agente etiológico é um cocobacilo Gram-negativo, intracelular facultativo, pertencente à família  $\alpha$ 2-Proteobacteriacea. As espécies do gênero *Brucella* spp. estão divididas consoante a sua forte afinidade para com um determinado hospedeiro: *Brucella melitensis* (cabras), *Brucella suis* (suínos), *Brucella ovis* (ovinos), *Brucella abortus* (bovinos) e *Brucella canis* (canídeos) (Neta, *et al.*, 2010; Radostits, *et al.*, 2006). Com a exceção de *B. ovis* e *B. neotomae*, todas as outras espécies têm potencial zoonótico (Neta, *et al.*, 2010).

A infecção humana ocorre devido ao consumo de leite contaminado não pasteurizado e queijo ou através da exposição ocupacional a animais ou carcaças infetadas, secreções uterinas ou fetos abortados. A infecção também pode ocorrer pela manipulação de vacinas vivas ou de bactérias no laboratório. Os sinais clínicos associados a brucelose humana incluem febre, anorexia, poliartrite, meningite, pneumonia, endocardite, entre outras manifestações menos comuns. Como é uma doença zoonótica, o seu controlo e erradicação nos animais é de grande importância como medida de prevenção da doença humana (Neta, *et al.*, 2010).

Surtos de brucelose estão associados a abortos durante o último trimestre da gestação, recém-nascidos fracos e infertilidade em vacas e touros. A manifestação da infecção em bovinos depende da idade, estado reprodutivo e imunológico dos animais, resistência natural e virulência da estirpe em questão. Após o primeiro episódio de aborto causado pela infecção por *Brucella*, os partos seguintes ocorrem normalmente, podendo ocorrer novo aborto (Neta, *et al.*, 2010).

Os vitelos que adquirem a infecção verticalmente ou pela ingestão de leite contaminado podem permanecer seronegativos ou não demonstrar sinais da doença. Contudo,

as novilhas com infecção latente e assintomática podem abortar ou produzir vitelos infetados. Outros sinais clínicos são a redução na produção leiteira, aumento da contagem de células somáticas no leite e diminuição da eficiência reprodutiva (Neta, *et al.*, 2010).

Os machos infetados podem vir a desenvolver sinais sistêmicos da doença como febre, anorexia e depressão, embora a infecção seja inaparente. A lesão mais importante causada pela infecção por *B. abortus* nos machos é a orquite, que está frequentemente associada a vesiculite seminal e epididimite. Como resultado da cronicidade da orquite e da fibrose do parênquima testicular, os machos podem desenvolver infertilidade permanente (Neta, *et al.*, 2010).

Os fetos abortados, assim como as membranas fetais e as secreções uterinas eliminadas depois do aborto ou do parto são as fontes de infecção mais importantes. A doença também pode ser transmitida verticalmente e através do leite contaminado, mas estas formas de infecção são menos importantes (Neta, *et al.*, 2010).

Embora a infecção possa ocorrer através da pele, conjuntiva ou mucosa respiratória, a via de infecção mais comum é o trato gastrointestinal, de onde se dissemina pelos linfonodos regionais e ocorre a replicação das bactérias nos fagócitos. A invasão dos vasos linfáticos é seguida de bacteriemia, levando à infecção sistêmica e colonização do útero gestante, órgãos genitais masculinos e glândula mamária (Neta *et al.* 2010).

O diagnóstico da brucelose bovina é baseado na bacteriologia ou em serologia. A *B. abortus* pode ser isolada da placenta, mas preferencialmente em cultura pura do estômago e pulmões dos fetos abortados. As secreções mamárias são as amostras preferenciais para cultura do microrganismo em animais vivos. Os testes de aglutinação são os testes de diagnóstico padrão no sangue e também detetam anticorpos no leite e no sêmen (Nicoletti, 2013).

### **3.2. Plano de Erradicação da Brucelose nos Açores**

A erradicação da brucelose bovina tem por base o diagnóstico em vida, o abate compulsivo, sob responsabilidade dos serviços oficiais, dos animais considerados positivos ou reagentes no diagnóstico em vida, a indemnização dos detentores dos animais abatidos e a restrição de movimento nos respetivos efetivos (Decreto-Lei N.º 244/2000).

Na Região Autónoma dos Açores (RAA), o plano está estabelecido e é executado nas três ilhas que vacinam com a vacina RB 51, ou seja, São Miguel, São Jorge e Terceira, com o objetivo de erradicar a Brucelose. As restantes ilhas (Graciosa, Pico, Flores, Corvo,

Santa Maria e Faial) encontram-se “Oficialmente Indemnes de Brucelose Bovina” (Decreto-Lei N.º 244/2000).

A autoridade da RAA responsável pela coordenação e acompanhamento do plano é a Direção Regional da Agricultura e do Desenvolvimento Rural, através da sua Direção de Serviços de Veterinária. Em cada ilha, as ações são coordenadas através de um Médico Veterinário Chefe de Divisão ou do Setor de Veterinária do Serviço de Desenvolvimento Agrário de Ilha, podendo solicitar a colaboração de médicos veterinários pertencentes a outras entidades. A execução do plano é levada a cabo pelos técnicos dos Serviços de Desenvolvimento Agrário das diversas ilhas (Decreto-Lei N.º 244/2000).

A população animal abrangida pelo plano inclui todos os bovinos fêmeas com idade superior a 12 meses e pelos machos reprodutores, nos efetivos das ilhas de São Miguel, Terceira e São Jorge (Decreto-Lei N.º 244/2000).

Todas as explorações abrangidas são anualmente sujeitas a um controlo sorológico. O controlo sorológico tem como prova oficial de rastreio o teste do Rosa de Bengala (RBT) e o teste de Fixação de Complemento (FCT) como prova de confirmação e definição de positividade para efeitos de abate sanitário. A frequência e a idade dos animais sujeitos a controlo sorológico dependem do estatuto sanitário do efetivo e, nos efetivos indemnes ou oficialmente indemnes, decorre também de acordo com os indicadores epidemiológicos da região. Em efetivos não indemnes todos os animais com mais de seis meses de idade são sujeitos a controlo sorológico até alcançarem estatuto indemne ou oficialmente indemne (Decreto-Lei N.º 244/2000).

No âmbito do programa de erradicação está definida a atribuição e dinâmica de alteração de estatuto sanitário. Os animais abrangidos não testados tomam o estatuto do efetivo. Os estatutos sanitários são atribuídos ou alterados pelos serviços oficiais e dividem-se em (Decreto-Lei N.º 244/2000):

- a) Indemne (B3);
- b) Oficialmente indemne (B4);
- c) Não indemne em saneamento (B2);
- d) Não indemne infetado (B2.1).

São considerados oficialmente indemnes de brucelose bovina os efetivos em que é cumprido o programa de testes; não existem bovinos, com exceção das fêmeas vacinadas há pelo menos três anos; todos os bovinos com mais de 12 meses que entrarem no

efetivo, provenientes de explorações com estatuto igual ou superior, são submetidos a RBT e FCT com resultado negativo, nos 30 dias anteriores à sua introdução no efetivo de destino. São considerados indemnes de brucelose bovina, os efetivos que cumprem os requisitos descritos para o estatuto B4, podendo conter fêmeas vacinadas há menos de três anos. São considerados efetivos com o estatuto de não indemne infetado aqueles em que é confirmada a presença de *Brucella* em exame bacteriológico de amostras colhidas em abate sanitário ou em vida em animais suspeitos. Os efetivos não indemnes em saneamento são aqueles que obtiveram resultados negativos em dois controlos sorológicos sucessivos, sendo testados todos os animais com mais de seis meses. Um desses controlos é efetuado 30 dias depois do abate do último animal com reação positiva e o outro 60 dias depois do primeiro (Decreto-Lei N.º 244/2000).

Para a manutenção dos estatutos B4 e B3 são efetuadas duas provas de ELISA a partir do leite em explorações de aptidão leiteira com três meses de intervalo nas ilhas Terceira e São Jorge e mensalmente em São Miguel. Na primeira colheita de leite é também efetuado o controlo sorológico de todos os machos reprodutores e de todas as fêmeas que não estejam à data em lactação, incluindo novilhas e fêmeas de substituição. Nos efetivos de aptidão não leiteira é efetuado anualmente um controlo em todos os animais com mais de 12 meses de idade. Todos os soros colhidos são submetidos à RBT e os aos positivos nessa prova executa-se a prova FCT. Para efeitos de testes de pré-movimentação, são colhidas amostras aos animais a movimentar com mais de 12 meses e são efetuados os testes RBT e FCT (Decreto-Lei N.º 244/2000).

Os estatutos B4 e B3 podem ser suspensos (B4S e B3S) sempre que o plano não esteja a ser cumprido, se o inquérito epidemiológico determinar a possibilidade de infeção, quando não estão reunidas as condições para que possam ser classificados como indemnes ou oficialmente indemnes ou por qualquer outro motivo considerado para a luta contra a brucelose (Decreto-Lei N.º 244/2000).

Apenas a movimentação de animais a partir de efetivos indemnes ou oficialmente indemnes é permitida sem restrições. Os efetivos com estatuto suspenso ou não indemne apenas efetuam movimentações com destino a abate sobre controlo oficial e para estes efetivos são acionados no SNIRA controlos periódicos de movimentos (Decreto-Lei N.º 244/2000).

A comercialização e aplicação da vacina contra a brucelose no território português só é efetuada com autorização da DGAV (Direção Geral de Alimentação e Veterinária). A vacina deve ser aplicada na dose se 2 ml, por via subcutânea, na tábua do pescoço. Porém, na ilha de São Miguel a vacina é administrada na base da cauda. Esta vacina é aplicada nas ilhas de São Miguel, São Jorge e Terceira (Decreto-Lei N.º 244/2000).

#### 4. CLÍNICA DE ESPÉCIES PECUÁRIAS

Esta componente do estágio foi realizada na Associação Agrícola de São Miguel com o acompanhamento do Dr. Hélder Dinis. A Associação Agrícola de São Miguel presta vários serviços aos seus associados, entre os quais serviços de contabilidade, apoio jurídico, apoio de projetos e ao rendimento, qualidade do leite, apoio e vulgarização ao agricultor, inseminação artificial e podologia, serviços médico-veterinários, farmácia, oficina, venda de materiais e acessórios necessários à atividade agropecuária e um gabinete de apoio ao produtor no Matadouro de São Miguel. O serviço médico-veterinário prestado aos associados nas explorações é diurno e noturno e é levado a cabo por uma equipa constituída por oito profissionais.

##### 4.1. Casos clínicos em bovinos

Foram acompanhados, ao todo, 474 casos clínicos de bovinos de leite. Foi a espécie com um maior número de casos uma vez que vacas leiteiras representam a maior fatia da produção animal na ilha de São Miguel. A raça predominante na ilha é Holstein-Frísia, estando também presentes nos rebanhos alguns exemplares de Jersey. O maior número de casos observados foi na área reprodução, seguido de casos clínicos de neonatologia e gastroenterologia (Gráfico 1). A área que teve menor expressão em termos de casos clínicos foi a de oftalmologia (Gráfico 9).

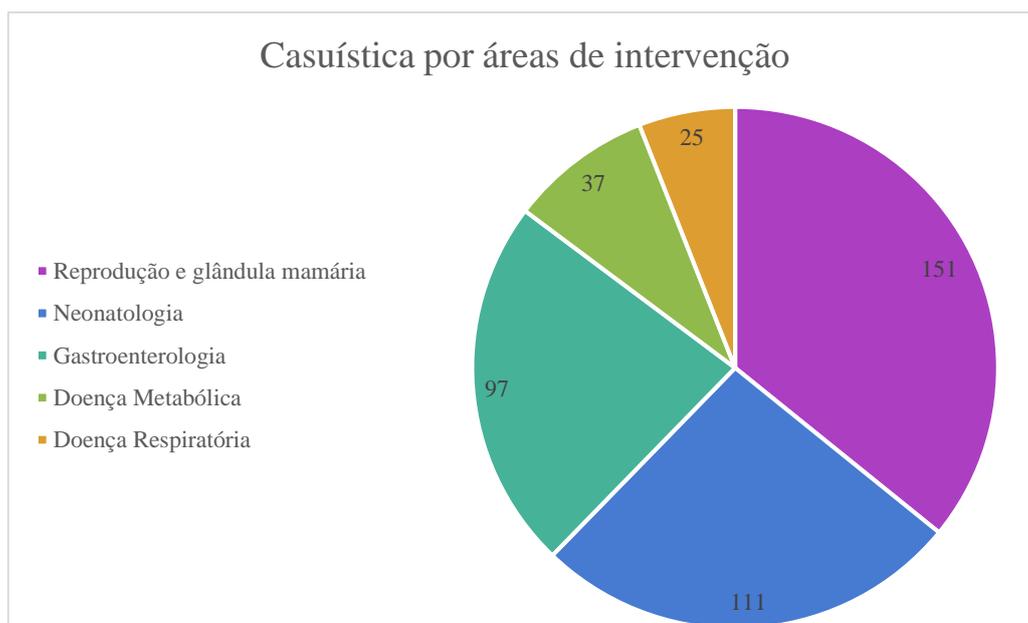


Gráfico 1: Distribuição de casos clínicos de bovinos por áreas de intervenção

Todas as consultas acompanhadas iniciaram-se com exame físico do animal. Com efeito, este é uma importante forma de chegar ao diagnóstico, sendo por vezes o único recurso disponível no campo para diagnosticar a afeição e implementar a terapêutica.

O objetivo do exame clínico é identificar as alterações clínicas que estão presentes e os fatores de risco que determinam a ocorrência da doença no indivíduo ou na população. Com esta informação é possível identificar os órgãos ou sistemas de órgãos que estão envolvidos, a localização da lesão ou tipo de lesão, os processos fisiopatológicos envolvidos e a severidade da doença (Jackson & Cockcroft, 2002).

#### **4.1.1. Reprodução, obstetrícia e glândula mamária**

Como foi dito anteriormente, as intervenções reprodutivas foram as que apresentaram maior número de casos. Uma explicação para isto é o fato de durante o tempo em que decorreu o estágio ter coincido com uma maior concentração de partos na área da ilha onde foi acompanhada a prática de clínica. A Tabela 1 apresenta o número de casos acompanhados.

**Tabela 1: Frequências absolutas e relativas de casos de reprodução acompanhados**

	<b>Frequência absoluta</b>	<b>Frequência relativa</b>
<b>Mastite</b>	42	27,81%
<b>RMF</b>	34	22,52%
<b>Metrite</b>	26	17,22%
<b>Diagnóstico de gestação</b>	15	9,93%
<b>Distócia</b>	12	7,95%
<b>Diagnóstico de estro</b>	4	2,65%
<b>Laceração teto</b>	4	2,65%
<b>Torção uterina</b>	4	2,65%
<b>Laceração do cérvix</b>	2	1,32%
<b>Vaginite/lacerações</b>	2	1,32%
<b>Cesariana</b>	2	1,32%
<b>Necrose do úbere</b>	1	0,66%
<b>Abscesso no úbere</b>	1	0,66%
<b>Prolapso uterino</b>	1	0,66%
<b>Prolapso vaginal</b>	1	0,66%
<b>TOTAL</b>	151	100,00%

RMF=Retenção das Membranas Fetais

Como é possível constatar pela tabela, as mastites tiveram o maior número de casos (27,81%), seguidos de retenção das membranas fetais (22,52%) e metrite (17,22%).

Entende-se por mastite a inflamação do parênquima da glândula mamária independentemente da causa. Esta enfermidade é, por isso, caracterizada por alterações quer físicas que químicas do leite e alterações patológicas ao nível da glândula mamária. As alterações mais importantes que são observadas no leite são a descoloração, a presença de grumos e a presença de grandes quantidades de leucócitos. Os sinais clínicos são o aumento de volume e da temperatura, a dor e o edema da glândula mamária (Radostits, *et al.*, 2006).

No total existem cerca de 140 espécies e serovarietades microbianas que são responsáveis pela mastite bovina. Estes são agrupados conforme a sua epidemiologia e patofisiologia. As classificações existentes são: contagiosos, oportunistas e ambientais (Radostits, *et al.*, 2006).

O diagnóstico de mastites clínicas era feito com base nos sinais clínicos como a presença de febre, aspeto do leite e alterações visíveis da glândula mamária. Foram acompanhados bastantes casos de mastites de “aguadilha” (mastites cuja secreção mamária de encontra descolorada, de aspeto aquoso) principalmente em vacas no período pós-parto. Os agentes etiológicos destas mastites são coliformes que se classificam como agentes ambientais (George, *et al.*, 2008). De facto, o clima que existe em São Miguel (humidade elevada com temperaturas amenas) e as condições das explorações (maioritariamente extensivas em que os animais estão no pasto e em contacto com a lama resultante da elevada pluviosidade) são predisponentes para a ocorrência destas mastites.

Provavelmente o número de mastites observado não corresponde à realidade, uma vez que, frequentemente, os produtores antes de solicitar a consulta implementam terapias geralmente recomendadas pelo médico veterinário assistente e só quando aquelas não resultam é que recorrem à sua intervenção.

Uma outra afeção muito observada é a retenção das membranas fetais (RMF). A RMF ou retenção da placenta define-se como a não expulsão das membranas fetais até 24h após o parto (Gilbert, 2012). Aborto, hidropisias, torção uterina, gestação gemelar, e distocia são alguns fatores predisponentes da doença. O *stress* devido ao calor e hipocalcemia também estão relacionados com uma maior incidência da doença. Para além disso, estão apontadas ainda causas nutricionais como a deficiência em selénio e em carotenos.

A vitamina E, implicada na função dos neutrófilos também poderá estar envolvida (Hillman & Gilbert, 2008). Vacas com RMF estão em maior risco de desenvolver metrite, deslocamento do abomaso e mastite (Gilbert, 2012).

Existem várias opções de tratamento para a RMF. Uma delas é mesmo não implementar qualquer tratamento, embora esta opção só deva ser tomada se o animal estiver saudável e devendo ser realizados exames regulares para o caso de ser necessária a administração de antibióticos ou hormonas após o desprendimento das membranas. Uma outra é a administração de antibióticos sistémicos como o ceftiofur, podendo ou não ser complementada com a administração intrauterina de antibióticos (ceftiofur, tetraciclina ou penicilina). Também se pode remover manualmente as membranas fetais, embora já não seja aconselhado por haver risco de trauma no útero. O tratamento hormonal também é uma opção, normalmente com oxitocina, prostaglandinas ou estrogénios. Adicionalmente, as membranas fetais que protraem da vulva podem ser colocadas num saco de plástico limpo de modo a evitar contaminação do útero ou ainda serem cortadas (Hillman & Gilbert, 2008).

A resolução de distócias constituiu também uma importante parte das tarefas da prática clínica e na sua maioria eram causadas pelo mau posicionamento do feto no canal de nascimento. Destaca-se particularmente uma distócia provocada por uma malformação no feto designada por *Schistosomus reflexus*. Esta malformação é caracterizada pela falha no fechamento da parede abdominal, pelo que os órgãos abdominais se encontram expostos, podendo protrair pela vulva como demonstra a Figura 1. Essa distócia foi resolvida por meio de fetotomia e a Figura 2 ilustra o aspeto do feto após a mesma.



**Figura 1: Intestinos do feto que se encontram expostos devido à alteração da parede abdominal**



Figura 2: Feto após a resolução da distócia por fetotomia

#### 4.1.2. Neonatologia

A segunda área de intervenção em que foram observados mais casos foi neonatologia com um total de 111 casos. Como é observável pela Tabela 2 quase metade (47,75%) dos casos acompanhados foram de pneumonia, seguindo-se as diarreias neonatais com 34,23% dos casos.

Tabela 2: Frequências absolutas e relativas de casos de neonatologia acompanhados

	Frequência absoluta	Frequência relativa
<b>Pneumonia</b>	53	47,75%
<b>Diarreia</b>	38	34,23%
<b>Hérnia umbilical</b>	7	6,31%
<b>Abcesso umbilical</b>	3	2,70%
<b>Traqueíte</b>	2	1,80%
<b>Fraturas</b>	2	1,80%
<b>Fotosensibilidade</b>	1	0,90%
<b>Mordeduras de cães</b>	1	0,90%
<b>Meteorismo</b>	1	0,90%
<b>DAE</b>	1	0,90%
<b>Artrite séptica</b>	1	0,90%
<b>Regurgitação</b>	1	0,90%
<b>TOTAL</b>	111	100,00%

DAE=Deslocamento de abomaso à esquerda.

As pneumonias em vitelos são multifatoriais e, assim como em bovinos adultos, são causadas por vírus (herpesvirus bovino 1, vírus respiratório sincicial bovino, vírus

parainfluenza 3) e bactérias (*Mycoplasma bovis*, *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Histophilus somni*). Para além disso estão ainda envolvidos fatores de risco relacionados com o próprio animal, assim como ambientais. Adicionalmente, o vírus da diarreia bovina (BVDV) representa um papel importante em termos de imunossupressão e tem efeitos sinérgicos com outros agentes patogénicos, para além da atuar como agente patogénico primário. Evidências recentes apontam para que o coronavírus seja também um causador de doença (Lorenz, *et al.*, 2011).

São conhecidos vários fatores que condicionam o risco de desenvolver pneumonia em vitelos. Vitelos antes do desmame e no exterior estão em menor risco de desenvolver pneumonia, porém podem acontecer surtos devido a intempéries. Por outro lado, em vitelos lactentes que nascem e são criados em estábulos a incidência de pneumonia pode ser considerável. Nos vitelos estabulados o risco de pneumonia aumenta quando o espaço é partilhado com animais mais novos, quando existe excesso de animais e quando a higiene das instalações é deficiente (Lorenz, *et al.*, 2011).

Os sinais de pneumonia em vitelos incluem o aumento da frequência respiratória, depressão e inapetência. Dado que o tratamento precoce é mais efetivo na cura definitiva da doença é importante que esta seja detetada um estado inicial (Lorenz, *et al.*, 2011).

O tratamento com antibióticos deve ser adequado na sua duração e crucialmente na precocidade com que é iniciado para evitar a formação de lesões permanentes que comprometam o sucesso da terapia, bem como, permitir a regeneração normal do parênquima. O ideal é que o primeiro tratamento seja bem-sucedido, uma vez que os animais que não respondem a este têm um fraco prognóstico. A associação com anti-inflamatórios não esteroides reduz a pirexia, os sinais clínicos e as lesões nos pulmões, e melhora o ganho de peso médio diário. Os animais doentes devem ser separados dos restantes e transferidos para instalações apropriadas (Lorenz, *et al.*, 2011a).

A *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), o *Cryptosporidium parvum*, o rotavírus e coronavírus são os agentes etiológicos mais comuns para a diarreia dos vitelos (Lorenz, *et al.*, 2011b). Porém existem outros agentes como *Salmonella*, *Clostridium perfringens* e *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (Metre, *et al.*, 2008). A doença desenvolve-se devido a um desequilíbrio entre a resistência do vitelo e a pressão de infeção. As principais medidas de manejo a ser tomadas para prevenir o aparecimento de diarreias neonatais na exploração são: prevenção de distócia, fornecimento de colostro ao vitelo no tempo e

quantidade adequados e dieta apropriada após o colostro. A pressão de infecção pode ser diminuída através de cuidados de higiene nas maternidades, comedouros, parques e no manejo dos vitelos (Lorenz, *et al.*, 2011b).

**Tabela 3: Agentes etiológicos das diarreias dos vitelos e respetivo tempo de vida em que se manifestam os sinais clínicos, adaptada de Metre *et al.*, 2008**

Agentes patogénicos		Tempo de vida do vitelo em que se observam os sinais clínicos
<b>E. coli</b>	Septicémia (vários tipos de <i>E. coli</i> )	1-14 dias
	ETEC	1-7 dias
	EHEC	4-28 dias
<b>Rotavírus</b>		< 5 dias
<b>Coronavirus</b>		7-10 dias
<b>Cryptosporidium parvum</b>		5-28 dias
<b>Salmonella</b>		2 semanas – 2 meses
<b>Clostridium perfringens</b>		15 dias - 3 meses

A maioria dos agentes patogénicos implicados nas diarreias dos vitelos (Tabela 3) causam danos na mucosa intestinal resultando na síndrome de má absorção e em diarreia secretória, com exceção da *E. coli* enterotoxigénica que apenas causa diarreia secretória nos primeiros quatro dias de vida. A terapia específica para estes agentes não impede que este mecanismo fisiopatológico se desenvolva, pelo que é imperativa a reposição dos fluidos e eletrólitos (Lorenz, *et al.*, 2011b).

O uso de antibióticos deve ser prudente e existem benefícios, uma vez que sejam utilizados em vitelos com doença sistémica (febre, depressão, anorexia marcadas) em que a proliferação de microrganismos no intestino delgado é mais provável. Nestes casos devem ser administrados antibióticos de largo espectro como beta-lactâmicos, sulfonamidas ou fluoroquinolonas. O uso de anti-inflamatórios não esteroides como meloxicam também é benéfico (Lorenz, *et al.*, 2011b).

### 4.1.3. Gastroenterologia

Na área da intervenção de gastroenterologia foram acompanhados 97 casos, sendo que 26,80% dos casos foram de deslocamento do abomaso à esquerda (DAE) e 19,59% de indigestão (Tabela 4).

Tabela 4: Frequências absolutas e relativas de casos de gastroenterologia acompanhados

	Frequência absoluta	Frequência relativa
<b>DAE</b>	26	26,80%
<b>Indigestão</b>	19	19,59%
<b>Corpo estranho</b>	15	15,46%
<b>Acidose</b>	13	13,40%
<b>Peritonite</b>	6	6,19%
<b>DAD</b>	5	5,15%
<b>Úlcera abomaso</b>	3	3,09%
<b>Diarreia</b>	3	3,09%
<b>Meteorismo</b>	3	3,09%
<b>Inf. Retal</b>	2	2,06%
<b>Intoxicação por nitratos</b>	1	1,03%
<b>Torção Intestinal</b>	1	1,03%
<b>TOTAL</b>	97	100,00%

DAE=deslocamento de abomaso à esquerda; DAD=deslocamento de abomaso à direita

O deslocamento de abomaso é a doença abdominal mais diagnosticada em bovinos leiteiros e é também causa mais comum de cirurgia abdominal (Fubini & Divers, 2008). Existem diferenças de incidência entre raças, sendo que é mais comum em raças clássicas de aptidão leiteira. Alguns estudos sugerem que a seleção para uma estatura alta e profundidade corporal podem estar na base desta predisposição observada, devido à maior distância vertical entre o abomaso e o duodeno descendente o que prejudica o esvaziamento do abomaso. O risco de desenvolver deslocamento de abomaso aumenta com a idade, sendo que as vacas com mais de três lactações são afetadas mais frequentemente que animais mais novos. A relação com a produção de leite como sendo um fator predisponente é controversa (Doll, *et al.*, 2009).

A altura em que é predominante a ocorrência de deslocamento de abomaso à esquerda (DAE) é antes do parto e nas primeiras quatro semanas pós parto. Este período está associado não só com mudanças hormonais, bem como *stress* metabólico e alterações

na alimentação. A ocorrência de DAE está associada a dietas ricas em concentrado e pouca fibra, uma vez que a presença de quantidades inadequadas de concentrado está associada a redução da motilidade abomasal. Em contraste, uma alimentação com elevada digestibilidade mas com níveis reduzidos de fibra pode ainda ser um fator de risco com maior importância (Doll, *et al.*, 2009).

O impacto do sistema de alimentação *total mixed ration* (TMR) é contraditório, porém o fator chave nesta discussão é a composição do TMR. Uma mistura desequilibrada, moagem muito fina e uma elevada fração de silagem de milho leva a uma estrutura física errada o que predispõe ao deslocamento do abomaso. Deve ser fornecida uma silagem de boa qualidade com tamanho de partícula adequado, sendo que é recomendado que a alimentação tenha 16-25% de fibra de modo a reduzir o risco de deslocamento de abomaso (Doll, *et al.*, 2009).

A relação fisiopatológica entre a alimentação rica em energia e pobre em fibra e a ocorrência de deslocamento do abomaso pode ser explicada com o facto de uma elevada concentração de ácidos gordos de cadeia curta inibir a motilidade abomasal. Por outro lado, é sugerido que a hipomotilidade abomasal também é causada pela ingestão excessiva de água e eletrólitos por causar uma distensão da parede do abomaso. Adicionalmente, a atonia do abomaso pode ser causada pela elevada concentração de endotoxinas (Doll, *et al.*, 2009).

O *stress* também pode ser um fator de risco que condicione o desenvolvimento de deslocamento de abomaso. Com efeito, alguns estudos epidemiológicos concluíram que a produção animal em fracas condições de bem-estar e o parto podem induzir *stress* suficiente para aumentar o risco de deslocamento de abomaso. Em suma, todos os fatores que levem a uma diminuição do volume de alimento no rúmen predispõem a DAE (Doll, *et al.*, 2009).

Níveis de cálcio no sangue diminuídos inibem a motilidade do abomaso, tendo sido demonstrado que vacas com hipocalcemia ao parto têm 4.8 vezes maior risco de desenvolver a doença. A cetose, balanço energético negativo e elevada condição corporal são também condições propícias ao desenvolvimento da doença. Distúrbios neurológicos do sistema nervoso entérico podem estar na origem da doença (Doll, *et al.*, 2009).

Nos casos que acompanhei de DAE o motivo mais frequente da consulta era anorexia. Os casos eram diagnosticadas através dos sinais clínicos, bem como pela auscultação abdominal e auscultação com percussão combinadas momento em que era possível ouvir os PINGs no lado esquerdo. A área mais comum em que era possível auscultar era imediatamente a seguir à última costela.

Normalmente, o tratamento preconizado era cirúrgico pela técnica de abomasopexia. Esta técnica tem as vantagens de ser executada com o animal de pé como o facto de a haver risco mínimo de regurgitação e o risco de desenvolvimento de pneumonias e distúrbios músculo-esqueléticos ser menor, ao contrário o que acontece em procedimentos executados com o animal em decúbito dorsal. Porém tem as desvantagens de haver a possibilidade de infeção exógena, colocação errada do órgão na cavidade abdominal ou das suturas devido ao acesso limitado ao abomaso e falha na execução da abomasopexia por má aposição ao peritoneu parietal ou rompimento das suturas (Fubini & Divers, 2008).

O procedimento era iniciado pela incisão na pele e camadas musculares na fossa paralombar esquerda. Com acesso à cavidade abdominal o abomaso era localizado e executada a sutura contínua ancorada no mesmo com fio não absorvível (nylon) com cerca de 15 cm, de modo a que no início e final da mesma fossem deixadas pontas compridas. De seguida esvaziava-se o abomaso e este era colocado na sua posição anatómica e, com a ajuda de uma agulha, era fixado à parede abdominal ventral com ambas as pontas compridas que eram fixadas no exterior. A incisão era fechada com suturas simples contínuas em cada camada muscular e na pele com fio de sutura de seda (Duncanson, 2013).

A indigestão simples é uma doença que é mais comum em bovinos leiteiros e bovinos de engorda devida à variedade e grandes quantidades de alimento que é ingerido por estes animais. As causas mais comuns da doença são erros ténues na dieta incluindo uma forragem pouco digerível, particularmente quando o teor em proteína é baixo; alimento com bolor, congelado ou com elevada temperatura e excessos moderados de concentrado energético (Radostits, *et al.*, 2006).

Os casos ocorrem com excelentes regimes alimentares e são usualmente atribuídos a ingestão excessiva de concentrado energético, embora a diferença entre indigestão simples e a sobrecarga de concentrado seja justificada pela marcada diferença clínica en-

tre os dois. A sobrecarga de concentrado está associada aos animais que têm acesso acidental a grandes quantidades de sementes ou é introduzida uma dieta com elevados teores de sementes. Já a indigestão simples acontece devido a uma indiscrição alimentar como a ingestão em demasia de alimento palatável ou indigesto. Uma mudança repentina para uma nova fonte de grão ou ainda o consumo excessivo de palha finamente cortada pode originar uma indigestão (Radostits, *et al.*, 2006).

Os sinais clínicos dependem da causa do desequilíbrio. A ingestão exagerada de silagem causa anorexia e uma queda na produção de leite moderada. O rúmen encontra-se cheio e firme. A frequência das contrações primárias encontra-se diminuída ou estas encontram-se mesmo ausentes, mas as contrações secundárias podem estar presentes. As constantes vitais encontram-se dentro dos limites fisiológicos. As fezes estão normais ou com consistência aumentada. A recuperação usualmente é espontânea com 24 a 48 horas (Constable, 2012).

Por outro lado, a indigestão por ingestão excessiva de grão resulta em hipomotilidade ou atonia ruminal. As fezes encontram-se moles e malcheirosas. O animal afetado normalmente começa a comer em 24 horas (Constable, 2012).

Devem ser tidos em conta três critérios aquando do diagnóstico de indigestão: hipomotilidade ou atonia do retículo-rúmen, conteúdo ruminal incomum e exclusão de todas as doenças que afetam o trato gastrointestinal. Uma amostra de fluido ruminal é necessária para confirmar o diagnóstico (Grungerg & Constable, 2009).

O tratamento consiste primariamente na correção do erro alimentar que levou à doença. A cura espontânea é comum em animais que retornam à sua dieta normal. A administração de 20 L de água morna ou salina por meio de um tubo oro-gástrico, seguida de uma massagem ruminal vigorosa ajuda a restaurar a função ruminal. A administração de substâncias estimulantes da ruminação não estão aconselhadas como tratamento. Nalguns animais é benéfico a transferência de fluido ruminal de um animal saudável. Para corrigir possíveis desequilíbrios de eletrólitos e ácido-base devem ser administradas soluções intravenosas ou orais, particularmente em animais desidratados (Constable, 2012).

#### **4.1.4. Doença metabólica**

A maioria das doenças metabólicas que afetam as vacas ocorrem nas primeiras duas semanas de lactação imediatamente a seguir ao parto. Estas podem ter origem em acontecimentos que se deram no início da lactação. Adicionalmente à doença metabólica,

a maioria das doenças infecciosas (especialmente a mastite, mas também a PT e salmonelose) tornam-se clinicamente aparentes durante as primeiras duas semanas de lactação (Goff & Horst, 1997).

No decorrer do estágio foram acompanhados 37 casos de doença metabólica dos quais 67,57% foram de cetose e os restantes de hipocalcemia (Tabela 5).

**Tabela 5: Frequências absolutas e relativas de casos de doença metabólica acompanhados**

	Frequências relativas	Frequências absolutas
<b>Cetose</b>	25	67,57%
<b>Hipocalcemia</b>	12	32,43%
<b>TOTAL</b>	37	100,00%

Algumas das doenças metabólicas como a hipocalcemia são desencadeadas por práticas de manejo que têm como objetivo aumentar e melhorar a produção e por isso são consideradas doenças de produção. Por outro lado, são também doenças metabólicas, uma vez que o animal é direcionado para a produção e o seu manejo leva a que o mesmo seja incapaz de obter os nutrientes em concentrações fisiológicas (Allen, 2012).

A cetose ocorre quando a vaca se encontra em balanço energético negativo e acontece mais frequentemente nas últimas duas semanas de gestação ou no início da lactação. Nas duas últimas semanas da gestação fatores hormonais e diminuição da capacidade do rúmen levam a uma ingestão deficitária de alguns nutrientes e/ou a um aumento da lipólise. Aquando do parto a demanda de nutrientes aumenta com o início da produção de leite e o balanço energético negativo acentua-se. Simultaneamente, a produção de leite é prioritária na utilização de energia e existe uma demanda secundária de lípidos. Torna-se então impossível alimentar os animais de modo a colmatar as exigências da produção nas duas semanas antes do parto e quatro após o mesmo (Peek & Divers, 2008).

A mobilização de tecido adiposo é acompanhada de um aumento da concentração de ácidos gordos esterificados que, em períodos de neoglicogénese prolongados, são direcionados para o fígado a fim de serem metabolizados em corpos cetónicos. Estes corpos cetónicos são a acetona, acetoacetato e  $\beta$ -hidroxibutirato (Allen, 2012).

O primeiro sinal de cetose é, normalmente, uma diminuição da quantidade de alimento ingerido sendo que preferem forragem em vez de concentrado. Outros sinais são redução da produção de leite, letargia e grau de repleção do rúmen baixo. No exame físico

as vacas podem encontrar-se ligeiramente desidratadas, a motilidade ruminal pode estar aumentada ou diminuída. Distúrbios do sistema nervoso central podem ser notados na minoria dos casos e incluem mastigação incessante de objetos, ataxia, agressão e vocalização (Allen, 2012).

O diagnóstico é feito com base nos sinais clínicos e a presença de corpos cetónicos na urina. O tratamento preconizado nos casos acompanhados incluía a administração de glucose e de um complexo de aminoácidos por via intravenosa, seguida de dexametasona por via intramuscular e propilenoglicol por via oral.

A prevenção de cetose faz-se por via do maneiro nutricional. A condição corporal deve ser vigiada no final da gestação quando os animais normalmente tendem a aumentar a respetiva pontuação. As dietas devem ser modificadas de modo a fornecerem elevada quantidade de energia derivada de fibra digerível. O desafio na prevenção da cetose é manter ou promover a ingestão de alimento, uma vez que esta tende a diminuir nas últimas três semanas de gestação. Após o parto, a dieta deve promover um aumento rápido e sustentável do consumo de alimento e energia (Allen, 2012).

#### **4.1.5. Doença respiratória**

Como se pode observar pela Tabela 6 quase todos os casos de doença respiratória observados em bovinos adultos são de pneumonia (96%).

**Tabela 6: Frequências absolutas e relativas de casos de doença respiratória acompanhados**

	Frequências relativas	Frequências absolutas
<b>Pneumonia</b>	24	96,00%
<b>Traqueíte</b>	1	4,00%
<b>TOTAL</b>	25	100,00%

A doença respiratória em bovinos está normalmente associada a animais mais novos: vitelos e novilhos. A maioria dos casos ocorre antes dos dois anos e tem um grande impacto económico, principalmente em produção de carne (Maillard, Assié, & Douart, 2006).

Os casos de pneumonias em adultos são esporádicos, salvo algumas exceções como os surtos de IBR (*Infectious Bovine Rhinotracheitis*) e coronavírus, e não são uma causa primária de refugo na manada. Por isso o impacto económico desta doença aparenta

ser de importância menor (Maillard, *et al.*, 2006). Durante o estágio foram diagnosticados casos de pneumonias em vacas em regime extensivo.

De modo a fazer um correto diagnóstico de doença respiratória é necessário combinar um bom conhecimento da história da exploração associada a um cuidadoso exame clínico. A abordagem a tomar será averiguar quantos animais estão afetados (doença esporádica ou de grupo) e se é crónica ou aguda. O prognóstico adequado será tão importante como o correto diagnóstico, uma vez que a doença crónica ou severa pode levar ao refugio (Maillard, *et al.*, 2006).

Na Tabela 7 estão descritos as possíveis etiologias de doença respiratória em bovinos adultos.

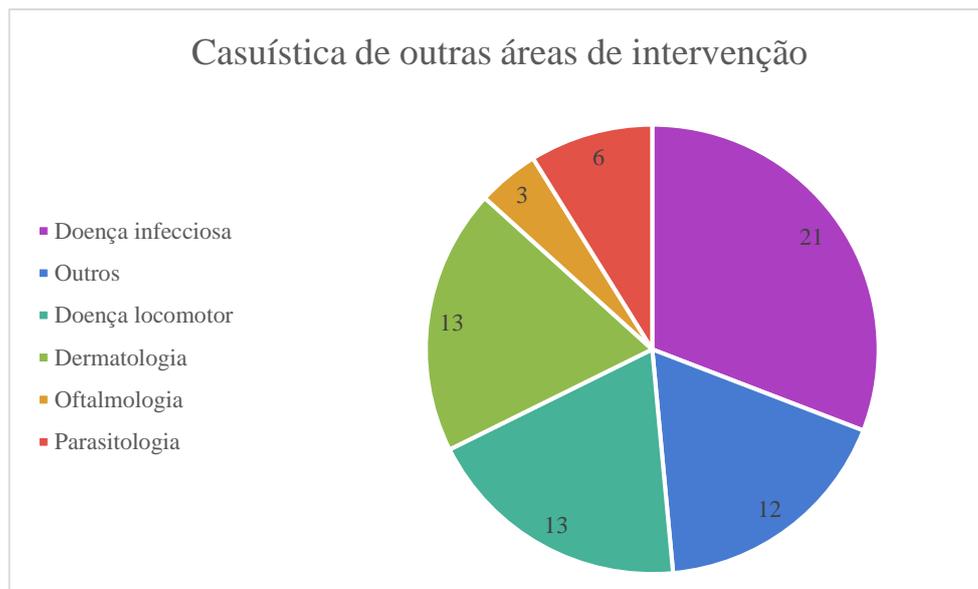
Tabela 7: Etiologias para doença respiratória em bovinos adultos, adaptada de Maillard *et al.*, 2006

Nome	Etiologia	Frequência	Impacto clínico	Animais afetados	Epidemiologia
<b>Rinite</b>	Bacteriano, fúngico, irritante, alérgico.	+	+	Jovens> adultos	Esporádico ou enzoótico
<b>Sinusite</b>	Vários	++	++	Jovens> adultos	Esporádico (associado à descorna)
<b>Laringite</b>	Vários	+	+++	Jovens> adultos	Enzoótico nos jovens, esporádico nos adultos
<b>IBR</b>	BoHV-1	Variável	De 0 a ++++++	Todas as idades	Enzoótico
<b>Pasteurelose</b>	<i>M. haemolytica</i> <i>P. multocida</i>	++++	++++	Todas as idades Jovens> adultos	Enzoótico ou esporádico, crónico se terapia inefetiva.
<b>Micoplasmose</b>	<i>Mycoplasma bovis</i>	+++	++++	Todas as idades	Sinais associados: artrite nos jovens
<b>Pneumonia viral intersticial</b>	BRVS, PI3, <i>Adenovirus</i> , BVDV (associado)	+++++	++++	Todas as idades Jovens> adultos	Enzoótica mas rara, sinais clínicos indiferenciados em adultos
<b>Parasitose</b>	<i>Dictyocaulus viviparus</i>	De 0 a +++++	De + a +++++	Todas as idades	Enzoótico (aspecto contagioso) Crónico

Nome	Etiologia	Frequência	Impacto clínico	Animais afetados	Epidemiologia
<b>Febre Q</b>	<i>Coxiella burnetii</i>	?	De 0 a ++	Adultos> jovens	Enzoótico Sinal associado: aborto
<b>Ehrlichiose</b>	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Muitas vezes desconhecido	De 0 a +++	Adultos> jovens	Enzoótico (aspeto contagioso)
<b>Febre cataral maligna</b>	OvHV2, AHD1	+	+++++	Adultos> jovens	Esporádico Múltiplos sinais associados
<b>Edema pulmonar agudo</b>		+	++++	Adultos	Múltiplos sinais associados
<b>Trombose da veia cava</b>		+	+++++	Adultos> jovens	Esporádico Múltiplos sinais associados
<b>Alveolite extrínseca alérgica</b>	<i>Micropolyspora foeni</i> e outros esporos	++	++++	Adultos	Esporádico
<b>Neoplasia</b>	Primária ou secundária	Raro	++++	Adultos	Esporádico
<b>Alvandolite fibrosante</b>	Desconhecido	Raro	++++	> 6 anos	Esporádico

#### 4.1.6. Outras áreas de intervenção

Por terem menos importância em termos de número de casos observados as restantes áreas de intervenção são apresentadas num único capítulo e estão representadas no Gráfico 2:



**Gráfico 2: Distribuição do número de casos pelas restantes áreas de intervenção**

Na área de intervenção das doenças infecciosas foram observados 21 casos. A maioria dos quais foram de PT, seguidos de sete casos de queratoconjuntivite por *Moraxella bovis*.

Nos casos de PT o motivo da consulta era maioritariamente emagrecimento e queda na produção de leite. Na maioria dos casos os animais foram encaminhados para o matadouro devido ao carácter crónico e progressivo da doença. Para além disso, os animais que eram uma fonte de transmissão a outros, principalmente aos animais mais jovens.

Os casos de queratoconjuntivite por *Moraxella bovis* eram diagnosticados com base nos sinais clínicos: úlcera da córnea, normalmente central; blefarospasmo, epífora mucopurulenta e pela ausência de sinais clínicos concomitantes com as lesões oculares. Os animais mais jovens são os mais frequentemente afetados e geralmente existe mais do que um animal afetado. Os diagnósticos diferenciais que deve ser tidos em conta nesta doença são a rinotraqueíte bovina (IBR) e *Mycoplasma* spp. (Angelos, 2013). O tratamento preconizado era a administração de uma mistura de dexametasona e oxitetraciclina por via subconjuntival.

Nas afeções do sistema músculoesquelético o motivo mais frequente da consulta era a claudicação. As causas não infecciosas de claudicação mais comuns são úlcera da sola, doença da linha branca e lesões traumáticas da sola. Estas doenças podem ser com-

plicadas por fatores mecânicos resultantes da estabulação dos animais em superfícies duras que predisõem a claudicação quer seja por sobrecrescimento ou alteração da distribuição do peso, ou ainda predispostas por lesões traumáticas exacerbadas por solos abrasivos. O segundo grupo de doenças que afetam os dígitos dos ruminantes são as doenças infecciosas que afetam a pele do espaço interdigital. Embora haja algumas diferenças nas condições em que se podem desenvolver, têm um denominador em comum: são causadas por agentes infecciosos capazes de induzir inflamação e claudicação (Shearer & Amstel, 2011).

Todos os casos observados de dermatologia foram de fotossensibilidade. Os casos acompanhados concentraram-se nos meses de setembro, outubro e novembro, e por isso é muito provável que tenham sido causados pela esporidesmina presente nos esporos do fungo *Pithomyces chartarum* nas pastagens, uma vez que estavam presentes as condições de humidade (superior a 90%) e temperatura (superior a 16,5°C) para o seu rápido crescimento. Os primeiros sinais de fotossensibilização desenvolvem-se entre dez dias a catorze dias após a ingestão da erva da pastagem com contagens elevadas de esporos do fungo (Seawright, 1989).

Os esporos do fungo contêm esporidesmina, uma potente hepatotoxina que causa pericolangite e a oclusão dos ductos biliares, resultando na redução da excreção da filioeritrina (metabolito fotodinâmico produzida na degradação microbiana da clorofila no rúmen). Os animais afetados têm níveis plasmáticos de filioeritrina e tornam-se sensíveis à luz solar, especialmente nas áreas não pigmentadas. Os primeiros sinais podem ser inapetência e diarreia transitória logo após os animais estarem expostos à toxina (Pinto, *et al.*, 2005).

Nos casos acompanhados o tratamento passava pela administração de cápsulas de zinco, o qual impede a formação de radicais livres, *stress* oxidativo das membranas e diminuição da cascata inflamatória desencadeada pela esporidesmina. Deste modo, é impedido o dano aos ductos biliares causado pela toxina. Administrava-se ainda fluidoterapia de suporte em caso de desidratação e um corticosteroide. A administração de sais de zinco é uma medida preventiva e deve ser feita antes dos animais estarem expostos ao fungo, mas como os animais se encontravam em pastoreio era considerado benéfico,

mesmo já estando presentes os sinais clínicos. Era ainda aconselhado que os animais diminuíssem a ingestão de pastagem e que os mais afetados permanecessem num local onde não estivessem expostos à luz solar.

Foram ainda acompanhados dois casos de fotossensibilidade por ingestão de *Lantana camara*. O diagnóstico foi feito com base na presença da planta na pastagem e a partir da necrópsia de um dos animais que morrera na exploração. As lesões hepáticas provocadas pela ingestão de *Lantana camara* diferem bastante das provocadas pela esporidesmina. Com efeito, as lesões provocadas pela esporidesnima incluem o espessamento dos canais biliares intra e extrahepáticos, o fígado encontra-se fibrosado e de coloração esverdeada ou acinzentada. Já as lesões observadas nos casos de ingestão de *Lantana camara* incluem hepatomegalia, coloração ocre do fígado, distensão acentuada da vesícula biliar com conteúdo aquoso. Pode ainda estar presente colecistite (Seawright, 1989).

#### **4.2. Casos clínicos noutras espécies**

Ao longo do estágio foram apenas acompanhados quatro casos de outras espécies animais para além dos bovinos. Foram consultadas dois caprinos, dois suínos e um equino.

A um dos caprinos foi diagnosticado toxemia da gestação. Esta doença é mais comum em cabras gestantes de três cabritos ou animais obesos ou magros. Com o avançar da gestação, o espaço abdominal vai diminuindo, acontecendo o mesmo em animais muito obesos em que a gordura abdominal ocupa também espaço. Como consequência, as fêmeas têm dificuldade em ingerir alimento suficiente para suprir as suas necessidades. Para além disso, o final da gestação acontece nos meses de inverno, quando há menos disponibilidade de pastagem (Navarre, 2007).

Os sinais de toxemia da gestação desenvolvem-se uma a três semanas antes do parto. Há perda de apetite, principalmente no consumo de grão. Outros sinais demonstrados são apatia, marcha desorientada, tremores, opistótonos, ranger dos dentes e conforme a doença vai progredindo (geralmente em dois a quatro dias), cegueira, ataxia e finalmente decúbito esternal, coma e morte (Menzies, 2011).

O diagnóstico é baseado nos sinais clínicos, a presença de múltiplos fetos e os achados clinico-patológicos. Os diagnósticos diferenciais incluem listeriose, hipocalcemia, poliencefalomalácia, hipomagnesiemia e infestação das meninges por parasitas (Navarre, 2007).

Em casos mais precoces (antes do decúbito) podem ser tratados com glucose via oral ou precursores da glucose como o propilenoglicol (60-100 mL/dia duas vezes por dia). Quando estão presentes sinais neurológicos, o tratamento tem de ser mais agressivo, nomeadamente com recurso a glucose, borogluconato de cálcio e bicarbonato de sódio por via intravenosa. Os glucocorticoides (dexametasona) podem ajudar na recuperação, uma vez que são estimulantes da neoglucogénese, aumentam o apetite e podem induzir o aborto. A administração de flunixinina meglumina está indicada caso haja suspeita de endotoxémia provocada pela morte dos fetos. A remoção dos fetos é crítica nesses casos (Navarre, 2007).

## 5. INSPEÇÃO SANITÁRIA

A componente de inspeção sanitária do estágio foi efetuada no Matadouro de São Miguel (MSM). Foram acompanhados ao todo 45 dias de abate durante o período de estágio. Uma vez que as idas ao matadouro eram de grande importância para a recolha de dados e de amostras para o estudo, estas foram organizadas para que se acompanhasse essencialmente o abate de vacas adultas. Como tal, os dias destinados ao abate de bovinos adultos foram as terças e sextas-feiras. Durante esses dias houve a oportunidade de acompanhar os procedimentos de inspeção *ante mortem* (exame em vida) e *post mortem* (inspeção de carcaças e vísceras).

Os resultados apresentados referem-se aos abates efetuados de bovinos, uma vez que não foram acompanhados abates de outras espécies, excetuando ocasiões pontuais em que por força do volume de trabalho nos dias estipulados para o abate de bovinos foram abatidas outras espécies, nomeadamente suínos.

### 5.1. Inspeção *ante mortem*

A inspeção *ante mortem* consiste num exame efetuado aos animais antes do abate e inclui o controlo documental, controlo de identidade e o controlo físico (Pereira *et al.* 2012). Deve ser feito a todos os animais, nas 24 horas seguintes à sua chegada ao matadouro e menos de 24 horas antes do abate, podendo o veterinário oficial ainda exigir uma inspeção adicional em qualquer outro momento (Regulamento (CE) N.º 854/2004).

A inspeção *ante mortem* tem a finalidade de identificar e apreciar em cada lote de animais o seu estado sanitário; detetar sintomas de doenças ou perturbações do estado geral dos animais suscetíveis de tornar as carnes impróprias para consumo humano; detetar indícios de que foram administradas substâncias farmacológicas aos animais ou de que os animais consumiram substâncias que tornem as carnes prejudiciais à saúde humana. Tem ainda como objetivos identificar e isolar animais doentes ou suspeitos ou em agonia e que exigem uma manipulação especial de forma a evitar ou controlar a contaminação e propagação de doenças e detetar fatores que possam ter consequências para a saúde humana ou animal com especial atenção para a deteção de zoonoses e doenças das listas da Organização Internacional de Epizootias (Pereira, *et al.*, 2012). Na Figura 3 apresenta-se uma possível causa de rejeição da carne para consumo humano da região que se encontra afetada.



**Figura 3: Lesão na extremidade distal de bovino detetada aquando da inspeção *ante mortem***

No controlo documental de bovinos é exigido ao apresentante o Passaporte Individual, a Declaração de Deslocações e a Declaração de Informação Relativa à Cadeia Alimentar (IRCA). Caso o animal se destine a abate de emergência deve ainda vir acompanhado de uma declaração emitida pelo médico veterinário assistente da exploração de proveniência (Pereira, *et al.*, 2012). O veterinário oficial deve certificar-se de que os animais não sejam abatidos se o operador do matadouro não tiver recebido e verificado as informações sobre a cadeia alimentar pertinentes. Contudo, o veterinário pode autorizar que os animais sejam abatidos no matadouro mesmo que estas informações não estejam disponíveis, tendo as mesmas de ser apresentadas antes de a carcaça ser aprovada para consumo humano. Na pendência de uma decisão final, as carcaças devem ser armazenadas em separado das outras. Se as informações sobre a cadeia alimentar não estiverem disponíveis nas 24 horas a contar da chegada do animal ao matadouro, toda a sua carne deve ser declarada imprópria para consumo humano (Regulamento (CE) N.º 854/2004).

Se o animal não se fizer acompanhar dos documentos necessários ou se não se apresentar com, pelo menos, uma marca auricular, não será admitido no matadouro, excetuando o caso de um abate de emergência. Nesse caso, a carcaça e as vísceras aguardam em observação até os documentos em falta serem entregues ou até que o proprietário apresente o pedido de fornecimento de marcas auriculares realizado em data anterior ao abate (Pereira, *et al.*, 2012).

Sempre que os registos, documentação ou outras informações que acompanhem o animal revelem que os animais provêm de uma exploração ou área sujeita a interdição de deslocação ou outra restrição motivada por razões de saúde animal ou pública; as regras para o uso de medicamentos veterinários não foram cumpridas ou está presente qualquer outro fator que possa ter consequências negativas para a saúde de humanos ou animais, esse animal não pode ser aceite para abate. Se o animal naquelas condições já se encontrar no matadouro é abatido separadamente e a sua carne e vísceras declaradas impróprias para consumo (Regulamento (CE) N.º 854/2004).

De seguida, um abegão procede ao registo dos dados do animal no programa informático do matadouro e um outro verifica a correspondência entre as marcas auriculares e os passaportes dos animais, sendo depois os bovinos encaminhados para a abegoria onde são estabulados por idades (menos de 48 meses, mais de 48 meses), sexo e condição de abate. A identificação dos bovinos é confirmada na base de dados do Sistema Nacional de Informação e Registo Animal (SNIRA) (Pereira, *et al.*, 2012).

Durante a estabulação o inspetor deve fazer o controlo físico dos bovinos: uma apreciação zootécnica e do estado geral, podendo ser complementado com um exame mais específico. No exame físico dos animais o médico veterinário deve, sempre que possível ser acompanhado do abegão para que este lhe possa prestar os esclarecimentos necessários e atender às suas indicações. Quando, no exame geral, o inspetor deteta alguma alteração do estado normal de um animal realiza um exame especial ao mesmo (Pereira, *et al.*, 2012). Devido à elevada incidência de neoplasias na zona ocular e área genital dos bovinos explorados em São Miguel é prestada particular atenção a estas áreas nos bovinos adultos.

Após a execução da inspeção sanitária *ante mortem*, é tomada uma decisão sanitária e os animais poderão ser agrupados nos seguintes casos: aprovado para abate sem restrições, aprovado para abate com restrições especiais, sujeito a adiamento da autorização de abate ou reprovado para abate para produção de carne fresca para consumo humano (Pereira, *et al.*, 2012). Na Figura 4 apresenta-se um bovino rejeitado para produção de carne fresca para consumo humano por caquexia.



**Figura 4: Bovino rejeitado em vida por caquexia**

Um animal é, portanto, aprovado para abate sem restrições quando não se verifica qualquer estado anormal significativo ou de doença e o animal tenha efetuado um período de repouso adequado. Por outro lado, um animal seria aprovado para abate com restrições especiais quando na inspeção *ante mortem* se verifique a suspeita de doença que seja motivo de reprovação total na inspeção *post mortem*, quando na inspeção *ante mortem* se diagnostique ou suspeite de um estado ou doença que durante a inspeção *post mortem* seja motivo de reprovações parciais. No grupo sujeito a adiamento da autorização de abate incluem-se os animais que tenham tido uma duração de repouso insuficiente e que nos estados que tornem os animais transitoriamente impróprios para proporcionar carnes adequadas para consumo humano. Finalmente, um animal será reprovado para abate para a produção de carne fresca para consumo humano quando se verificava um estado ou doença que seja motivo de reprovação total. Alguns exemplos de casos possíveis para reprovação para abate para produção de carne fresca para consumo humano são: síndrome febril, debilidade, sintomas que indiquem doença infecciosa aguda; estado agônico; administração de medicamentos cujo intervalo de segurança não foi cumprido; animais recém-nascidos, carcinoma escamoso do olho, pele ou vulva; caquexia e fotossensibilidade em fase aguda da pele (Pereira, *et al.*, 2012).

Segundo o Regulamento (CE) N.º 854/2004, o veterinário oficial deve assegurar-se que todos os animais aceites para abate estão identificados e, se isso não for possível que os animais não identificados sejam abatidos separadamente e declarados impróprios para consumo humano. Deve assegurar ainda que os animais que apresentem o couro, pele ou velo em condições tais que exista risco de contaminação da carne durante o abate

não sejam abatidos para consumo humano, a menos que se proceda previamente à sua limpeza. Os animais que sofram de doenças ou afeções que possam ser transmitidas a outros animais ou a humanos através da manipulação ou consumo da carne e animais que apresentem sinais clínicos de uma doença sistêmica ou emaciação não devem ser abatidos para consumo humano, sendo abatidos separadamente e declarados impróprios para esse fim. Os animais que possam apresentar resíduos de medicamentos veterinários superiores aos estabelecidos nos termos da legislação comunitária ou resíduos de substâncias proibidas devem ser abatidos separadamente dos outros lotes entregues no matadouro. As suas carcaças e miudezas devem ser apreendidas e o veterinário deve proceder a todas as colheitas necessárias para detetar as referidas substâncias. Em caso de resultado positivo, a carne e miudezas deverão ser entregues na fábrica de transformação de subprodutos de alto risco (Regulamento (CE) N.º 854/2004; Directiva 96/23/CE).

De modo a minimizar a contaminação da linha de abate, a ordem de abate dos bovinos no MSM é a seguinte:

1. animais com menos de 48 meses aprovados para abate sem restrições;
2. animais com mais de 48 meses aprovados para abate sem restrições;
3. animais com menos de 48 meses aprovados para abate com restrições especiais;
4. animais com mais de 48 meses aprovados para abate com restrições especiais;
5. animais de abate sanitário, seguindo a mesma ordem descrita anteriormente, tendo em conta a idade e a existência ou não de restrições especiais na aprovação para abate; animais reprovados em vida.

Os abates de emergência e urgência são efetuados o mais rapidamente possível, não devendo existir um período de mais de duas horas entre a receção do animal e o seu abate (Pereira, *et al.*, 2012).

## **5.2. Inspeção *post mortem***

O exame *post mortem* é efetuado com base nas informações recolhidas no exame em vida dos animais. Consiste num exame sensorial e macroscópico de todas as partes do animal abatido (Pereira, *et al.*, 2012).

As carcaças e as miudezas que as acompanham devem ser submetidas à inspeção *post mortem* imediatamente após o abate. Todas as superfícies externas devem ser analisadas, sendo necessária a existência de instalações técnicas ou uma manipulação mínima da carcaça e das vísceras para esse fim. A velocidade da cadeia de abate e a quantidade de pessoal de inspeção presente devem ser de modo a permitir uma inspeção correta (Regulamento (CE) N.º 854/2004).

Na linha de abate de bovinos do MSM existem dois postos de inspeção apropriados e onde os inspetores se encontram permanentemente e de modo ininterrupto. Um desses locais destina-se à inspeção sanitária de carcaças (que antes deste posto são cortadas em meias carcaças) e um outro destinado à inspeção sanitária de miudezas. Existe comunicação entre os dois inspetores nos dois postos no momento em que a decisão sanitária é tomada, pelo que o resultado da inspeção *post mortem* leva em conta as informações recolhidas pelos dois inspetores.

A inspeção *post mortem* da carcaça e miudezas tem em conta aspetos como a raça, idade e sexo, estado de limpeza, hemorragias e edemas, eficiência da sangria, estado das serosas, textura, consistência, cor, cheiros anormais, desenvolvimento muscular, cobertura adiposa, anomalias ósseas, anomalias articulares, anomalias musculares e lesões de natureza traumática, inflamatória, parasitária e tumoral (Pereira, *et al.*, 2012).

Na inspeção *post mortem* devem ser efetuados exames suplementares como a palpação e a incisão de partes da carcaça e miudezas e testes laboratoriais de modo a chegar a um diagnóstico definitivo o ainda detetar uma doença do foro animal, resíduos ou contaminantes em teores superiores aos estabelecidos na legislação comunitária, não conformidade com os critérios microbiológicos, ou ainda outros fatores que possam implicar que a carne seja declarada imprópria para consumo humano (Regulamento (CE) N.º 854/2004).

Segundo o Regulamento (CE) N.º 854/2004, a carne deve ser declarada imprópria para consumo se:

1. for proveniente de animais que não tenham sido submetidos a inspeção *ante mortem*, de animais cujas miudezas não tenham sido submetidas a inspeção *post mortem*, de animais mortos antes do abate, nados mortos, mortos *in utero* ou abatidos com menos de sete dias de abate, de animais

- que sofram de doenças dos animais para as quais foram estabelecidas normas de saúde animal ou de animais afetados por uma doença generalizada como septicemia, piemia, toxemia ou viremia;
2. consistir em carne que resultar de aparas de feridas de sangria;
  3. consistir em carne que não estiver em conformidade com os critérios microbiológicos estabelecidos na legislação;
  4. revelar infestação parasitária;
  5. conter resíduos ou contaminantes em teores superiores aos estabelecidos na legislação comunitária;
  6. for proveniente de animais ou carcaças que contenham resíduos de substâncias proibidas ou de animais que tenham sido tratados com substâncias proibidas;
  7. consistir em fígados e rins de animais com mais de dois anos de idade provenientes de regiões onde se tenha revelado a presença de metais pesados;
  8. carne ilegalmente tratada com descontaminantes, radiações ionizantes ou raios UV;
  9. consistir em carne contendo corpos estranhos;
  10. exceder os teores máximos permitidos em matéria de radioatividade;
  11. revelar alterações fisiopatológicas, anomalias de consistência, sangria insuficiente ou anomalias organolépticas (ex.: pronunciado odor sexual);
  12. for proveniente de animais emaciados;
  13. conter matérias de risco especificadas;
  14. consistir em sangue que possa constituir perigo para a saúde pública ou animal;
  15. apresentar conspurcação ou contaminação de natureza fecal ou outra;
  16. na opinião do veterinário oficial puder constituir um perigo para a saúde humana ou animal.

Para proceder à inspeção *post mortem* de carcaças e vísceras de bovinos, o Regulamento (CE) N.º 854/2004 determina os procedimentos que devem ser executados obrigatoriamente (Tabela 8).

Tabela 8: Procedimentos de inspeção obrigatórios em bovinos, adaptada do Regulamento (CE) N.º 854/2004

Procedimentos de inspeção em bovinos			
Sistema ou órgão		Menos de 6 semanas	Mais de 6 semanas
<b>Cabeça</b>	Cabeça e garganta	Visual	Visual
	Ln. submandibulares		Incisão e exame
	Ln. retrofaríngeos	Incisão e exame	Incisão e exame
	Ln. parotídeos		Incisão e exame
	Masseteres		Incisão
	Boca		Visual
	Amígdalas	Removidas	
	Língua	Palpação	Visual e palpação
<b>Respiratório</b>	Traqueia/Brônquios	Visual, abertura longitudinal	Visual, abertura longitudinal
	Pulmões	Visual, palpação, incisão no terço posterior (se para consumo humano)	Visual, palpação, incisão no terço posterior (se para consumo humano)
	Ln. brônquicos	Incisão e exame	Incisão e exame
	Ln. mediastínicos	Incisão e exame	Incisão e exame
<b>Coração</b>	Coração	Visual, incisão longitudinal	Visual, incisão longitudinal
	Pericárdio	Visual	Visual
<b>Diafragma</b>		Visual	Visual
<b>Fígado</b>	Fígado	Visual e palpação, se necessário incisão	Visual, palpação, incisão na superfície gástrica e na base do lobo caudado
	Ln. hepáticos e pancreáticos	Visual e palpação, se necessário incisão	Visual e palpação

Sistema ou órgão		Procedimentos de inspeção em bovinos	
		Menos de 6 semanas	Mais de 6 semanas
<b>Gastrointestinal</b>	Esófago	Visual	Visual
	Trato gastrointestinal	Visual	Visual
	Mesentério	Visual	Visual
	Ln. gástricos	Visual e palpação, se necessário incisão	Visual e palpação, se necessário incisão
	Ln. mesentéricos	Visual e palpação, se necessário incisão	Visual e palpação, se necessário incisão
	Baço	Visual, se necessário palpação	Visual, se necessário palpação
<b>Urogenital</b>	Rins	Visual, se necessário incisão	Visual, se necessário incisão
	Ln. renais	Visual, se necessário incisão	Visual, se necessário incisão
	Genitais		Visual
<b>Serosas</b>	Pleura e peritoneu	Visual	Visual
<b>Gl. mamária</b>	Parênquima e Ln. supramamários		Visual, palpação e se necessário incisão em cada metade até aos seios lactíferos (se para consumo humano)
<b>Carcaça</b>	Região umbilical	Visual e palpação	
	Articulações	Visual e palpação	
	Superfícies externas	Visual	Visual

Gl. = Glândula; Ln. = Linfonodo

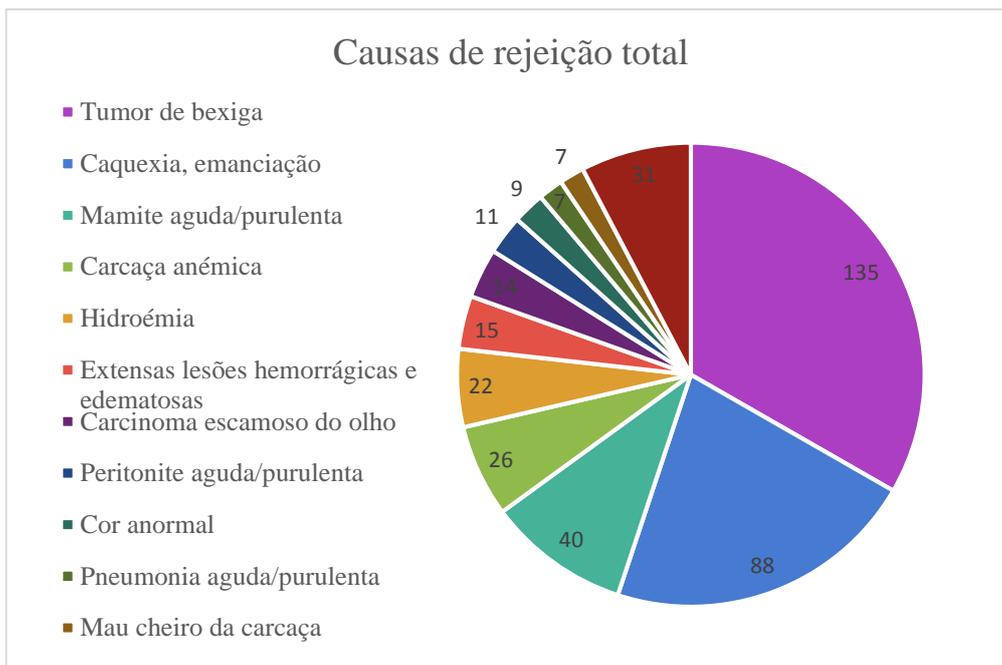
Após a execução destes procedimentos pelo inspetor, este toma a decisão final sobre a salubridade das carcaças e miudezas, fundamentada no exame *ante mortem* e completada, se necessário por exames laboratoriais. Assim, de acordo com a decisão sanitária, as carcaças poderão ser agrupadas nos seguintes casos: carcaças aprovadas, carcaças aprovadas com rejeições parciais, carcaças em observação e carcaças reprovadas (Pereira, *et al.*, 2012).

A decisão de aprovação das carcaças é tomada quando não existe qualquer estado anormal ou de doença e a operação de abate foi efetuada segundo normas de higiene adequadas. As carcaças aprovadas com rejeições parciais são aquelas que possuem alterações resultantes de uma doença ou estado que são localizadas, não afetando mais do que uma parte da carcaça. A decisão sanitária de colocar as carcaças em observação é

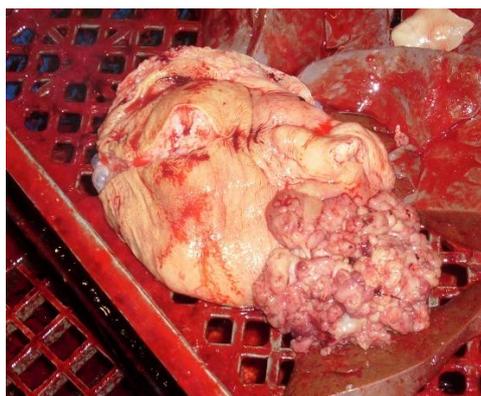
tomada quando é necessário realizar uma nova inspeção depois de decorrido um determinado período de tempo, após o qual é tomada a decisão final. Esta decisão aplica-se a carcaças que: aguardam resultados laboratoriais, possuem uma alteração pouco significativa de cor/cheiro, nas quais é necessário fazer algum tipo de limpeza, que apresentem problemas de identificação. Neste caso, procede-se ao registo fotográfico dos dentes, da cabeça e da pele do animal, colhe-se um fragmento da orelha para realização de eventual teste de ADN e solicita-se ao SDASM a confirmação da identificação do animal. Por fim, a reprovação de carcaças aplica-se a carcaças que representam perigo para os consumidores e/ou possuem desvios das características organoléticas. Nestas carcaças é colocada a marca “R” a tinta (Pereira, *et al.*, 2012).

No Gráfico 3 estão apresentadas as causas de rejeição total de carcaças e vísceras nos dias em que foram acompanhados os processos de abate do MSM. Como se pode observar, a principal causa de rejeição total de carcaças e vísceras é o tumor de bexiga. Os tumores de bexiga são causados pela toxina ptaquilósido, presente no feto comum, planta infestante frequente nas pastagens de São Miguel (Seawright, 1989). As neoplasias localizam-se essencialmente nos quadrantes inferiores da bexiga, principalmente no quadrante inferior direito (Pinto, 2010). Alguns tumores apresentam hemorragia para o interior da bexiga, provocando a excreção de urina corada de sangue (hematúria) e frequentemente de coágulos de sanguíneos (Seawright, 1989).

No MSM é norma a abertura das bexigas de todos os animais adultos para a deteção dos tumores. As carcaças que apresentem tumores de bexiga são rejeitadas (Figura 5), uma vez que a toxina que provocou os tumores se pode encontrar ainda nos tecidos do bovino abatido. O consumo direto ou indireto dos carcinogéneos do feto comum poderá ter implicações para a saúde pública como o desenvolvimento de carcinomas esofágicos e gástricos (Pinto, 2010).



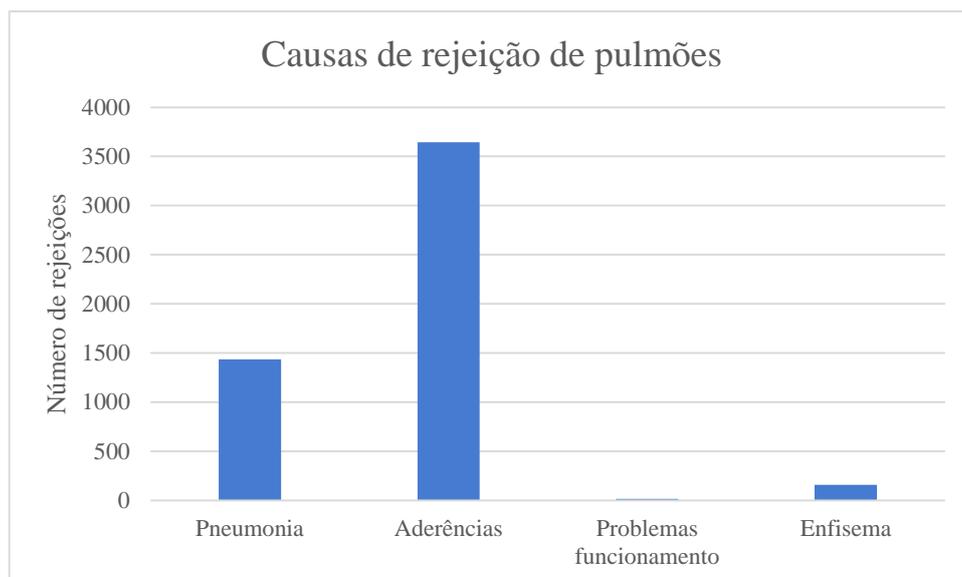
**Gráfico 3: Causas de rejeição total de carcaças e vísceras**



**Figura 5: Tumor de bexiga detetado em bovino no MSM**

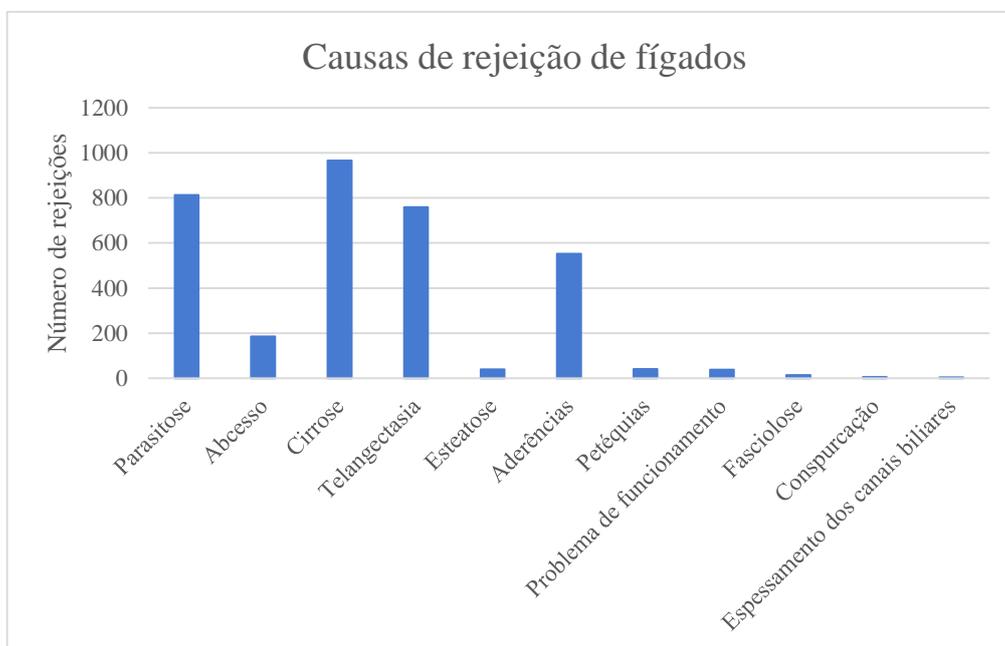
Os critérios tidos em conta nas decisões sanitárias relativas às miudezas são semelhantes àqueles utilizados nas decisões relativas às carcaças. Assim as miudezas poderão ser agrupadas nas seguintes situações: miudezas aprovadas, miudezas aprovadas com rejeições parciais, miudezas em observação e miudezas reprovadas (Pereira, *et al.*, 2012).

No Gráfico 4 estão apresentadas as principais causas de rejeição total de pulmões de bovinos. Como se pode concluir, as aderências são a principal causa de rejeição dos pulmões. As aderências observadas localizavam-se essencialmente nos bordos dos lobos caudais dos pulmões e são resultado de processos inflamatórios.



**Gráfico 4: Causas de rejeição total de pulmões**

As principais causas de rejeição total de fígados foram a cirrose e as parasitoses (Gráfico 5). A cirrose caracteriza-se pelo aumento de volume do fígado, bordos arredondados, coloração alterada e à palpação o fígado encontra-se com consistência aumentada. As parasitoses são identificadas pela presença de pontos amarelados irregulares na superfície hepática e ao corte continuam-se pelo parênquima.



**Gráfico 5: Causas de rejeição total de fígados**

No Gráfico 6 são apresentadas as causas de rejeição dos rins e verifica-se que a causa mais comum de rejeição é a presença de quistos. Estes quistos consistem de cavidades no parênquima renal preenchidas com urina. Os quistos podem ser formados numa

fase de desenvolvimento devida à fusão inadequada entre a porção secretora do metanefrónio e a porção excretora dos derivados do canal de Wolff (Peleteiro, Pinho, & Orvalho, 2001).

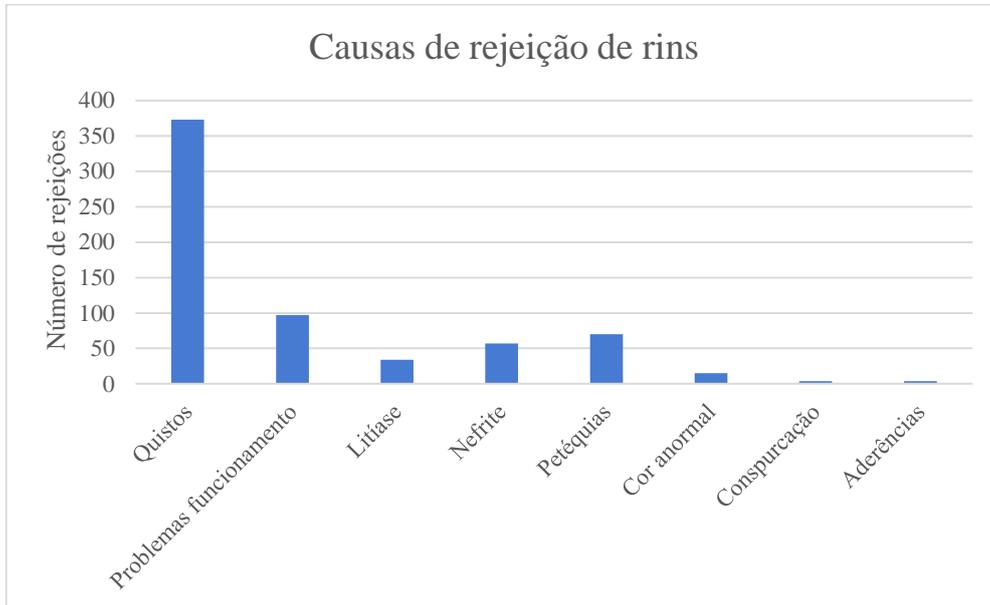


Gráfico 6: Causas de rejeição total de rins

A principal causa de rejeição do coração (Gráfico 7) no MSM no decorrer do estágio foi a pericardite. Esta alteração caracteriza-se pelo espessamento no pericárdio ao corte a presença de líquido com fibrina. Esta condição pode ter várias etiologias, entre elas: *Mannheimia hemolytica*, *Haemophilus* spp., encefalomielite esporádica bovina, *Pseudomonas aeruginosa*, tuberculose, *Mycoplasma* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Actinobacillus suis*, idiopática não séptica (Radostits, *et al.*, 2006).

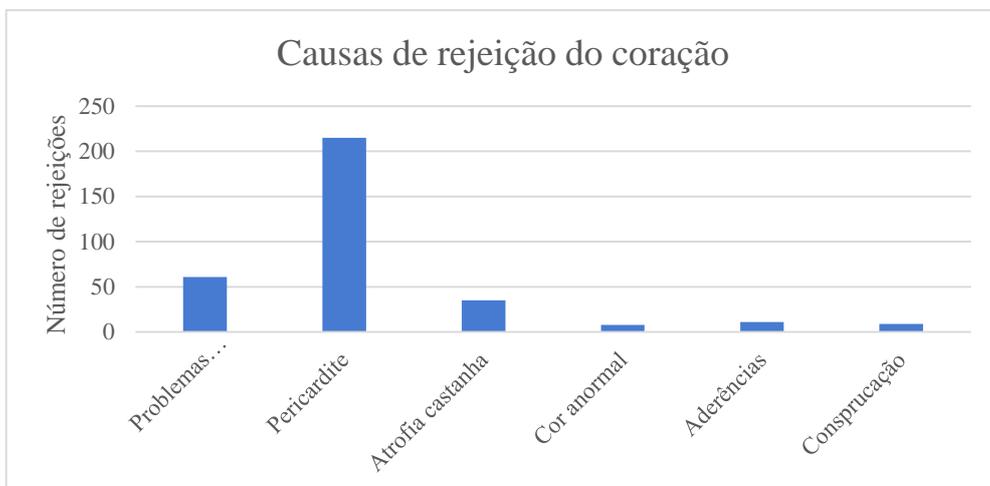


Gráfico 7: Causas de rejeição total de coração

As principais causas de rejeição do rúmen (Gráfico 8) são aderências e problemas de funcionamento. As aderências são formações de fibrina decorrentes de algum processo inflamatório que se desenvolveu no reticulo-rúmen. Quando, por alguma razão, o funcionamento da linha de abate compromete a qualidade das vísceras a serem inspecionadas, estas são rejeitadas tendo como causa problemas de funcionamento.

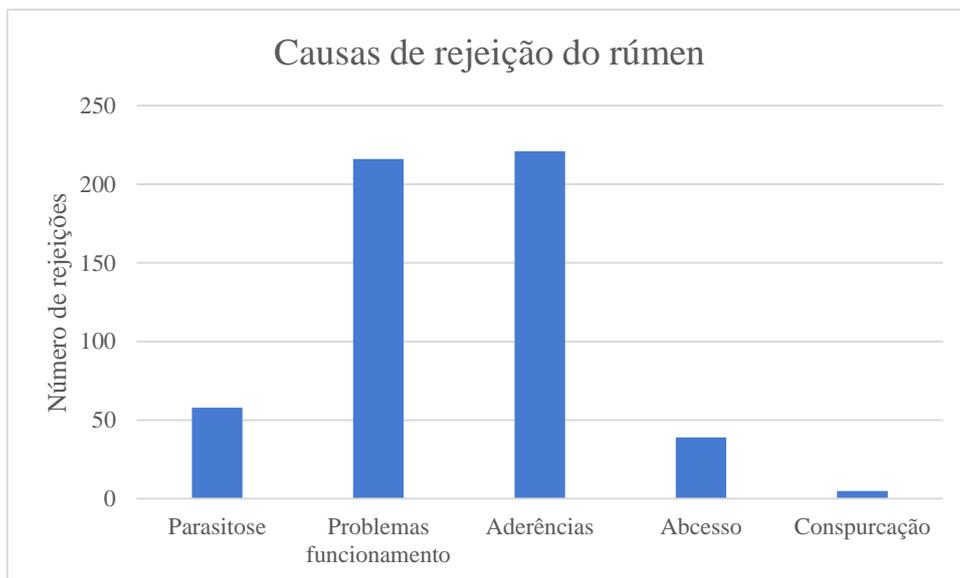


Gráfico 8: Causas de rejeição total do rúmen

No Gráfico 9 pode-se observar que a causa mais frequente de rejeição da língua é a fibrose.

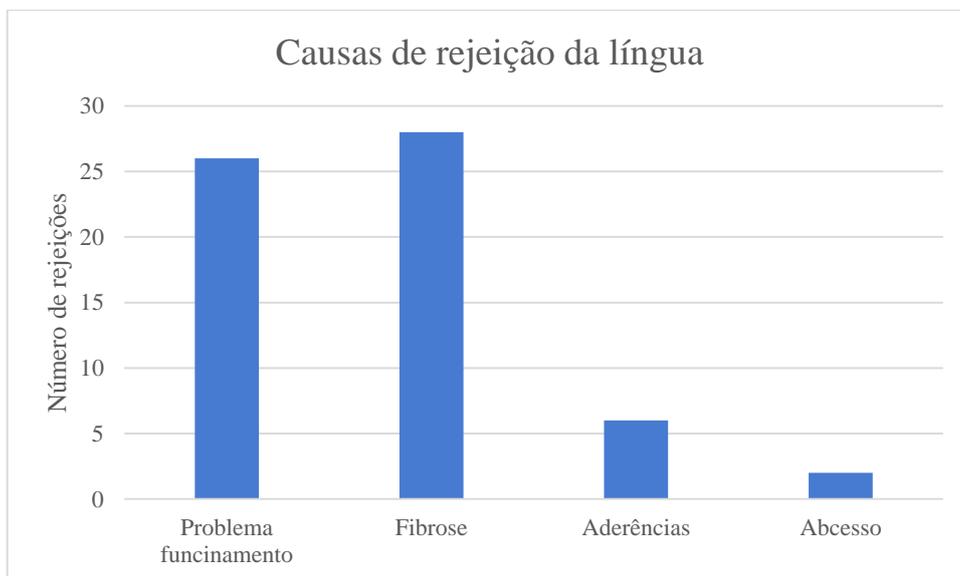


Gráfico 9: Causas de rejeição total da língua

Todas as miudezas de uma carcaça reprovada são reprovadas, mas podem existir carcaças aprovadas cujas miudezas foram todas reprovadas. Aquando da expedição das

carcaças e miudezas aprovadas para consumo humano é aposta a marca de salubridade de acordo com as disposições do Regulamento (CE) N.º 854/2004.

Todas as decisões tomadas pela equipa de inspeção sanitária do MSM relativas a cada animal e as suas miudezas são registadas em papel e posteriormente em formato informático. Seguidamente são afixadas em local apropriado junto à secretaria do matadouro para conhecimento dos proprietários (Pereira, *et al.*, 2012).

### **5.3. Bem-estar animal**

O modo como os animais são tratados antes do abate tem influência, tanto na qualidade higiénica das carnes, como na sua capacidade de conservação. Para além disso, os animais devem ter um tratamento humanitário que evite o sofrimento desnecessário (Pereira, *et al.*, 2012).

Relativamente ao transporte de animais vivos, este só poderá ser efetuado por transportadores e meios de transporte que se encontrem autorizados pelo Diretor Geral de Veterinária (Decreto-Lei N.º 265/2007). Adicionalmente e de um modo geral, os animais não devem ser transportados em condições suscetíveis de lhes causar lesões ou sofrimentos desnecessários. Como tal, qualquer pessoa que manuseie os animais durante o transporte deverá ter seguido uma formação ministrada apenas por organismos acreditados pelas autoridades competentes (Regulamento (CE) N.º 1/2005).

Segundo o Regulamento (CE) N.º 1/2005, ninguém pode proceder ao transporte de animais em condições suscetíveis de lhes causar lesões ou sofrimentos desnecessários. Para além disso, o mesmo regulamento também prevê condições sem as quais não se deve proceder ao transporte de animais. São elas:

1. sem terem sido tomadas todas as disposições necessárias para minimizar a duração da viagem e satisfazer as necessidades dos animais durante a mesma;
2. os animais estarem aptos a efetuar a viagem prevista;
3. os meios de transporte serem concebidos, construídos, mantidos e utilizados por forma a evitar lesões e sofrimento e a garantir a segurança dos animais;
4. os equipamentos de carregamento e descarregamento serem concebidos, mantidos e utilizados adequadamente por forma a evitar lesões e a garantir a segurança dos animais;

5. o pessoal que manuseia os animais possuir a formação e desempenhar as suas tarefas sem recurso à violência ou a qualquer método suscetível de provocar medo, lesões ou sofrimento desnecessários;
6. o transporte ser efetuado sem demora para o local de destino e as condições de bem-estar dos animais serem verificadas regularmente e mantidas de forma adequada;
7. serem proporcionadas aos animais uma área da chão e uma altura suficientes tendo em conta o seu tamanho e a viagem prevista;
8. serem proporcionadas aos animais, água e alimentos em qualidade e quantidade indicadas para a sua espécie e o seu tamanho e repouso a intervalos adequados (Regulamento (CE) N.º 1/2005).

Os equipamentos de carregamento e descarregamento dos animais devem ser concebidos, construídos, mantidos e utilizados de forma a evitar ferimentos e sofrimento, minimizar a excitação e agitação durante as deslocações e garantir a segurança dos animais (superfícies não escorregadias, proteções laterais) serem limpos e desinfetados. A inclinação das rampas não deve ser superior a 20° para suínos, vitelos e equídeos, 26° 34' para os ovinos e bovinos que não sejam vitelos. As plataformas de elevação e os andares superiores devem ter barreiras de segurança que impeçam a queda ou a fuga dos animais durante as operações de carregamento e descarregamento (Regulamento (CE) N.º 1/2005).

No manuseamento dos animais é proibido: bater ou pontapear os animais; aplicar pressões em partes especialmente sensíveis do corpo dos animais; suspender animais por meios mecânicos; levantar ou arrastar os animais pela cabeça, orelhas, cornos, patas, cauda ou pelo pelo ou manuseá-los de forma a provocar-lhes dor ou sofrimentos desnecessários; utilizar agulhões ou outros instrumentos pontiagudos; obstruir voluntariamente um animal que esteja a ser conduzido ou levado em qualquer sítio onde os animais sejam manuseados. O uso de instrumentos destinados a descargas elétricas deve ser evitado na medida do possível. Os animais não devem ser presos pelos cornos, pelas armações, pelas argolas nasais nem pelas patas amarradas juntas e os vitelos não devem ser amordaçados (Regulamento (CE) N.º 1/2005).

O inspetor sanitário é responsável pelo cumprimento destas normas legislativas relativas à proteção dos animais em transporte e operações afins. Como tal executa, ao

longo do ano, vários controlos de bem-estar aos animais em transporte rodoviário, visando avaliar os seguintes aspetos gerais:

- a. os transportadores estão habilitados para o transporte de animais;
- b. os transportadores possuem condições para o transporte de animais;
- c. os animais são transportados em condições adequadas de bem-estar (Pereira, *et al.*, 2012).

De igual modo, existe também legislação comunitária e nacional que estabelece as regras relativas à proteção dos animais durante o abate. O Regulamento (CE) N.º 1099/2009 aplica-se à occisão dos animais criados e mantidos para a produção de alimentos, lã, peles, peles com pêlo ou outros produtos, bem como à occisão de animais para efeitos de despovoamento e operações complementares (Regulamento (CE) N.º 1099/2009). O Decreto-Lei n.º 28/96 é aplicável ao encaminhamento, estabulação, imobilização, atordoamento, abate e occisão de animais criados e mantidos para a produção da carne ou para o aproveitamento da pele ou de outros produtos, bem como às occisões para efeitos de luta contra as epizootias (Decreto-Lei N.º 28/96).

Aquando da occisão e operações complementares deve poupar-se aos animais qualquer dor, aflição ou sofrimento evitáveis. Devem ainda ser tomadas medidas a fim de garantir que os animais:

- a. beneficiem de proteção e conforto físico, designadamente ao serem mantidos limpos e em condições térmicas adequadas e ao impedir que caiam ou escorreguem;
- b. sejam protegidos de lesões
- c. sejam manipulados e alojados tendo em conta o seu comportamento normal;
- d. não mostrem sinais evitáveis de dor ou de medo ou manifestem um comportamento anormal;
- e. não sofram devido à privação prolongada de alimentos ou água;
- f. não sejam expostos a uma interação evitável com outros animais que possa prejudicar o seu bem-estar (Regulamento (CE) N.º 1099/2009).

Apenas podem proceder ao encaminhamento, à estabulação, à imobilização, ao atordoamento, ao abate ou à occisão de animais pessoas que possuam os conhecimentos e capacidade necessários para efetuar essas operações de modo humanitário e eficaz. O

médico veterinário oficial certifica-se da aptidão, capacidade e conhecimentos profissionais das pessoas encarregadas do abate (Decreto-Lei N.º 28/96).

No MSM o método de atordoamento utilizado nos bovinos é a pistola de êmbolo retrátil, posicionada de acordo com os diagramas apresentados no Decreto-Lei 28/96. De seguida os animais são suspensos e efetuadas as incisões de sangria. Estas incisões são feitas numa das artérias carótidas e nos vasos de onde estas derivam. A sangria deve ser iniciada dentro de 60 segundos após o atordoamento (Decreto-Lei N.º 28/96).

## **6. PARATUBERCULOSE BOVINA: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

A paratuberculose (PT) dos ruminantes, ou doença de Johne, é uma doença infecciosa causada por uma micobactéria específica: *Mycobacterium avium* subs. *paratuberculosis* (MAP). Causa doença nas três espécies de ruminantes domésticos (bovinos, ovinos e caprinos) (Savey, *et al.*, 2009).

A doença caracteriza-se pelo longo período de incubação (de meses a anos) durante o qual a infecção é inaparente e que depende de vários fatores intrínsecos e extrínsecos para se manifestar. Os sinais clínicos manifestam-se na maioria dos bovinos entre os dois e os sete anos. No entanto, podem observar-se casos precoces, em condições naturais, em animais mais jovens quando estes se encontram num ambiente de forte pressão de infecção. Nos pequenos ruminantes, a duração de incubação é de seis meses no mínimo e os sinais clínicos podem manifestar-se no primeiro ano de idade (Savey, *et al.*, 2009).

As primeiras descrições de uma doença debilitante no gado bovino são de 1807 por Edward Skettet e Cartwright duas décadas mais tarde em 1829. Em 1826 são descritas as alterações ao nível do intestino como “um espessamento da mucosa do intestino delgado e do intestino grosso, associada a diarreia crónica” (Manning & Collins, 2010a)

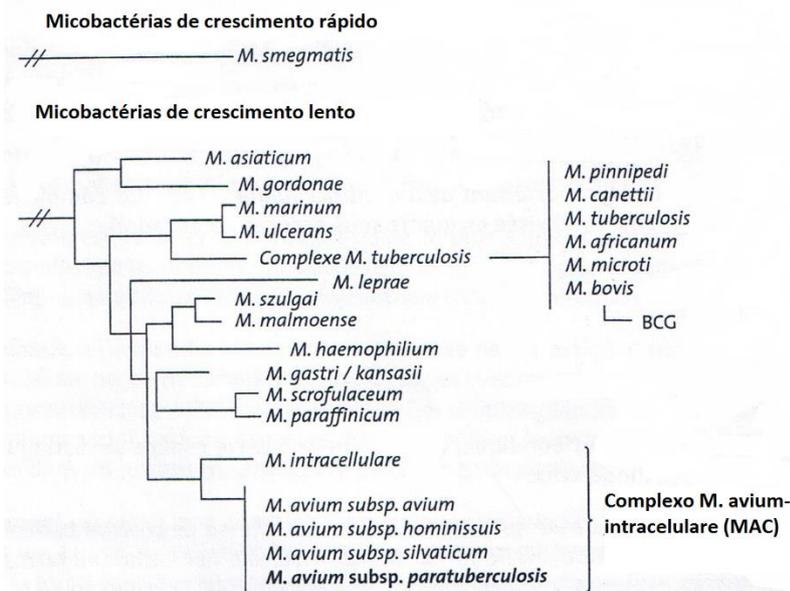
Em 1894 os veterinários Heinrich Albert Johne (daí o nome de doença de Johne) e Langdon Frothingham receberam, na Unidade de Patologia Veterinária em Dresden, os intestinos, estômago e omento de uma vaca que não produzia leite, não ganhava peso e tinha sido negativa ao teste da intradermotuberculinização. Estes dois cientistas notaram o espessamento da mucosa e a infiltração da parede intestinal por leucócitos e células epitelioides. Através de uma coloração ácido-álcool resistente observaram bactérias coradas de vermelho, que eram similares às que causavam tuberculose. Após inocularem os tecidos infetados em ratos sem que fosse causada a doença, concluíram que o agente etiológico era o mesmo que causava tuberculose nas aves (Manning & Collins, 2010a).

O nome PT vem da descrição inicial da bactéria que parecia muito similar à bactéria que causa a tuberculose bovina (OIE, 2014)

### **6.1. Caracterização do agente etiológico**

As bactérias do género *Mycobacterium* pertencem ao filo Actinobacteria e à família Mycobacteriaceae. O género *Mycobacterium* contém cerca de oitenta espécies (Savey, *et al.*, 2009).

O MAP pertence ao complexo *M. avium-intracellulare* (Figura 6). A este complexo também pertencem as espécies *M. intracellulare*, *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *hominissuis* e *M. avium* subsp. *silvaticum*. O *M. avium* subsp. *avium* é o responsável pela tuberculose nas aves por infecções oportunistas nos humanos imunodeprimidos. O *M. avium* subsp. *hominissuis* causa infecções nos porcos e é agente oportunista em pessoas imunodeprimidas. O *M. avium* subsp. *silvaticum* está reportado como sendo responsável por uma doença semelhante à PT em veados e cervídeos (Savey, *et al.*, 2009).



**Figura 6: Relações filogenéticas entre as diferentes micobactérias com base nas sequências do gene ribossomal 16S, adaptado de Savey *et al.*, 2009**

As micobactérias apresentam-se sob a forma de bacilos finos que não descoram sob a ação de ácidos fortes nem de álcool e por isso são designados de “bacilos ácido-álcool resistentes” (BAAR). São bacilos Gram-positivos que possuem uma parede celular espessa e rica em lípidos que é responsável pela resistência a inúmeros fatores e tratamentos físicos e químicos, assim como sua capacidade de formar grandes aglomerados de células. Estas particularidades permitem que possa sobreviver por mais de um ano no ambiente. É ainda resistente ao calor e aos antibióticos eficazes contra *M. tuberculosis*, o agente da tuberculose e por isso a antibioterapia para a PT não é praticada (Savey, *et al.*, 2009; Lombard, 2011).

Ao contrário de todas as outras espécies do género *Mycobacterium*, o MAP não produz a micobactina quelante de ferro essencial à sua replicação sendo considerado um

parasita obrigatório das células de mamíferos, onde o ferro se encontra disponível. O microrganismo infeta preferencialmente os macrófagos (Lombard, 2011).

Existem dois principais grupos de estirpes de *MAP* que são definidos pelas características de crescimento, preferências de hospedeiro ou espectro de hospedeiros e patogenicidade. Estas estirpes foram designadas de acordo com a espécie da qual foram primeiramente isoladas, “S” de *sheep* e “C” de *cattle*. Contudo o *MAP* pode ser isolado de uma grande variedade de hospedeiros, não estando a estirpe diretamente relacionada com o tipo de hospedeiros. Por isso, mais tarde foram designadas de estirpe tipo I (tipo S) e tipo II (tipo C) (Stevenson, 2010).

As estirpes de *MAP* diferenciam-se na facilidade com que são isoladas em meios de cultura artificiais e nas suas respetivas velocidades de crescimento (Tabela 9). Estirpes do tipo II são, comparativamente, mais fáceis de isolar de amostras clínicas e crescem razoavelmente bem em meios sólidos ou líquidos suplementados com micobactina. Ao fim de quatro a 16 semanas já é possível observar crescimento a partir do inóculo original. As estirpes do tipo I apresentam tipicamente um crescimento mais lento e são mais fastidiosas em cultura em meio artificial (Stevenson, 2010).

**Tabela 9: Características fenotípicas e epidemiológicas das estirpes de *MAP*, adaptada de Stevenson, 2010**

<b>Característica</b>	<b>Estirpe tipo S (ou tipo I)</b>	<b>Estirpe tipo C (ou tipo II)</b>
<b>Primeiro isolamento</b>	Difícil	Fácil
<b>Tempo de incubação típico para isolamento em meio sólido</b>	Quatro a 12 meses	Cinco a 16 semanas
<b>Tempo de incubação típico para isolamento em meio líquido</b>	Sete a 12 semanas	Quatro a 10 semanas
<b>Adição de gema de ovo no meio líquido</b>	Benéfico no primeiro isolamento	Não é necessário
<b>Hospedeiros</b>	Predominantemente ovinos e caprinos	Comum em bovinos; largo espectro de hospedeiros (ruminantes, não ruminantes)

Geralmente, as estirpes não podem ser diferenciadas pela morfologia das colónias, com exceção para as estirpes pigmentadas. Estas têm sido isoladas de ovelhas e todas as estirpes pigmentadas foram classificadas como sendo do tipo I (Stevenson, 2010).

## 6.2. Epidemiologia

A PT afeta sobretudo os ruminantes domésticos e selvagens e está presente em todos os continentes, sendo a sua distribuição mundial. Na maioria dos países, o verdadeiro panorama da doença é subestimado, devido ao facto de não ser uma doença de declaração obrigatória. Globalmente encontra-se concentrada na América do Norte e na Europa, assim como na Austrália, tanto em bovinos como em pequenos ruminantes (Savey, *et al.*, 2009). Estima-se que 50% das explorações leiteiras na Europa e América do Norte estão infetadas, pelo que a PT é considerada uma doença endémica nessas regiões (Manning & Collins, 2010b).

O *MAP* possui um largo espetro de hospedeiros, mas a infeção é mais comum em ruminantes, particularmente em bovinos leiteiros. Contudo, apesar dos ruminantes serem os hospedeiros preferenciais de *MAP*, estão reportadas infeções em não-ruminantes como equinos, suínos, camélídeos, canídeos, primatas e humanos (Manning e Collins 2010b).

Existem três vias de infeção: fecal-oral (quer diretamente através das fezes contaminadas, que através de colostro, água ou alimento contaminados) (Manning e Collins 2010b), congénita e através das secreções mamárias. Os vitelos com menos de seis meses de idade são considerados em alto risco de se tornarem infetados com *MAP* e os neonatos são os mais suscetíveis devido à permeabilidade do intestino nas primeiras 24 horas de vida (Lombard, 2011).

A principal via de infeção do *MAP* para todas as espécies é a fecal-oral, estando as bactérias presentes no estrume. A excreção de enormes quantidades do microrganismo nas fezes é a principal fonte de novas infeções numa manada, enquanto a contaminação fecal dos tetos e maternidade é o principal fator de risco para o neonato (Lombard, 2011).

O *MAP* tem sido isolado a partir de leite e colostro de vacas durante os períodos subclínico e clínico da doença. Um estudo revelou que os animais infetados subclínicos libertam três vezes mais organismos no colostro do que no leite, evidenciando a importância do colostro como um modo de transmissão. Adicionalmente, o colostro e leite podem ser contaminados se as tetinas não forem limpas e desinfetadas antes da colheita. A alimentação dos vitelos com colostro e leite oriundos de um banco de leite aumenta o

risco de infecção, uma vez que basta uma vaca estar a excretar o MAP no leite para que uma grande quantidade de animais esteja exposta à infecção (Lombard, 2011).

A via transplacentária também tem sido documentada em vacas infetadas quer com sinais clínicos, quer na fase subclínica. No entanto, ainda não foi apurado ao certo o mecanismo pelo qual a infecção se desenvolve. Algumas teorias incluem a infecção intrauterinas do embrião e a disseminação via hematogena ou linfática pelo feto. Outras vias potenciais incluem a venérea, via palpação transretal e via transferência de embriões (Lombard, 2011).

A introdução da infecção num rebanho dá-se essencialmente pela introdução de novos animais. Outras vias podem ser o movimento de estrume entre explorações, a compra de colostro ou leite e a partilha de pastagens ou fontes de água. O risco de um rebanho ser infetado tendo como origem os animais silvestres é muito reduzido. A recria de novilhas fora da exploração pode também ser uma outra fonte de transmissão para o rebanho anteriormente não infetado (Lombard, 2011).

Em explorações de carne, a principal fonte de transmissão é a introdução de touros infetados na fase subclínica da doença, uma vez que, por norma, a recria das novilhas de reposição é feita na própria exploração e a genética é adicionada através da compra de touros (Lombard, 2011).

Na Europa, a prevalência da doença em bovinos é de aproximadamente 20%, embora alguns países possam ter prevalências menores. Em termos globais cerca de 50% das explorações na europa estão infetadas (Nielsen & Toft, 2009).

Em Portugal têm sido feitos alguns estudos epidemiológicos em PT em pequenos ruminantes. Em 2004, Mendes *et al.* avaliaram a seropositividade em 66 rebanhos de cabras e ovelhas nos concelhos de Sintra, Cascais, Oeiras, Amadora e Lisboa (Mendes, *et al.*, 2004). Detetaram que em 27% dos rebanhos existiam animais seropositivos. Na região de Trás-os-Montes e Alto Douro a seroprevalência foi calculada em 6,4%, sendo que 93% dos rebanhos ovinos estão infetados. Em Vouzela foi reportada a prevalência de 10,2% e no Alentejo foi determinada um seroprevalência de 7,8 a 10,2 % e 6 a 18% dos rebanhos ovinos encontram-se infetados (Coelho, *et al.*, 2007).

### 6.3. Patogenia

A complexidade da resposta imune à infecção pelo *MAP* está relacionada tanto com os mecanismos de invasão desenvolvidos pela bactéria e sua interação com a resposta imune inata como com a evolução da resposta imune adaptativa no decorrer da infecção (Savey, *et al.*, 2009).

Uma vez que o animal foi exposto oralmente ao microrganismo, este pode invadir o organismo através de duas principais vias:

- Amígdalas e daí segue por via hematogena ou linfática para os linfonodos mesentéricos e íleo;
- Íleo (principal via de infecção) (Sweeney, 2011).

O primeiro local de multiplicação é a parte terminal do intestino delgado e o intestino grosso. Existem pelo menos três grupos de animais dependendo da relação *MAP* hospedeiro que se podem estabelecer. No primeiro grupo, encontram-se os animais que desenvolvem rápida resistência, controlam a infecção e não serão futuros excretores (resistentes à infecção). O segundo grupo compreende os animais que apenas controlam a infecção parcialmente e tornam-se excretores intermitentes. Finalmente, o terceiro grupo são os animais nos quais o *MAP* persiste no organismo e é deste grupo que se irão desenvolver os casos clínicos (Radostits, *et al.*, 2006).

Em explorações infetadas é provável que os neonatos não sejam sujeitos a uma única dose de infecção, uma vez que estão expostos a uma grande quantidade de fezes oriundas de animais excretores. As lesões iniciais de PT são multifocais, sugerindo que existam várias infecções em vez de uma única exposição (Chiodini, 1996).

Os bovinos com mais de 10 meses parecem ser resistentes à doença, embora a suscetibilidade à infecção pode não diminuir. Esta resistência adquirida pode estar relacionada com a maturação do sistema imunitário que inclui o equilíbrio entre as populações de linfócitos T e a sua distribuição nos tecidos (Radostits, *et al.*, 2006).

As células M (células epiteliais especializadas localizadas nas placas de Peyer) facilitam a translocação da bactéria através do epitélio intestinal. Os microrganismos são posteriormente libertados na submucosa pela ação das células M sem sofrerem qualquer alteração (Sweeney, 2011). Uma outra forma de invasão é diretamente através da passagem do *MAP* através das junções celulares intestinais (Coussens, *et al.*, 2010). Já na sub-

mucosa o *MAP* é fagocitado pelos macrófagos que podem ou não inativar o microrganismo, sendo que se forem bem-sucedidos a infecção pode ser travada. Contudo, o *MAP* possui a capacidade única de sobreviver nos macrófagos, característica que confere à PT a sua natureza crónica progressiva (Sweeney, 2011). Esta resistência deve-se aos mecanismos de evasão desenvolvidos pelo *MAP* que são a inibição da fusão entre o fagossoma e o lisossoma e a acidificação do fagossoma (Savey, *et al.*, 2009).

As células M migram com os macrófagos das placas de Peyer até aos linfonodos mesentéricos, de seguida para o ducto torácico, circulação sanguínea e para a lâmina própria. Esta disseminação linfática e posterior bacteriemia explica a contaminação de outros órgãos que não os digestivos, como sejam a glândula mamária, o útero, os órgãos genitais masculinos e femininos e o feto. Pode-se dizer então que existem duas formas de reinfeção dos animais: a exógena (em ambientes muito contaminados) e endógena (pela ocorrência da bacteriemia) (Chiodini, 1996; Savey, *et al.*, 2009).

Os fagócitos mononucleados (monócitos, macrófagos e células dendríticas) são considerados como principal alvo da infecção por *MAP*. De facto, num animal infetado estas células são infetadas cronicamente; são apresentadores de antígenos aos linfócitos e, conseqüentemente, estimuladoras da resposta imunológica adaptativa e servem de vetores para a disseminação sanguínea do microrganismo (Savey, *et al.*, 2009).

Como para a maioria dos agentes patogénicos intracelulares, a inativação dos hospedeiros contra a infecção. Ativação dos macrófagos por citocinas, como o interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) (produzido por células T *helper* do tipo 1 = Th1) amplifica a inativação dos *MAP* intracelulares. É provável que alguns dos animais expostos à doença sejam capazes de eliminar o microrganismo através deste mecanismo e, por isso, não desenvolvem a doença, porém existem muitos animais incapazes de eliminar a infecção e os *MAP* persistem nos macrófagos destes indivíduos (Sweeney, 2011).

Geralmente, no início da infecção as defesas do hospedeiro são eficazes em conter a progressão da doença permitindo apenas a proliferação lenta e disseminação do *MAP* pelo intestino e linfonodos associados, o que resulta na fase eclipse da doença e pode durar até dois ou mais anos. Durante esta fase, o animal não demonstra sinais clínicos, ou seja, não há um decréscimo observável da produção ou ganho de peso e não são detetados microrganismos nas fezes nem anticorpos no soro. A única forma de detetar os animais

neste estágio da doença é através de cultura ou PCR de amostras de íleo ou linfonodos mesentéricos (Sweeney, 2011).

A resposta inflamatória do tipo granulomatosa, que é responsável pela perda de estrutura e função da mucosa intestinal e linfonodos associados, tem como objetivo confinar os macrófagos infetados ao intestino e tecido linfóide associado. Assim, o *MAP* e o hospedeiro podem coexistir durante muitos anos sem que os sinais clínicos da doença se manifestem e sem que, no entanto, os microrganismos sejam inativados (Sweeney, 2011).

Com o passar do tempo, a infecção começa a expandir-se devido ao enfraquecimento da resposta imunitária mediada por células. Este acontecimento coincide com a transição da resposta mediada por células Th1 para uma resposta inume mediada por células Th2 que está associada a uma proliferação de linfócitos B e consequente produção de anticorpos. A causa para esta mudança na resposta inume é desconhecida, mas uma vez que isto acontece a doença progride mais rapidamente. A resposta imune do tipo Th1 é caracterizada pela produção de citocinas IFN- $\gamma$ , IL 2 (interleucina 2) e fator de necrose tumoral (TNF). Ao nível do plano lesional, é possível observar lesões intestinais com poucos bacilos e do tipo tuberculoides com a presença de numerosos linfócitos comparativamente com poucos macrófagos. A resposta imune do tipo Th2 é pobre em citocinas e com produção das interleucinas 4, 5 e 10 (IL 4, 5 e 10). É caracterizada por lesões multibacilares, classificadas de lepromatosas e com infiltração de numerosos macrófagos e menor quantidade de linfócitos (Sweeney, 2011; Savey, *et al.*, 2009).

Com este enfraquecimento da resposta imunitária o animal infetado começa a excretar o *MAP* em quantidades cada vez maiores nas fezes e os microrganismos expandem-se para outros tecidos como o útero (causando a transmissão ao feto), glândula mamária e outros órgãos internos e tecido muscular. Contudo, o animal pode ainda não demonstrar sinais clínicos da doença e, na maioria dos casos, não é possível detetar os anticorpos através de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) sem que a excreção das bactérias se tenha iniciado (Sweeney, 2011).

Existe uma subpopulação de linfócitos T, os T reguladores ou Th3 que parecem estar implicados na resposta imune da PT. Estes afetam negativamente a resposta imune ou, por outro lado, têm um efeito supressivo na mesma nomeadamente na produção de citocinas como IL-10 e TGF- $\beta$  (fator beta de crescimento transformador). Em bovinos, na fase imediatamente pré-clínica da doença, a expressão de IL-10 e TGF- $\beta$  no íleo e nos

linfonodos mesentéricos é significativamente mais elevado que em bovinos em fase clínica. A IL-10 e TGF- $\beta$  induzem a produção de IFN- $\gamma$  (Savey, *et al.*, 2009).

Adicionalmente, as interleucinas características de um determinado tipo de resposta, Th1 (IFN- $\gamma$ ) ou Th2 (IL-4 e IL-10), têm um efeito depressor respetivamente na resposta de tipo Th2 e Th1 (Savey, *et al.*, 2009).

As diferentes interleucinas têm efeito sobre as propriedades bactericidas dos fagócitos mononucleados. O IFN- $\gamma$  reduz a sobrevivência do *MAP* nos macrófagos pelo aumento da acidificação e da maturação dos fagossomas e pela produção de óxido nítrico. O TNF- $\alpha$  em concentrações elevadas aumenta as propriedades micobactericidas dos macrófagos. Por fim, a IL-10 (citoquina produzida em fase clínica) tem pouco efeito na redução da produção de moléculas estimulantes da superfície das células apresentadoras de antígeno (Savey, *et al.*, 2009).

A duração da fase assintomática com libertação para o exterior de bactérias através das fezes é muito variável. Nalguns animais a progressão para a doença clínica é muito rápida, cerca de seis meses após o início da excreção fecal, porém noutros prolonga-se por vários anos até que os primeiros sinais clínicos se manifestem (Sweeney, 2011).

Ao longo da progressão da doença, as lesões nos intestinos e nos linfonodos mesentéricos tornam-se mais severas. A infiltração granulomatosa torna-se difusa, afetando o jejuno, Íleo, ceco e cólon (em menor extensão). O intestino delgado, particularmente do Íleo apresenta-se espessado devido à infiltração celular massiva e as vilosidades intestinais encurtam e tornam-se espessadas, reduzindo a absorção de nutrientes. A linfadenite granulomatosa leva a linfangiectasia e rutura dos vasos linfáticos com fistulação para o lúmen do intestino. É frequente encontrar macrófagos com os *MAP* nas lesões. Estas lesões causam mal absorção, diarreia e enteropatia com perda de proteína e hipoproteinemia (Sweeney, 2011).

#### **6.4. Sinais clínicos**

São descritos quatro estágios da PT. Estes diferem de acordo com a severidade dos sinais clínicos, o potencial de excreção de microrganismos para o ambiente e facilidade com que os testes laboratoriais detetam da doença (Whitlock & Buergelt, 1996; Radostits, *et al.*, 2006).

Por cada animal com doença clínica numa exploração, existem 25 outros que se encontram infetados. Com efeito, apenas de 15% a 25% serão detetados como estando

infetados mesmo com as técnicas mais sensíveis, sendo os animais que demonstram a doença clínica a “ponta do *iceberg*” (Figura 7) (Whitlock & Buergelt, 1996).

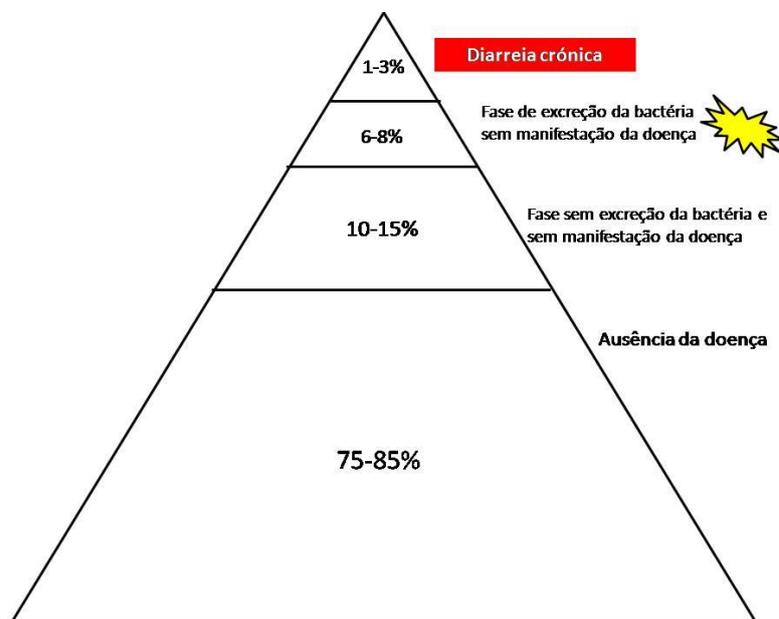


Figura 7: Distribuição média dos animais em termos de manifestação clínica e excreção em rebanhos infetados, adaptado de Savey *et al.*, 2009

No primeiro estágio da doença, em que a infecção não se manifesta, incluem-se todos os animais que não tenham atingido os dois anos de idade (vitelas e novilhas). Não são observáveis sinais clínicos e efeitos ao nível do ganho de peso ou condição corporal. Porém, estes animais podem excretar o microrganismo nas fezes, embora possa não ser detetado pelos testes utilizados frequentemente. A forma mais fiável de detetar os animais infecciosos é demonstrar a presença do *MAP* nos tecidos ou fezes por cultura (Whitlock & Buergelt, 1996; Radostits, *et al.*, 2006).

A segunda fase é a doença subclínica em que os animais adultos são portadores. Estes podem não demonstrar quaisquer sinais clínicos típicos da PT, mas podem vir a desenvolver mastites e ser animais inférteis. Nesta fase, a doença não é detetada na maioria dos animais, excetuando 15 a 20% que podem ser positivos com aquela técnica. Os testes sorológicos também não são eficazes para identificar estes animais (Whitlock & Buergelt, 1996; Radostits, *et al.*, 2006).

É sugerido que os animais que se encontrem no segundo estágio da doença progridem lentamente para o terceiro estágio, mas o mais provável é que sejam retirados da manada por outras razões. Por isso, o proprietário pode não reconhecer a verdadeira extensão da infecção na sua exploração (Whitlock & Buergelt, 1996).

No terceiro estágio da doença já é possível observar os sinais clínicos típicos que não aparecem antes dos dois anos de idade e são mais comuns entre os dois e os seis anos. Devido à progressão lenta da doença, estes casos são observados esporadicamente (Radostits, *et al.*, 2006). Os primeiros sinais clínicos observados estão relacionados com a alteração do estado geral como o mau estado do pelo e atrofia muscular particularmente notória nas massas lombares e membros posteriores. A evolução é apirética com um emagrecimento acompanhado de uma diminuição da produção de leite e com conservação do apetite ou mesmo, ocasionalmente, um aumento do mesmo (Savey, *et al.*, 2009). A sede está normalmente aumentada (Whitlock & Buergelt, 1996; Radostits, *et al.*, 2006). Num período de várias semanas, a diarreia desenvolve-se em conjunto com a perda de condição corporal. Todas as constantes vitais encontram-se dentro dos limites fisiológicos. As fezes são moles e homogêneas sem sangue, descamações epiteliais ou muco e sem presença de tenesmo. A diarreia pode ser contínua ou intermitente, com tendência a melhorar na gestação avançada e reaparecer numa forma mais severa após o parto. Uma melhora temporária pode acontecer quando os animais são levados para a pastagem ou alimentados com alimentos mais secos (Radostits, *et al.*, 2006). As alterações do soro e plasma sanguíneo são previsíveis, mas não são específicas o suficiente para auxiliar no diagnóstico. A maioria dos animais é positiva quando testada em cultura fecal e apresenta anticorpos detectados por ELISA e por AGID (Agar Gel Imunodifusão) (Whitlock & Buergelt, 1996).

O quarto estágio da PT é a doença clínica avançada. Conforme a doença progride, o estado de emaciação vai-se agravando e é acompanhado de edema submandibular, devido à hipoproteinemia (Radostits, *et al.*, 2006; Savey, *et al.*, 2009). A diarreia agrava-se tornando-se aquosa e é expelida em jatos. O curso da doença varia entre meses a anos e termina em desidratação severa, emaciação e fraqueza (Radostits, *et al.*, 2006). Os sinais clínicos podem ser exacerbados por fatores de *stress*, tais como o parto e a primeira fase da lactação. A redução na produção leiteira pode chegar a 20% ou mais, sendo que em estados terminais da doença esta chega a cessar. Neste estado avançado da doença, a libertação massiva de organismos através das fezes provoca uma contaminação do ambiente considerável. A maioria dos animais são refugados quando os sinais típicos são reconhecidos, mas se continuarem no rebanho a evoluem para um estado moribundo e morte por caquexia e desidratação (Sweeney, 2011).

## 6.5. Diagnósticos diferenciais

O diagnóstico diferencial de PT deve ser feito incluindo todas as doenças que causem caquexia acompanhada ou não de diarreia (Savey, *et al.*, 2009). A lista de diagnósticos diferenciais possíveis para PT encontra-se na Tabela 10.

Tabela 10: Lista de diagnósticos diferenciais para PT, adaptada de Radostits *et al.*, 2006 e Savey *et al.*, 2009

Diagnósticos diferenciais em bovinos adultos	
Diarreia	Emaciação
Parasitismo intestinal; Parasitismo hepático (fasciolose); Forma crónica de salmonelose; Forma crónica da doença das mucosas; Carência secundária em cobre.	Reticuloperitonite traumática; Malnutrição; Pielonefrite; Linfossarcoma; Amiloidose; Cardiopatias.

## 6.6. Aspetos anatomo-histopatológicos

Não existe correlação absoluta entre a sintomatologia observada e gravidade, intensidade e extensão das lesões observadas na necrópsia (Savey, *et al.*, 2009).

No exame geral do cadáver é possível observar o reflexo de um estado de hipoproteïnemia avançada: atrofia muscular, edema subcutâneo em zonas de declive, mucosas pálidas, presença de um transudado amarelado que coagula em contato com o ar, ausência de reservas de gordura e edema do mesentério (Savey, *et al.*, 2009).

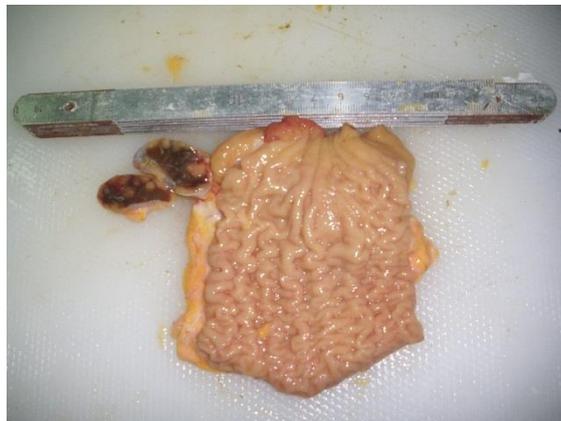
As lesões macroscópicas são observadas apenas numa fase adiantada da doença (Yamasaki, *et al.*, 2013). Estas estão confinadas à porção posterior do trato alimentar e os seus linfonodos associados. As regiões mais afetadas são a porção terminal do intestino delgado, o ceco e a porção inicial do intestino grosso (Radostits, *et al.*, 2006). Na necrópsia observam-se os vasos linfáticos subserosos intestinais proeminentes, esbranquiçados, de aspeto varicoso e que se podem estender até ao mesentério. A linfangite é um achado muito importante e específico o suficiente para justificar o diagnóstico de PT (Yamasaki, *et al.*, 2013).

Lesões mais específicas ocorrem no intestino delgado que, em casos mais graves, se estendem desde o duodeno até ao reto e caracterizam-se pelo espessamento da parede intestinal. A serosa adquire um aspeto cerebroide ou anelado devido às pregas e rugas transversais que se formam na mucosa (Figura 8). Os linfonodos mesentéricos encontram-se edematosos, aumentados de tamanho e ao corte protraem e flui grande quantidade de

líquido de aspeto leitoso (Figura 9). Também é possível observar nos bovinos mineralização das grandes artérias (Yamasaki, *et al.*, 2013).



**Figura 8: Lesões hemorrágicas e espessamento da mucosa intestinal em junção ileocecal colhida de animal suspeito de PT**



**Figura 9: Evidente espessamento da mucosa intestinal com aspeto cerebroide. Lesões hemorrágicas e aumento do tamanho de linfonodo mesentérico.**

Existem duas classificações que se podem atribuir às lesões microscópicas no intestino em animais com PT: uma forma tuberculoide e uma forma lepromatosa, conforme o estado evolutivo da doença (Savey, *et al.*, 2009; Yamasaki, *et al.*, 2013). A forma tuberculoide ou paucibacilar caracteriza-se pelo infiltrado inflamatório, principalmente da mucosa e submucosa do intestino delgado, composto de linfócitos e alguns macrófagos contendo poucas micobactérias. Estas lesões estão associadas à marcada resposta imune do tipo celular. Na forma lepromatosa ou multibacilar observa-se uma intensa infiltração granulomatosa com formação de células gigantes de Langhans que contém numerosos bacilos na mucosa e submucosa do intestino delgado e grosso. A forma lepromatosa está associada à forte resposta imunitária humoral (Yamasaki, *et al.*, 2013).

As vilosidades encontram-se espessadas e atrofiadas. Observa ainda a proliferação fibroblástica perto dos plexos de Meissner e Auerbach, linfangiectasia e linfangite granulomatosa na subserosa. As secções dos linfonodos apresentam lesões de natureza granulomatosa nas zonas cortical, paracortical e medular, contendo bacilos. A presença de granulomas no parênquima hepático também está descrita. A biópsia retal também pode constituir mais uma ferramenta na confirmação do diagnóstico de PT (Yamasaki, *et al.*, 2013).

### 6.7. Meios de diagnóstico

A PT é uma das doenças infecciosas cuja identificação representa mais dificuldades e mais riscos de ocorrência de erros. Com efeito, a utilização dos testes de diagnóstico e sua interpretação revela-se um desafio devido às características da doença como sejam o longo tempo de incubação, a complexidade da sua fisiopatologia, mas também da variedade de testes que se encontram disponíveis atualmente. É essencial compreender que a intermitência da excreção do microrganismo nas fezes e as flutuações dos anticorpos abaixo de níveis detetáveis pelos testes sorológicos contribuem para o aparecimento de uma multiplicidade de situações, a nível individual e coletivo, associadas às incoerências entre testes (Savey, *et al.*, 2009).

No diagnóstico da PT, pelo menos dois testes são necessários para confirmar a doença e estes têm de ser coincidentes com o estágio da doença. Na Tabela 11 está demonstrado a relação dos estágios da doença com a presença de sinais clínicos, excreção fecal e resposta imunitária, condicionam os resultados dos testes de diagnóstico (Radostits, *et al.*, 2006).

**Tabela 11: Relação entre os estágios de PT e os resultados dos testes diagnóstico, adaptada de Radostits *et al.*, 2006**

	<b>Animais resistentes</b>	<b>Período de incubação</b>	<b>Doença clínica avançada</b>
<b>Presença de sinais clínicos</b>	-	+	+++
<b>Excreção fecal</b>	+ (-)	++	+++
<b>Resposta imunitária humoral</b>	-	++	+++

### 6.7.1. Testes diretos

Uma das dificuldades dos métodos diretos é o facto da excreção do *MAP* por parte dos animais ser evolutiva. Esta pode ser nula nos animais que já se encontram infetados, intermitente e por fim permanente já numa fase clínica da doença (Savey, *et al.*, 2009).

O exame microscópico consiste na visualização do *MAP* nas matérias fecais de animais vivos ou nos órgãos colhidos após necrópsia (junção ileocecal e linfonodos mesentéricos) utilizando a coloração de Ziehl-Neelsen, coloração específica das micobactérias. O resultado obtido desta análise é apenas qualitativo e corresponde à observação ou não dos bacilos ácido-álcool resistentes. A sensibilidade deste teste aumenta consideravelmente quando este é feito a partir de tecidos colhidos na necrópsia (Savey, *et al.*, 2009).

O exame histopatológico é realizado em tecidos colhidos após a necrópsia como a junção ileocecal e linfonodos mesentéricos. Estes tecidos, previamente fixados em formol, são corados por eosina para pesquisa de células epitelióides e pela coloração Ziehl-Neelsen para a visualização dos bacilos. Este teste é mais sensível que o exame microscópico (Savey, *et al.*, 2009). Para o exame histopatológico devem ser enviados no mínimo fragmentos dos seguintes tecidos: Íleo, porção terminal do jejuno e os linfonodos mesentéricos e ileocecais (Collins, 2011a).

A cultura do *MAP* pode ser feita a partir de fezes, de tecidos ou do leite (Savey, *et al.*, 2009). A cultura fecal é considerada atualmente o teste mais apropriado para diagnóstico em animais vivos. A maior vantagem deste teste é o facto de possibilitar a identificação de animais infetados um a três anos antes do aparecimento dos sinais clínicos. Por outro lado, os procedimentos atuais são laboriosos e falham em detetar animais com níveis de excreção baixos. Adicionalmente, o *MAP* necessita de oito a 16 semanas de incubação até ao desenvolvimento das colónias. Novas técnicas de cultura e isolamento do *MAP* têm vindo a ser estudadas de modo a colmatar a sua baixa sensibilidade para animais na fase subclínica e o seu lento crescimento em meios artificiais (Radostits, *et al.*, 2006). A especificidade da cultura de fezes é considerada de quase 100%, porém existe um fenómeno de passagem do *MAP* pelo intestino sem que haja infeção, levando à existência de falsos positivos. Assim, a especificidade é estimada em 98% e a sensibilidade em 70% (Nielsen & Toft, 2008).

Existem quatro passos necessários para proceder a uma cultura de *MAP*:

1. descontaminação das amostras clínicas de modo a destruir ou suprimir o crescimento de outras bactérias irrelevantes e de crescimento rápido;
2. incubação prolongada em meio apropriado contendo agentes antimicrobianos, por forma a suprimir os possíveis restantes contaminantes o tempo suficiente para dar lugar ao crescimento do *MAP*;
3. reconhecimento das colónias de *MAP* em meio sólido ou sinais de crescimento;
4. identificação do *MAP* por meios fenotípicos ou genotípicos (Whittington, 2010).

Os meios de cultura ideais para o cultivo de *MAP* são: (i) Lowenstein Jensen, (ii) meio Herrolds's *egg yolk medium* (HEYM), (iii) Middlebrook (igualmente adequado, mas para otimizar o crescimento de *MAP* deve ser suplementado com gema de ovo). A identificação presuntiva das culturas pode ser levada a cabo pelo crescimento lento (as colónias desenvolvem-se após mais de três semanas) e predileção de hospedeiro ou tecido. As colónias apresentam-se de coloração branca, arredondadas e lisas (Whittington, 2010).

A técnica de PCR consiste na deteção de um fragmento de ADN específico do *MAP* seguida de uma fase de amplificação. Esta técnica pode ser efetuada tendo como material de análise fezes ou leite, embora estes não sejam os melhores para aplicar a técnica de PCR (Savey, *et al.*, 2009; Khare, *et al.*, 2004). Com efeito, o leite é considerado um espécime difícil para a deteção de organismos por PCR devido à presença de grandes quantidades de gordura e iões de cálcio. Já as amostras de fezes também são frequentemente consideradas inapropriadas por conterem grandes quantidades de material genómico irrelevante e elevadas concentrações de inibidores como os sais biliares, bilirrubina, urobilinogénio e polissacarídeos. Para além disso, as micobactérias apresentam uma parede celular altamente especializada com uma variedade de lípidos que as protegem de inúmeros químicos (Khare, *et al.*, 2004). Para além disso, é provável que uma parte do *MAP* presente no leite também tenha origem exógena por contaminação do material de ordenha (Slana, *et al.*, 2008).

Teoricamente, com esta técnica será possível a deteção de um número considerável de bactérias, contudo na prática a sensibilidade deste teste é equivalente à cultura de fezes. A sua vantagem é que permite um resultado mais rápido, dentro de 48 horas. Recentemente, o *real time* PCR foi adaptado para o diagnóstico da PT e apresenta vantagens

relativamente ao PCR convencional. As sequências são as mesmas para ambos (IS 900 para a maioria dos protocolos), mas o *real time* PCR é mais rápido e com menos riscos de contaminação (Savey, *et al.*, 2009).

### 6.7.2. Testes indiretos

Estas técnicas permitem o rastreio precoce dos animais infetados, mas não permitem prever se um animal que seja positivo vá desenvolver ou não doença clínica (Savey, *et al.*, 2009).

Através dos testes indiretos é possível medir tanto a resposta imunitária celular, como a humoral. De modo a avaliar a resposta celular, que consiste uma reação de hipersensibilidade retardada de tipo IV, existem vários testes como sejam o teste intradérmico ou o teste do IFN- $\gamma$  (Savey, *et al.*, 2009).

O teste intradérmico é utilizado desde há muitos anos para o diagnóstico da tuberculose bovina e, de uma forma geral, consiste na administração intradérmica de uma suspensão de extratos de micobactérias e avaliação da reação inflamatória produzida no local de inoculação após 72 horas. No caso da PT, um espessamento da pele de mais de três milímetros é considerado uma resposta positiva. O ideal seria que a inoculação fosse feita com a Johnina (um extrato do *MAP*), mas uma intradermotuberculinização comparativa também tem valor diagnóstico. Esta consiste na comparação da intensidade de reação obtida com a tuberculina aviária e bovina. Este teste tem uma especificidade muito baixa, uma vez que uma reação positiva apenas revela que o animal esteve exposto a uma micobactéria pertencente ao grupo *Avium* (Savey, *et al.*, 2009).

O teste do doseamento do IFN- $\gamma$  é uma alternativa à intradermotuberculinização e consiste na estimulação das células sanguíneas com um extrato da micobactéria e dosear pelo método de ELISA o IFN- $\gamma$  libertado no meio de cultura. Este doseamento é proporcional ao número de linfócitos que contactaram com o agente. Se este teste for feito com o recurso à Johnina e sua especificidade e sensibilidade são estimadas de 95%-99% e 50%-90%, respetivamente. Contudo, a especificidade deste teste é reduzida nos animais jovens uma vez que o nível de IFN- $\gamma$  é induzido por uma variedade de estímulos e os antígenos do *MAP* não são específicos, pelo que ocorrem frequentemente reações cruzadas (Stabel, 1996; Savey, *et al.*, 2009). Para além disso, pensa-se que alguns animais são capazes de eliminar a infeção e mesmo assim conservar as respostas biológicas associadas

à mesma (Savey *et al.* 2009). Todavia, este teste pode ser mais adequado para o diagnóstico de animais com PT subclínica, ou seja, quando a resposta imunitária mediada por células é mais evidente, comparativamente com o teste ELISA que é mais indicado para a confirmação de animais com doença clínica (Stabel, 1996).

Vários métodos sorológicos têm sido desenvolvidos para a detecção da resposta imunitária humoral induzida pelo *MAP*. A sua qualidade depende da especificidade dos antígenos utilizados (Savey, *et al.*, 2009). Estes testes são mais baratos e muito mais rápidos que a cultura, porém existem algumas reservas relativamente à sua especificidade e sensibilidade. Existem três tipos possíveis de testes sorológicos que são: fixação do complemento, imunodifusão em agar gel (AGID) e ELISA (Radostits, *et al.*, 2006).

O teste de fixação do complemento foi até recentemente o método mais utilizado para o diagnóstico de PT. As limitações deste teste incluem a ocorrência de resultados falsos negativos e falsos positivos. Foram apuradas uma especificidade de aproximadamente 90% e uma sensibilidade de aproximadamente 70% para animais com doença clínica, o que reflete a severidade das lesões e não tanto a severidade da alteração clínica. Por outro lado, a exatidão deste teste é reduzida quando aplicada a infecções subclínicas. Os falsos positivos revelados pela fixação do complemento em rebanhos infetados acontecem devido a reações cruzadas com outras bactérias, resposta humoral precoce antes da libertação fecal de microrganismos e a simples exposição ao *MAP* sem que haja infecção (Radostits, *et al.*, 2006).

A sensibilidade do teste AGID no diagnóstico de doença clínica é de 96% e a especificidade é de 94%, sendo que é considerado o teste mais adequado para o diagnóstico da doença clínica. Este teste é rápido, barato e preciso e os resultados estão disponíveis em 48 horas. Porém a AGID é limitada a rebanhos livres de tuberculose, uma vez que existem reações positivas para a tuberculose (Radostits, *et al.*, 2006).

Para a técnica serológica ELISA estão disponíveis vários *kits* comerciais que utilizam antígenos diversos como sejam frações protoplasmáticas, proteína recombinante entre outras. É feita uma etapa que consiste na exposição do soro a uma suspensão de *M. phlei* e que tem como objetivo eliminar os anticorpos dirigidos a outras micobactérias ou outras bactérias filogeneticamente semelhantes. Esta etapa permite melhorar a especificidade do teste estimada de 97-99% (Savey, *et al.*, 2009).

A sensibilidade do teste está diretamente correlacionada com a fase da doença em que o animal de encontra e com o nível de excreção de *MAP* nas fezes. Para os animais grandes excretoras com ou sem sinais clínicos e para os animais fracos excretoras as sensibilidades são estimadas de 87, 75 e 15%, respetivamente. Através deste método os anticorpos não são detetados antes dos 10 a 17 meses pós infeção, logo não é aconselhável realizar este teste em animais entre os 15 a 18 meses de idade (Collins, *et al.*, 2005; Savey, *et al.*, 2009). Uma outra desvantagem é que podem haver falsos positivos em rebanhos infetados com tuberculose, o que leva a um erro no diagnóstico e à implementação de medidas de controlo desnecessárias (Lilenbaum, *et al.*, 2009).

Quando este teste é utilizado com o objetivo de estimar a prevalência da doença numa exploração, os seus resultados devem ser multiplicados por um fator três, uma vez que o teste apenas deteta um terço dos animais infetados (Collins, *et al.*, 2005).

O ELISA pode ser realizado tanto a partir do soro como do leite, que diretamente de indivíduos, quer do leite do tanque. Os resultados deste teste realizado a partir do leite do tanque têm correlação com a seroprevalência da exploração, embora a sua sensibilidade seja limitada e haja flutuação de resultados em rebanhos não infetados devido a reações cruzadas (Nielsen & Toft, 2014). A maioria dos estudos feitos para determinar a especificidade e sensibilidade do ELISA no leite foram-no em animais infeciosos e aquelas variam entre 29% e 61% e entre 83% e 100%, respetivamente (Nielsen & Toft, 2008). Por outro lado, quando estão em causa amostras de leite individuais há que ter em conta que os anticorpos variam conforme a fase da lactação. No início da lactação é mais provável que sejam detetados anticorpos pelo ELISA no leite, contrariamente ao que acontece quando aplicada a técnica no soro (Weering, *et al.*, 2007).

Como se pode concluir de acordo com o acima descrito, existe uma grande variedade de testes disponíveis para o diagnóstico da PT. No entanto, não existe um teste que seja *golden-standart*, embora exista um teste mais adequado para cada situação. De facto, hoje é um desafio para o médico veterinário escolher que teste se adequa melhor para cada propósito. De modo a simplificar a escolha existe uma tabela (Tabela 12) feita nos Estados Unidos da América que apresenta um consenso relativamente aos testes a utilizar em bovinos (Collins, 2011a).

Tabela 12: Testes diagnóstico recomendados conforme o propósito do teste, adaptada de Collins, 2011a

Propósito do teste	Teste recomendado
<i>Programa de controlo em explorações com elevada prevalência (&gt;5% positivos)</i>	ELISA
<i>Vigilância</i>	Cultura de fezes (amostras ambientais ou “pool”)
<i>Erradicação</i>	Cultura ou PCR de fezes (“pool” de fezes)
<i>Confirmação de um diagnóstico clínico numa exploração sem casos de infeção</i>	Necrópsia, cultura ou PCR de fezes do animal infetado
<i>Confirmação de um diagnóstico clínico numa exploração infetada</i>	ELISA, cultura ou PCR de fezes.

## 6.8. Tratamento

Não existe cura definitiva para a infeção por *MAP*, mas podem ser administrados vários agentes de modo a reduzir ou aliviar os sinais clínicos e prolongar a vida do animal. Tipicamente, o tratamento deve ser feito durante o resto da vida do animal e estes continuam a libertar os organismos nas fezes, mas geralmente em números reduzidos. Não existem drogas aprovadas para o tratamento da PT em espécies pecuárias, mas existem opções terapêuticas para bovinos e outros ruminantes de valor económico, genético ou sentimental elevado (Fecteau & Whitlock, 2011).

Devido ao facto do *MAP* crescer em meio intracelular a maioria das substâncias utilizadas para o seu tratamento não são capazes de penetrar nas células mamíferas. Os antimicrobianos utilizados em casos de PT tanto experimentais como naturais são isoniazida, rifampina, clofazimina, aminoglicosídeos e dapsona (Fecteau & Whitlock, 2011).

A isoniazida inibe a biossíntese dos ácidos micólicos, componentes maioritários da parede celular. Este composto é bactericida nos dois primeiros dias de tratamento, ou seja, quando as micobactérias estão em crescimento rápido, e bacteriostático durante o restante do tratamento, quando a replicação do microrganismo é mais lenta. Os estudos de farmacodinâmica em ruminantes indicam que é bem absorvido por via oral, difunde-se bem pelos fluidos corporais e penetra facilmente nas células (Fecteau & Whitlock, 2011). A dose recomendada é de 20 mg/kg de peso vivo por via oral diariamente durante

100 dias. Todavia, este esquema de tratamento falha em tratar alguns casos clínicos de PT, apesar desta molécula ter alguma atividade contra o *MAP* (Radostits, *et al.*, 2006).

A rifampina é um antibiótico semissintético derivado da rifamicina B com um largo espectro de ação e com efeitos bactericidas ou bacteriostáticos dependendo do organismo e da sua concentração. Esta molécula penetra nos leucócitos e, por isso, é particularmente eficaz para microrganismos intracelulares. É bem absorvida oralmente pelos ruminantes e a dose indicada é de A rifampina é um antibiótico semissintético derivado da rifamicina B com um largo espectro de ação e com efeitos bactericidas ou bacteriostáticos dependendo do organismo e da sua concentração. É recomendado que a rifampina seja administrada em simultâneo com outro agente antimicrobiano devido à sua sinergia (comprovada em estudos feitos com coelhos) com outras drogas tais como a estreptomicina e o levamizole e de modo a reduzir o risco de desenvolvimento de resistências. O maior obstáculo à utilização desta droga em bovinos reside no seu elevado custo (Fecteau & Whitlock, 2011).

A clofazimina é um derivado da fenazina imunoquinona e o seu modo de ação consiste na inibição das funções do ADN da bactéria. Acumula-se no tecido adiposo e nos macrófagos do sistema reticuloendotelial e por isso possui uma boa eficácia contra microrganismos como o *MAP*. Na dose recomendada é de 600-1000 mg/kg de peso vivo os sinais clínicos apresentam remissão após tratamento prolongado (cerca de 10 meses), porém as culturas fecais continuam positivas, o que leva a crer que a clofazimina não elimina por completo a infeção, apenas aliviando os sinais clínicos. A descontinuidade do tratamento resulta em relapso nos 7 a 14 dias seguintes (Radostits, *et al.*, 2006; Fecteau & Whitlock, 2011).

Outras opções de tratamento são os aminoglicosídeos como a estreptomicina que revelou ser a substância com maior atividade contra o microrganismo, mas o tratamento na dose de 50 mg/kg de peso vivo, por via intramuscular, permite apenas uma melhoria transitório dos sinais clínicos (Radostits, *et al.*, 2006). Os próbióticos têm sido utilizados tanto em animais quanto em humanos como potenciais agentes no tratamento de várias doenças. Um agente da espécie *Dietzia* subs C79793-74, que inibe o crescimento do *MAP* em condições específicas *in vitro*, administrado em doses diárias bovinos positivos a *MAP* no teste ELISA revelou-se eficaz em reduzir os anticorpos detetáveis por este teste e mesmo a conduzir a resultados negativos (Fecteau & Whitlock, 2011).

A monensina, um antibiótico ionóforo é um possível agente terapêutico em bovinos adultos e quimioprofilático nos vitelos. É um composto que não é bem absorvido ao nível do trato gastrointestinal e é utilizado como aditivo na alimentação para aumentar o ganho de peso e a produção de leite em bovinos, ao condicionar a flora ruminal, nomeadamente por diminuição das bactérias Gram negativas. A administração de monesina em vacas adultas, naturalmente com *MAP*, pode resultar em melhoria moderada das lesões histopatológicas e diminuição da excreção fecal do agente. Quando usada como quimioprofilático juntamente com o leite de substituição em vitelos resulta na redução da colonização dos tecidos e excreção fecal (Collins, 2010).

## 6.9. Controlo

Estabelecer um programa de controlo para a PT compreende vários desafios. O facto de ser uma doença com fase subclínica e de desenvolvimento arrastado, dificultando o seu reconhecimento, bem como o controlo do nível de infeção no rebanho, são alguns deles. As estratégias de controlo não são simples ou claras, devido não só à natureza da doença, mas também às variações individuais de cada exploração como sejam a disponibilidade do maneo, mão-de-obra, económica e de infraestruturas (Rossitier & Burhans, 1996).

Devido à dubiedade dos testes que estão disponíveis, é impossível erradicar a PT de uma exploração, a não ser que seja feita uma completa despovoação da mesma e sejam reintroduzidos animais não infetados. Assim, a melhor opção será a de manter a prevalência da doença muito baixa (Radostits, *et al.*, 2006).

O controlo da PT é baseado em dois princípios essenciais: a prevenção das novas infeções e a identificação dos animais infetados. A identificação dos animais infetados é feita através dos testes de diagnóstico disponíveis já descritos e a prevenção de novas infeções passa pelo melhoramento da higiene do ambiente, assim como pelo impedimento de introdução de animais infetados (Radostits, *et al.*, 2006).

Os produtores são, muitas vezes, desconhecedores das características da doença e, por isso, devem ser educados e informados pelo médico veterinário. Algumas premissas sobre a PT devem ser transmitidas ao mesmo. São elas:

1. a infeção ocorre mais frequentemente nos primeiros 6 meses de vida do animal e o período de incubação varia de 2 a 5 anos;
2. esta doença diminui a produção de leite e a vida produtiva do animal;

3. e via de transmissão principal é fecal-oral, mas também pode ocorrer por via congênita, pelo colostro e leite de vacas infetadas;
4. vitelos nascidos de vacas infetadas têm mais probabilidade de ser infetados;
5. deve ser encarada como uma doença de rebanho e não como doença do animal individual;
6. o grau de infecção do rebanho tem tendência a aumentar ao longo do tempo quando medidas de controlo não são implementadas;
7. o controlo da doença implica tempo, mudanças no manejo de modo a prevenir novas infeções e identificação e refugo dos animais com sinais clínicos, assim como dos animais com infecção subclínica (Radostits, *et al.*, 2006).

Aquando da implementação de um plano de controlo para PT há que ter em conta que não existem planos estáticos e, por isso, este deve ser feito tendo em conta as particularidades da exploração, sendo que um dos principais fatores que influenciam esta diferenciação é a disponibilidade de recursos presente na exploração. Um dos recursos mais importantes para o sucesso do plano é a capacidade de alteração de manejo ao nível da exploração, uma vez que o controlo da PT baseia-se essencialmente no manejo preventivo e boas práticas de higiene. Outro fator a ter em conta é o poder financeiro da exploração que influencia o investimento em testes diagnóstico e no número de animais positivos a ser suprimidos (Rossitier & Burhans, 1996).

Antes de iniciar um plano de controlo na exploração é importante efetuar uma avaliação de risco que tem como objetivo a criação de um programa de controlo prático e de custo suportável, que o produtor entenda e no qual esteja empenhado. Nos EUA existem guias e formulários desenvolvidos para esse efeito que ajudam na compreensão dos objetivos do produtor com o programa, desafios em termos de saúde animal, a prioridade do programa relativamente a outras preocupações da exploração, dos riscos na transmissão do *MAP* na exploração e uma lista prioritária de medidas que o produtor pode tomar para reduzir a disseminação da infecção. A recolha desta informação é um processo demorado e é o passo mais importante na implementação de um plano de controlo. Envolver o produtor na avaliação do risco é importante, uma vez que ele vai ser confrontado

com as áreas onde se encontram os riscos de transmissão da doença e, por isso, estará mais motivado para implementar as medidas de controlo (Garry, 2011).

O plano de controlo deve ser construído tendo em conta objetivos a curto e longo prazo e estes devem estar claros e bem definidos. Deve ser prático e integrar outros aspetos da sanidade da exploração. Também deve ser construído com a máxima participação do produtor. (Garry, 2011).

A implementação de medidas higiossanitárias para a prevenção de novas infeções deve ser prioritária. Durante a avaliação do risco são identificadas as áreas onde há maior risco de transmissão. Em explorações de leite o manejo da maternidade e as práticas de recria das novilhas são as áreas de maior importância onde se deve atuar. Por outro lado, os vitelos são os indivíduos mais suscetíveis à infeção, pelo que também beneficiam de um melhoramento do manejo da maternidade, do manejo do colostro, da diminuição da exposição fecal e do melhoramento da higiene do leite. Estas medidas também previnem outras doenças do vitelo, para além de fazerem parte do programa de controlo da PT (Garry, 2011). As medidas preventivas mencionadas requerem pouco investimento de capital, uma vez que exigem muito mais mão-de-obra e atenção por parte do pessoal. Também não exigem necessariamente que as infraestruturas existentes na exploração sejam alteradas, pois usualmente podem ser efetuadas recorrendo a algumas alterações das que já estão presentes na exploração (Rossitier & Burhans, 1996).

Na prevenção de novas infeções devem ser tidos em causa três princípios importantes que estão resumidos na Tabela 13:

Tabela 13: Princípios e medidas de maneio a tomar de modo a prevenir novas infeções na exploração, adaptada de Radostits *et al.*, 2006 e Garry, 2011

Princípios	Medidas a tomar
<p><b>Minimizar os contactos entre os vitelos e outros animais assim como de materiais contaminados com fezes.</b></p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Limpeza e desinfeção da maternidade e dos parques dos vitelos após cada utilização.</li> <li>2. Separação do vitelo imediatamente após o parto para instalações devidamente limpas e desinfetadas.</li> <li>3. Alimentação dos vitelos apenas com colostro de vacas que sejam negativas aos testes de diagnóstico da PT.</li> <li>4. Limpar os tetos aquando da colheita de colostro para alimentação do vitelo.</li> <li>5. Oferecer colostro de uma única vaca a um único vitelo.</li> <li>6. Utilizar leite pasteurizado ou leite de substituição;</li> <li>7. Fazer recria separadamente dos animais adultos pelo menos até ao primeiro ano de idade.</li> <li>8. Evitar a partilha de fontes de água ou alimento entre animais jovens e animais adultos, não oferecer alimento recusado pelos animais adultos aos jovens.</li> <li>9. Evitar o trânsito de pessoal entre as áreas ocupadas por adultos e jovens.</li> </ol>
<p><b>Prevenir a contaminação fecal de água e alimento.</b></p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Utilizar equipamento diferenciado para manusear o alimento e o estrume.</li> <li>2. Manutenção dos comedouros e bebedouros limpos e livres de contaminações fecais.</li> <li>3. Não espalhar o estrume nas pastagens.</li> </ol>
<p><b>Reduzir a exposição da exploração ao microrganismo.</b></p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Suprimir os animais com doença clínica.</li> <li>2. Suprimir os animais cuja cultura fecal seja positiva (suprimir baixas excretoras no final da lactação pode ser aceitável).</li> <li>3. Testar todos os adultos pelo menos uma vez por ano através de testes sorológicos ou coprológicos, confirmar os animais seropositivos com cultura de fezes.</li> <li>4. Introduzir animais provenientes de explorações negativas para PT ou, se isto não for possível averiguar a situação sanitária da exploração com o veterinário ou proprietário ou testar pelo menos 30 animais adultos.</li> </ol>

Em explorações em que não é possível testar os animais a fim de identificar aqueles infetados, somente as medidas que envolvam o manejo na exploração (sem testagem dos animais) podem ser utilizadas com o fim de limitar as novas infeções (Garry, 2011).

Adicionalmente às medidas higiossanitárias e de manejo que são implementadas é de considerar a testagem dos animais. A primeira preocupação a ter, se a testagem dos animais fizer parte do programa de controlo, é que testes utilizar. Os testes mais comumente utilizados são o ELISA e a cultura fecal. A sensibilidade destes testes é de 40% a 50%. O ELISA mensura a resposta indireta dos anticorpos à infeção e é rápido e mais barato, enquanto a cultura fecal, que deteta a excreção do *MAP* diretamente nas fezes requer de 8 a 12 semanas para que as culturas cresçam e é mais dispendioso. Estes dois testes em conjunto são eficazes em detetar animais em estádios mais avançados da doença, sendo que animais mais jovens e com doença subclínica não são detetados. Todavia, com protocolos de cultura fecal mais sensíveis é possível detetar animais em estádios mais recentes da infeção e que ainda não demonstram resposta imunológica. A especificidade da cultura fecal é de 100% e a do ELISA é 99%, o que é uma vantagem na tomada de decisões acerca dos animais excretadores, mas sem valores de anticorpos interpretáveis (Rossitier & Burhans, 1996).

Uma forma de diminuir os custos, mas manter a sensibilidade que a cultura fecal acarreta e averiguar se o rebanho se encontra infetado é colher as amostras de fezes agrupadas, ou seja, fazer um *pool* de fezes. De modo a ultrapassar as alterações da sensibilidade que deste método advêm pode-se fazer vários *pools* de fezes conforme a idade. O principal objetivo desta técnica será a deteção de rebanhos que se presume que não estão infetados (Kalis, *et al.*, 2000).

Na implementação de um programa de controlo é recomendado estimar a prevalência de infeção no rebanho. Todos os animais com mais de dois anos devem ser testados, por exemplo recorrendo ao teste ELISA. Como a sensibilidade do teste é de 50%, a verdadeira prevalência de infeção será aproximadamente duas vezes os resultados do teste. Este primeiro teste irá providenciar informação acerca da magnitude da infeção no rebanho e posteriormente poderão ser tomadas decisões acerca de necessidade de novos testes (Radostits, *et al.*, 2006).

Uma outra forma de apurar a prevalência da doença na exploração a baixo custo e como alternativa à testagem individual dos animais é o PCR de amostras ambientais.

De forma a melhorar o limite de detecção do teste, devem ser colhidas dez amostras, porque um maior número de locais são avaliados e desta forma a heterogeneidade da distribuição do *MAP* pode ser minorada nos resultados dos testes (Cook & Britt, 2007).

O programa de controlo da doença mais simples é proceder ao refugio dos animais que apresentem sinais clínicos à medida que eles vão aparecendo, mas esta estratégia não elimina os animais subclínicos e a infeção progride na exploração. O ideal será que o primeiro teste efetuado estime a prevalência de infeção e que todos os animais positivos, assim como a sua descendência, sejam suprimidos da exploração. De seguida a exploração entra em sequestro e as animais que restarem voltam a ser testados em intervalos de 6 a 12 meses até que dois testes do rebanho sejam negativos. A combinação de ELISA e cultura de fezes de 6 em 6 meses em animais com menos de dois anos é recomendada. Contudo, nem todos os animais cujas fezes forem positivas na cultura fecal serão seropositivos e todas as vacas cuja cultura seja positiva devem ser refugadas, mesmo que sejam seronegativas, assim como a sua descendência (Radostits, *et al.*, 2006).

Este método é bastante eficaz uma vez que a maioria dos animais excretores é detetada, o que contribui para a redução da contaminação das pastagens, mas depende largamente do grau de contaminação ambiental. O método *culture-and-cull* é o mais preciso, mas é dispendioso e tem a falha de que os excretores intermitentes podem escapar à detecção. Uma outra alternativa é manter os animais infetados separadamente dos não infetados e impedir o contacto dos vitelos com as mães infetadas, ou seja, separar as crias das mães que são excretoras. Estes vitelos não devem ser introduzidos no grupo não infetado a não ser que sejam testados e se revele que não estão infetados (Radostits, *et al.*, 2006). Adicionalmente, as vacas que estejam infetadas e gestantes não devem parir na maternidade a fim de diminuir a carga infecciosa nessa área (Garry, 2011).

Um programa *culture-and-cull*, como dito anteriormente é muito eficaz e permite reduzir rapidamente a contaminação ambiental, mas algumas considerações económicas devem ser feitas. Este tipo de programas só é economicamente viável se a prevalência antes da testagem for superior a 5%. Esse mesmo estudo afirma também que o melhor teste será aquele com a maior sensibilidade e menor custo, ocupando a especificidade uma importância secundária (Radostits, *et al.*, 2006).

A higiene geral da exploração é de grande importância no controlo da infeção por *MAP*. As condições ambientais, o manejo do estrume correlacionam-se com a prevalência

da infecção, daí a importância de procedimentos de limpeza e desinfecção frequentes da exploração. Deve ser evitada a contaminação da água e alimento com fezes ou estrume, colocando os comedouros e bebedouros a um nível mais elevado e efetuando um pousio das pastagens contaminadas de pelo menos três anos. A combinação da testagem e refugo com o melhoramento do manejo do vitelo providencia um controlo mais rápido e efetivo da doença numa exploração leiteira (Radostits, *et al.*, 2006).

A prevenção de introdução de animais infetados na exploração é um dos maiores desafios na produção leiteira atual. A maioria dos produtores que adquire animais de reposição de outras explorações não aplica algumas regras básicas de biossegurança. Dado que a compra de animais aumenta o risco de introdução da PT na exploração, a melhor atitude a tomar seria fazer recria dos seus próprios animais de reposição. Isto implica que as vacas estejam saudáveis o suficiente, de modo a minimizar o número de refugos e que as novilhas também sejam saudáveis para que existam animais suficientes para substituição. Estes objetivos são benéficos para a exploração em geral e devem também eles ser tidos em conta num programa de controlo da PT (Garry, 2011).

Caso seja necessário a compra de animais, o produtor deve ser informado das limitações dos testes existentes. Nenhum dos testes garante que um indivíduo está livre de infecção. As únicas fontes de animais de substituição confiáveis são aquelas com registos de testes negativos (Garry, 2011).

Os programas de controlo efetivos da PT implicam tempo e pode demorar três a cinco anos para que sejam notados resultados óbvios (Radostits *et al.* 2006).

### **6.10. Vacinação**

Após a identificação e isolamento do agente, a vacinação como método de controlo da PT foi rapidamente introduzida. Inicialmente, a vacina era feita com um adjuvante que incluía óleo mineral e pó de pómice, com bactérias atenuadas, e era administrada por via parenteral. A vacina era administrada a animais de todas as idades e, inclusivamente, era utilizada em revacinações. Porém, mais tarde verificou-se que interferia com os testes de diagnóstico utilizados e passou a ser aconselhada apenas para vitelos (Juste, 2012).

Os tipos de vacinas contra a PT que existem são: vivas ou atenuadas incorporando com óleo e pómice; liofilizadas vivas e atenuadas que podem ser adjuvadas com óleo após

a reconstituição; e ainda bacterinas sujeitas a inativação pelo calor (OIE Terrestrial Manual, 2008).

A vacinação providencia a proteção contra a doença clínica e reduz a difusão da infecção, mas não previne que os animais se infetem. Devido ao risco de difusão da infecção em animais vacinados com a vacina viva e da possível associação do *MAP* à doença de Crohn apenas vacinas mortas estão autorizadas. A vacinação de vitelos com a vacina morta, não previne a transmissão da infecção natural e, por isso, as boas práticas de manejo continuam a ser necessárias no controlo da PT (Radostits, *et al.*, 2006).

A eficácia da vacina tem sido questionada e os resultados de estudos feitos variam de não redução da taxa de infecção a uma redução de 50 a 90%. Como tal, é do consenso geral que a vacinação reduz a incidência da doença clínica e, em menor escala, a prevalência da infecção, mas animais vacinados não estão completamente protegidos (Radostits, *et al.*, 2006).

Em termos gerais, a vacina está recomendada para rebanhos livres de tuberculose altamente infetados e que não existam meios para implementar as medidas higiossanitárias de maneira eficaz (Radostits, *et al.*, 2006; Patton, 2011). De modo a que seja autorizada a vacinação dos animais para a PT nos EUA, é necessário que sejam preenchidos alguns requisitos que são:

1. Confirmação que a exploração se encontra de facto infetada com pelo menos uma cultura fecal positiva ou PCR positivo de amostras fecais individuais, de um pool ou ambientais;
2. Teste da turberculina negativo em todos os animais testados;
3. O proprietário e a entidade estadual assinem um acordo de utilização da vacina (Patton, 2011).

A vacinação é realizada em vitelas que serão novilhas de substituição e vitelos futuros reprodutores entre o primeiro e os 35 dias de vida. É administrada por via subcutânea (Patton, 2011). Os vitelos não voltam a ser vacinados, uma vez que o nível de proteção diminui devido aos nódulos que por vezes se desenvolvem. A vacina não é benéfica para os animais com doença clínica, no entanto não causa a doença nem produz novos excretores (Radostits, *et al.*, 2006). Os anticorpos vacinais podem permanecer constantes dos dois aos seis anos e depois decrescer (Thomsen, *et al.*, 2012).

Existem algumas desvantagens inerentes à utilização da vacina. Uma delas é a formação de tumefações inflamatórias no local de injeção, que são posteriormente substituídas por nódulos indolores que podem persistir por anos. A maioria das lesões apresenta cerca de 10 cm de diâmetro e parecem não causar desconforto. A vacina deve ser administrada num local em que seja menos provável a ocorrência de lesões. Em raras ocasiões as lesões causam abscesso e drenam (OIE Terrestrial Manual, 2008; Patton, 2011).

A inoculação acidental do operador com vacinas para prevenção da PT pode também causar lesões do tipo granulomatoso. A dimensão das lesões depende da quantidade de vacina inoculada e do trauma causado na região. A pessoa afetada deve imediatamente contactar com uma autoridade de saúde para que lhe se sejam dadas recomendações de tratamento. Como tratamento inicial deve-se remover a bacterina da área inoculada, lavando. A área de inoculação não deve ser apertada, pois isso causa mais trauma (Patton, 2011).

De modo a evitar a inoculação acidental de humanos, deve ser feita uma contenção apropriada dos animais. Os vitelos devem ser vacinados de pé ou numa posição recumbente. O veterinário deve utilizar uma só mão para vacinar e deve ter atenção no momento de deitar fora as agulhas que devem ser prontamente colocadas em contentores para o efeito (Patton, 2011).

Uma outra complicação é a de que os animais que são vacinados se apresentam positivos às provas da jonina e tuberculina, tanto aviária como mamífera, por desencadeamento de uma resposta imunitária do tipo celular. No entanto, a reação é muito mais evidente à tuberculina aviária (Radostits, *et al.*, 2006; Patton, 2011). Por outro lado, a vacina também induz uma resposta imune humoral fazendo com que os animais vacinados sejam positivos aos testes de diagnóstico baseados na resposta humoral, como o ELISA. A fim de diagnosticar PT em animais vacinados será mais vantajoso recorrer a testes baseados em deteção direta do agente como a cultura ou PCR fecal. Uma vez que estes testes feitos individualmente tornam-se muito dispendiosos, como alternativa pode ser feito um *pool* de fezes de vários animais (Patton, 2011).

Em 2012, Che *et al.* testaram a eficácia de três vacinas geneticamente modificadas em ratinhos. As vacinas foram obtidas através de troca alélica, criando três estirpes mutantes de *MAP: leuD*, *mpt64* e *secA2*. Demonstraram que a vacina *leuD* foi mais eficaz a

proporcionar uma boa *clearance* bacteriana e a reduzir os níveis de inflamação. Esta esteira desencadeou os maiores níveis de resposta imunitária celular e humoral. Esta mutação também provoca uma atenuação do *MAP* (Chen, *et al.*, 2012).

Em 2009, Santema *et al.* levaram a cabo uma investigação de modo a avaliar uma vacina de subunidade. A vacina criada tinha como antigénio a proteína Hsp70 (que induz essencialmente imunidade celular) e como adjuvante dimetil dioctadecil brometo de amónio. Este grupo demonstrou que a vacina não interfere com o teste intradérmico da tuberculose nem com a pesquisa de IFN $\gamma$ . Avançam ainda que a resposta imunitária gerada pela vacina difere da gerada pela infeção natural e que os dados apontam para que a resposta imunitária seja predominantemente do tipo Th2, sendo esta a responsável pela fase clínica da doença (Santema, *et al.*, 2009; Savey, *et al.*, 2009).

Qualquer que seja a vacina utilizada, a vacinação é economicamente benéfica para a exploração quando outras medidas de controlo não são utilizadas. A melhor opção de vacina, em termos económicos, será uma de elevada eficácia que reduza a suscetibilidade, e a segunda melhor opção será uma vacina que tenha várias valências ao nível da dinâmica e progressão da doença (Cho, *et al.*, 2012).

O desenvolvimento de uma vacina efetiva de modo a controlar a PT continua a ser um desafio de saúde animal, relativamente a esta doença. Uma vacina melhorada e com uma boa relação custo-benefício é necessária para um melhor controlo da PT. Alguns avanços na genómica e genética molecular facilitam uma nova abordagem a este problema (Chen, *et al.*, 2012). Com isto em vista, os investigadores continuam na pesquisa de novas fórmulas candidatas a vacinas com uma eficácia melhorada e menos efeitos colaterais. Uma das soluções é a introdução de vacinas de subunidades, sendo que algumas delas podem ter a vantagem de não interferir com os testes diagnóstico de tuberculose ou PT (Patton, 2011).

Em Portugal a vacina é proibida em bovinos, ovinos e caprinos, por via do ponto dois do artigo 77.º do Decreto-Lei 314/2009, onde se define que a administração de um medicamento veterinário imunológico pode ser proibida, caso interfira na execução de um programa nacional de diagnóstico, controlo ou erradicação, como é o caso do plano de erradicação da tuberculose (Decreto-Lei N.º 314/2009). A aplicação da vacina pode ser autorizada para ovinos e caprinos, mediante uma justificação médico-veterinária,

desde que não existam em Portugal medicamentos veterinários similares ou que o medicamento se destine a resolver problemas clínicos em alternativa terapêutica (Decreto-Lei N.º 148/2008). Caso seja autorizada, a vacina utilizada é a Gudair®, aprovada noutros estados membros.

### **6.11. Impacto económico**

Geralmente, as vacas positivas ao *MAP* mesmo que não manifestem sinais clínicos produzem menos leite, são eliminadas da exploração mais cedo na sua vida produtiva, têm um menor valor que as suas coabitantes não infetadas (Lombard, 2011). Com efeito, a diminuição da produção de leite é o primeiro impacto económico da doença na exploração, tendo uma posição secundária mas não menos importante a reprodução e o refugo (Smith, *et al.*, 2010).

Em explorações infetadas com *MAP* são produzidos cerca de menos 288Kg de leite por vaca do que em explorações livres da doença (Ott, *et al.*, 1999). Os animais com baixos índices de excreção e os animais negativos ao *MAP* não demonstram diferenças significativas na média de produção diária de leite, sendo que nos primeiros esta teve um decréscimo ao longo do tempo mais rápido que nos segundos. As vacas com elevados índices de excreção, quando comparadas com os outros animais, apresentam uma média de produção leiteira diária bem mais baixa e com um decréscimo mensal mais acentuado (Smith, *et al.*, 2010). Os animais com doença clínica produzem menos 5 kg por dia durante a lactação (Raizman, *et al.*, 2007). Apesar de alguns animais não manifestarem sinais clínicos de PT está demonstrado que acontece uma redução na produção de leite cerca dos 300 dias antes do animal produzir os anticorpos detetáveis por ELISA (Sweeney, 2011). Adicionalmente, a qualidade do leite é afetada pela infeção, uma vez que vacas positivas produzem, não só menos leite, como também de qualidade inferior, designadamente apresentando menor teor proteico. Vacas com respostas imunes mais precoces (na primeira lactação) sofrem um maior decréscimo na quantidade de leite e na sua proteína (Gonda, *et al.*, 2007). Segundo Losinger (2005), se a PT não estivesse presente nas explorações leiteiras dos Estados Unidos da América teriam sido produzidos mais 580 milhões de quilogramas de leite (Losinger, 2005).

Pensa-se que a fertilidade de um animal infetado com *MAP* seja diminuída devido a um balanço energético negativo que se origina com a progressão da doença, causado pela redução da absorção intestinal de nutrientes (Johnson-Ifearulundu, *et al.*, 2000;

Smith, *et al.*, 2010). Raizman *et al.* (2007) apuraram que os animais com níveis de excreção do microrganismo elevados têm menos 3,8 vezes probabilidade de ficarem gestantes quando comparados com aqueles não infetados (Raizman, *et al.*, 2007). O intervalo entre partos também é afetado sendo maior em grandes excretores (Smith, *et al.*, 2010). Da mesma forma, a seropositividade está associada a um aumento dos “dias em aberto” em 28 dias. No período pós-parto, os nutrientes são direcionados para a produção de leite em detrimento da função reprodutiva. Como consequência os folículos desenvolvidos nesta fase produzem menos estradiol, resultando numa redução da expressão dos comportamentos de estro, o que pode levar a uma deficiente detecção de cio (Johnson-Ifearulundu, *et al.*, 2000).

Relativamente ao impacto económico na exploração do refúgio, este depende muito das decisões do produtor e pode estar relacionado, não só com a doença clínica em si, mas também com a diminuição da produção leiteira ou com a positividade de um teste para PT (Gonda, *et al.*, 2007; Smith, *et al.*, 2010). Um animal infetado permanece na exploração menos 124 dias, este valor aumenta para 202 dias no caso de os animais apresentarem PT clínica, o que influencia também a *performance* reprodutiva devido ao refúgio prematuro (Raizman, *et al.*, 2007). Outro estudo aponta para uma diminuição de 2,85 meses na vida produtiva de um animal infetado (Gonda, *et al.*, 2007). De uma maneira geral, a infeção por *MAP* está associada a um aumento na taxa de refúgio (Smith, *et al.*, 2010).

Por outro lado, a infeção por *MAP* pode influenciar o peso ao abate e o seu valor e a severidade da infeção está relacionada com essa redução. Vacas com cultura fecal positiva e seropositivas apresentam uma diminuição do peso ao abate em 12 a 15% e o valor diminui em 31% (Kudahl & Nielsen, 2009). Animais infetados pesam menos 30 a 54 kg do que animais saudáveis (Lombard, 2011).

A diminuição da produção de leite e a necessidade de uma maior reposição dos animais que vão sendo refugados como consequência da PT contribuem para o decréscimo do valor da produção por vaca nas explorações infetadas por *MAP*. As perdas económicas são particularmente mais significativas em explorações onde mais 10% das vacas suprimidas demonstram sinais clínicos. É estimado que a PT tenha custos de \$ 22-27 anuais por vaca à indústria leiteira nos EUA em perda de rendimentos e aumento dos custos de reposição de animais (Ott, *et al.*, 1999). Além disso, quando comparada com

outras doenças como a neosporose, BVD e leucose bovina, a PT apresenta os maiores custos em termos de perdas com a queda na produção e refugo prematuro (Chi, *et al.*, 2002).

## 6.12. Saúde Pública

Uma vasta gama de espécies animais, incluindo primatas podem ser infetados pelo *MAP*, sendo por esta razão plausível de suspeitar que a infeção pode-se dar também em humanos. O *MAP* tem sido consistentemente detetado por PCR em humanos portadores de uma doença epidemiologicamente e patologicamente idêntica à PT, a doença de Crohn (Collins, 2011b).

A doença de Crohn é uma afeção inflamatória recorrente que afeta essencialmente o trato gastrointestinal. Os indivíduos afetados apresentam-se frequentemente com dor abdominal, febre e sinais clínicos de obstrução intestinal ou diarreia com sangue ou muco ou ambos (Baumgart & Sandborn, 2012). Algumas evidências apontam para que seja resultado de uma resposta imunitária a um estímulo que pode ser proveniente do ambiente ou do sistema imunitário em si. A doença tem o nome do investigador que a distinguiu da tuberculose intestinal em 1932 (Chiodini & Rossitier, 1996).

A hipótese de o *MAP* ser uma possível etiologia para a doença de Crohn decorreu de uma série de trabalhos em 1984 que reportaram o isolamento do microrganismo em pacientes com esta doença, mas não de controlos (Chiodini & Rossitier, 1996). Porém antes disso, em 1913, já tinha sido sugerido por Daziehl que a doença de Crohn e a PT tinham muito em comum (Dalziel, 1913 referido por Kruiningen, 2011)

De facto, existem algumas evidências de que o agente possa ser comum às duas doenças. Muitos estudos identificaram anticorpos para o *MAP* em humanos com doença de Crohn mais frequentemente que nos controlos, ainda que os títulos de anticorpos não diferenciem, muitas vezes, pacientes com doença de Crohn e controlos (Collins, 2011b; Kruiningen, 2011). Esta doença tem sido tratada com eficácia e possivelmente até curada com antibioterapia combinada de longa duração. Contudo, falta ainda que os laboratórios especializados em culturas de *MAP* o isolem consistentemente a partir de amostras de pacientes com doença de Crohn, de modo a que seja evidenciado como uma das causas da doença nos humanos (Collins, 2011b).

Com vista a provar o potencial zoonótico do *MAP*, têm-se feito também estudos em que animais são inoculados com macerados de mucosa e submucosa de intestino e

linfonodos mesentéricos de pessoas com doença de Crohn. Todavia, os resultados não são compatíveis com esta hipótese (Kruiningen, 2011).

A maioria das espécies animais infetadas pelo *MAP* pertence ao grupo dos animais domésticos de produção e, por isso, é de pensar que as contaminações dos géneros alimentícios por eles produzidos ocorram antes do seu abate para consumo, uma vez que em infeções disseminadas o *MAP* é isolado do músculo, órgãos internos, colostro, leite e de fetos de animais gestantes. As contaminações podem ocorrer *ante mortem*, em animais infetados ou ainda por contaminação fecal no decorrer dos procedimentos da linha de abate. No caso do leite, este pode provir de animais infetados e, aí já se encontra presente o *MAP* ou, mais uma vez, por contaminação fecal. Por isso, os produtos crus originários de rebanhos infetados têm mais probabilidade de estar contaminados com *MAP* (Collins, 2011b). Por outro lado, Khol *et al.* (2013) concluiu que rebanhos subclínicamente infetados com *MAP* oferecem uma pequena fonte de infeção para os humanos, através do consumo de leite e laticínios (Khol, *et al.*, 2013).

Cerf *et al.* (2007) concluíram, após um estudo em que avaliaram a presença de *MAP* em leite pasteurizado, que menos de 0,54% das porções de leite (cada uma com 50 ml de leite) estariam contaminadas (Cerf, *et al.*, 2007). Klanicova *et al.* (2012) avaliaram as diferenças de viabilidade do *MAP* em produtos lácteos fermentados: dois iogurtes, kefir e leite acidificado. Esta equipa inoculou organismos obtidos a partir de fezes e linfonodos mesentéricos de bovinos em leite pasteurizado. Após submetido aos diferentes tipos de fermentação observou-se que foi possível isolar *MAP* viável a partir de todos os produtos menos do leite acidificado, tendo este atingido um pH de quatro e os outros ficado muito acima deste. Reportaram ainda que as culturas de arranque contendo *Lactobacillus* possuem um efeito inibitório sobre o *MAP* (Klanicova, *et al.*, 2012). Relativamente ao queijo, está provado que queijos com elevada humidade e pH (queijos frescos) e queijos fabricados a partir de leite cru apresentam maior probabilidade de contaminação por *MAP*. Contudo, o *MAP* também é capaz de subsistir em meios com baixa humidade e pH e processos de cura alongados, independentemente de haver ou não pasteurização prévia da matéria-prima (Collins, 2011b).

Mutharia *et al.* (2010) isolaram organismos de músculo e linfonodos de animais com doença avançada. Observaram ainda que a congelação rápida não teve qualquer efeito no crescimento do *MAP*, mas que a preparação a temperaturas superiores a 71,1°C

destes alimentos reduz o número destes microrganismos (Mutharia, *et al.*, 2010). Foram igualmente isolados organismos de bovinos assintomáticos excretadores e sem lesões visíveis a partir de intestino, linfonodos mesentéricos e músculos (diafragma e masséter) (Pribylova, *et al.*, 2011). Meadus *et al.* (2008) reportaram uma prevalência de seis a 54% de MAP em carcaças por PCR (sequência IS900) (Meadus, *et al.*, 2008).

A água de consumo doméstico também deve ser considerada como uma potencial fonte contaminante de *MAP* para humanos. A água da chuva que cai numa zona de produção de gado infetado pode conter organismos durante mais de um ano e as micobactérias, o *MAP* incluído, são resistentes aos níveis de cloro comumente utilizados para desinfeção da água (Collins, 2011b).

Segundo a OIE (World Organisation for Animal Health), não está demonstrado que a PT seja uma zoonose, pelo que, mais estudos devem ser levados a cabo para que se possa determinar o verdadeiro risco para a saúde pública do consumo de alimentos contaminados por *MAP*. Ainda existe muito que averiguar, mas cabe à medicina veterinária as considerações a ser feitas para mitigar a exposição dos humanos a este agente patogénico potencialmente zoonótico (Collins 2011).

## **7. ESTUDO EM PARATUBERCULOSE BOVINA EM SÃO MIGUEL, AÇORES**

O presente trabalho constitui um estudo piloto, exploratório, destinado a avaliar as taxas de infeção por MAP em bovinos observados com sintomatologia clínica compatível com paratuberculose (PT), designadamente diarreia crónica associada a emagrecimento progressivo.

O estudo, inicialmente, seria retrospectivo, comparando os dados de rejeição no MSM por caquexia com os casos de PT nas explorações das quais esses animais eram oriundos. De seguida, seriam colhidas amostras a animais dessa mesma exploração de modo a determinar a prevalência de PT na exploração. Contudo, não foi possível prosseguir com o desenho inicial do estudo devido a limitações financeiras.

O planeamento do estudo foi feito com o objetivo de colheita da material para o presente relatório, mas não só. Uma vez que existem poucos estudos feitos em Portugal sobre a prevalência da doença, quer ao nível dos rebanhos, quer a nível individual, um dos objetivos será contribuir de alguma forma para o estudo da doença no nosso país.

Espera-se que no final deste trabalho seja possível determinar a taxa de infeção por MAP em bovinos, assim como averiguar quantas explorações e freguesias se encontram afetadas pela doença. Também se pretende caracterizar as explorações afetadas em termos de número de animais e sistema de produção.

### **7.1. Objetivos**

Os principais objetivos do presente trabalho foram:

- a) determinar a taxa de infeção em bovinos que apresentaram sintomas;
- b) determinar como se comporta a doença ao nível da idade dos animais afetadas e da dimensão das explorações;
- c) determinar que freguesias da ilha de São Miguel se encontram afetadas;
- d) avaliação da relação entre os diferentes testes diagnóstico;
- e) sensibilização dos produtores para a doença através da redação de um panfleto informativo (Anexo 1);
- f) formulação de um questionário e posterior inquérito às explorações a fim de apurar os fatores de risco nas mesmas (Anexo 2).

## 7.2. Materiais e métodos

Este estudo foi realizado na população de bovinos da ilha de São Miguel e as amostras foram colhidas no âmbito das atividades de Inspeção Sanitária no MSM, único matadouro desta ilha e/ou durante o acompanhamento da assistência médico-veterinária aos produtores da Associação Agrícola de São Miguel (AASM).

Tendo em vista a identificação de possíveis casos de PT em bovinos, foram colhidas amostras de 116 bovinos com sintomatologia compatível com PT. De 81 dos animais as amostras foram colhidas no matadouro e de 37 na exploração. Assim, 68,10% das amostras foram colhidas no matadouro e 31,90% na exploração, tendo sido abrangidas 65 explorações neste estudo.

Os animais submetidos à colheita de amostras, foram aqueles que apresentavam um ou mais dos principais sinais clínicos da doença: emaciação/caquexia e diarreia crónica. A estes animais foi colhido sangue, fezes e, se os casos fossem detetados no matadouro, junção ileocecal juntamente com o respetivo linfonodo mesentérico.

As amostras de sangue foram colhidas para tubos secos de 5 ou 10 ml. Quando os possíveis casos foram detetados durante a prática clínica a amostra foi colhida através da punção da veia mamária ou da veia coccígea. No caso de serem observados no matadouro, o sangue foi colhido aquando da sangria dos animais. Todas estas amostras foram enviadas para o Laboratório Regional de Veterinária dos Açores (LRV) na ilha Terceira e foi utilizada a técnica de deteção de anticorpos ELISA fazendo uso de um *kit* comercial: “*Mycobacterium paratuberculosis Antibody test kit - IDEXX Paratuberculosis Screening*”.

Relativamente às amostras de fezes, estas foram retiradas da ampola rectal ou colhidas por defecação espontânea. No matadouro, as fezes foram colhidas diretamente da ampola rectal *post mortem* aquando da colheita da junção ileocecal. Até serem processadas, as fezes foram conservadas congeladas num frasco com tampa. Apenas as fezes de animais cujo teste de ELISA foi positivo foram enviadas para análise no INIAV (Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária). Aí foi feito e tive oportunidade de acompanhar o processamento das amostras de fezes para posterior cultura e extração de ADN e posterior PCR. Os meios utilizados para cultura de fezes foram HEYM com e sem micobactina. A extração do ADN foi feita por meio de um *kit* comercial: *Qiagen mini kit* e foi feito *Nested PCR*.

As amostras de junção ileocecal foram colhidas na triparia do MSM no momento em que o retículo-rúmen era separado das restantes vísceras. A junção ileocecal e linfonodo mesentérico eram identificados e isolados do restante intestino com auxílio de uma faca e depositados num recipiente com formol a 10% na proporção de 1/10 onde foram conservados. De seguida, todas estas amostras foram igualmente enviadas para o LRV dos Açores na ilha Terceira onde foram submetidas a técnicas de histopatologia: colorações de hematoxilina-eosina e Ziehl-Neelsen.

Após serem colhidas as amostras estas eram devidamente identificadas com o número do brinco do animal e data de colheita. De modo a saber o histórico do bovino, proprietários por onde circulou e freguesia respetiva, foi consultada a base de dados do Sistema Nacional de Informação e Registo Animal (SNIRA). Considerou-se a exploração onde o bovino permaneceu nos primeiros seis meses de vida como aquela onde se infetou pelo *MAP*, de acordo com o estado atual dos conhecimentos sobre a patogenia da doença (Nielsen & Toft, 2008; Sweeney, 2011).

Foi constituída uma base de dados utilizando o programa Microsoft Excel 2007® onde foram registados os dados referentes ao animal e exploração de origem, assim como à amostra. As colunas inseridas foram as seguintes: *número do brinco, freguesia de origem, exploração de origem, idade, sinais clínicos, material colhido, local de colheita, data da colheita, data de envio da amostra e resultados*. A tabela foi sendo atualizada conforme os resultados estavam disponíveis. O *software* mencionado foi utilizado ainda para fazer o tratamento estatístico dos dados.

Os questionários foram efetuados aos proprietários de duas explorações que se mostraram interessados em participar no estudo. Os resultados não serão apresentados por se tratarem de apenas dois questionários preenchidos. O questionário será apresentado no Anexo 2.

Foram submetidos 105 soros para análise por ELISA, 72 junções ileocecais (JIC) para análise histopatológica, sendo que a 61 animais foi colhido tanto sangue como JIC (Tabela 14).

Tabela 14: Testes realizados e respetivo número de amostras

Testes	Número de amostras
<b>ELISA</b>	105
<b>Histopatologia</b>	72
<b>ELISA + Histopatologia</b>	61

Das 96 amostras de fezes colhidas, 58 foram enviadas (Tabela 15) para cultivo e extração de ADN visando a execução de *Nested* PCR específico para *MAP* (Célia Leão, dados não publicados). As amostras fecais enviadas eram provenientes de animais que eram seropositivos ou que, na análise histopatológica, tinham sido encontrados os BAAR, excetuando as amostras de um animal em que o resultado da serologia foi negativo e a conclusão do exame histopatológico foi enterite.

Tabela 15: Amostras enviadas para cultura de fezes e *Nested* PCR

Testes efetuados	Número de amostras
<b>ELISA +</b>	25
<b>Histopatologia PT</b>	6
<b>Histopatologia PT e ELISA +</b>	23
<b>Histopatologia Enterite e ELISA -</b>	1
<b>TOTAL</b>	<b>58</b>

### 7.3. Resultados

Considera-se uma exploração está infetada quando apresenta pelo menos um animal positivo para um dos testes, como tal a PT foi identificada em 39 explorações. Segundo os resultados, estão afetadas com PT 24 freguesias da ilha de São Miguel de um total de 59, o que representa 41% das freguesias.

Todos os concelhos, excetuando o Nordeste, apresentam explorações com casos de PT (Figura 10). O concelho de Ponta Delgada (representado a amarelo no mapa) é aquele que apresenta maior número de explorações com casos confirmados de infeção por *MAP* (23), seguido pela Ribeira Grande (nove) e Vila Franca do Campo (seis) e, por fim os concelhos de Lagoa e Povoação (um). A distribuição geográfica das explorações baseou-se no parcelário oficial existente no SDASM e onde se localiza a sala de ordenha e ou a principal parcela produtiva da exploração.

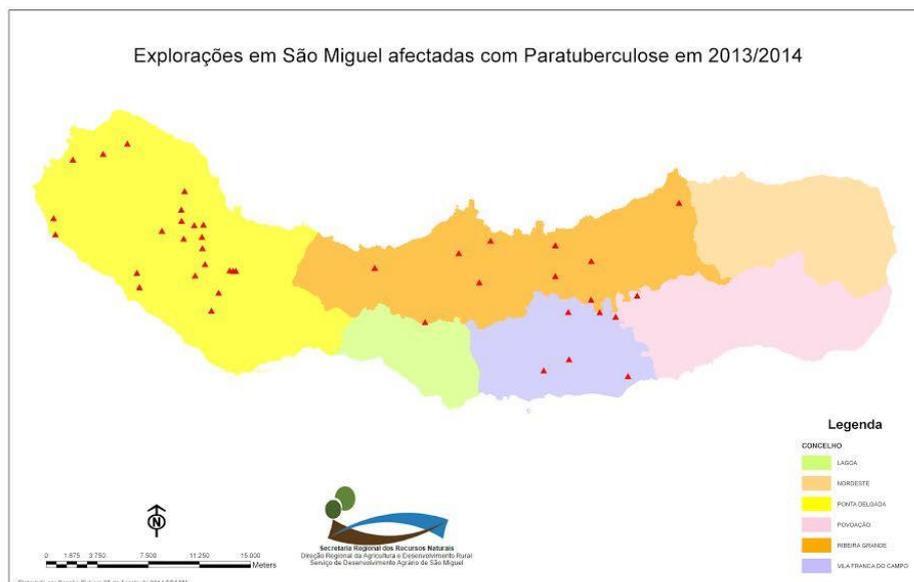


Figura 10: Distribuição geográfica das explorações afetadas, cortesia de Paulo (SDASM).

Os animais que apresentaram sinais clínicos e que por isso foram incluídos no estudo tinham idades compreendidas entre os 23 e os 186 meses, ou seja entre cerca dos dois anos até cerca dos 16 anos. As distribuições dos animais testados encontram-se na Tabela 16.

Tabela 16: Distribuição por idades dos animais testados

Idade	Nº animais testados
<b>0-2 anos</b>	1
<b>2-4 anos</b>	32
<b>4-6 anos</b>	43
<b>Mais de 6 anos</b>	40
<b>TOTAL</b>	116

Quanto à serologia, os resultados positivos foram 68, sendo que 23 amostras foram colhidas em explorações e 45 no matadouro (Tabela 17). Pode-se verificar que a taxa de positividade é maior nas amostras colhidas na exploração do que nas amostras colhidas no matadouro.

Tabela 17: Resultados das amostras enviadas para análise serológica e histopatológica

	ELISA		Histopatologia
	Matadouro	Exploração	
<b>Amostras</b>	71	34	71
<b>Positivos</b>	45	23	37
<b>% positivos</b>	63,38%	67,65%	52,11%

Como se pode observar pela Tabela 18, dos 82 animais aos quais foram colhidas amostras no matadouro 21 foram reprovados em vida (25,61% das amostras colhidas no matadouro). A 14 desses animais um dos testes efetuados (ELISA ou histopatologia) foi positivo (66,67% dos animais rejeitados em vida).

Tabela 18: Amostras positivas nos animais reprovados em vida

	Rejeitados em vida	Positivos
<b>Total</b>	21	14
<b>%</b>	26,58%	66,67%
<b>Total de amostras colhidas no matadouro</b>		<b>82</b>

A faixa etária em que foram detetados mais animais seropositivos foi entre os quatro e seis anos, seguindo-se os animais com mais de seis anos (Gráfico 10).

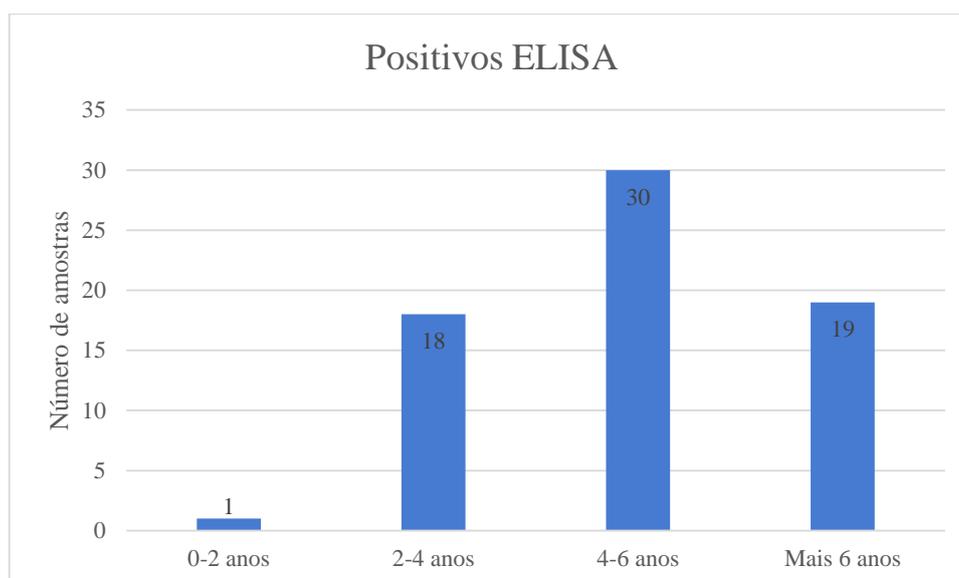
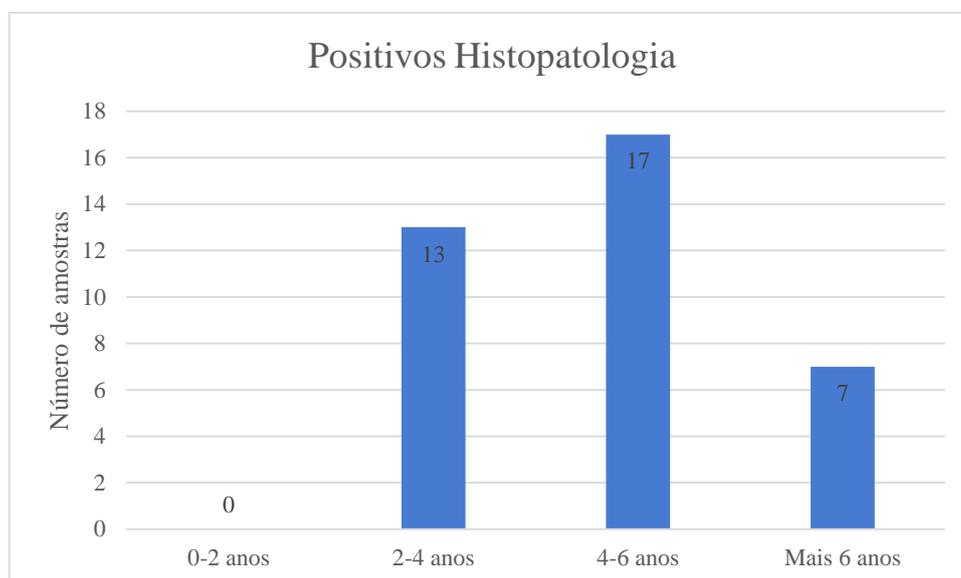


Gráfico 10: Distribuição dos positivos ao teste ELISA por idades

Relativamente à histopatologia, foram encontrados BAAR e portanto feito o diagnóstico de PT em 37 amostras de junção ileocecal colhidas no matadouro (Tabela 17). Verifica-se que, tal como na serologia o maior número de animais positivos encontra-se entre os quatro e seis anos e em segundo lugar entre os dois e quatro anos.



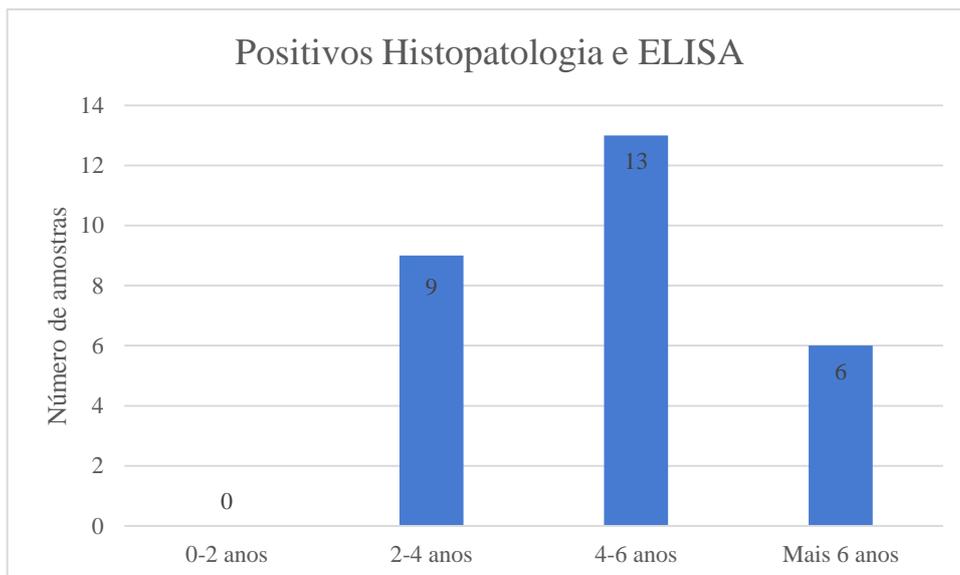
**Gráfico 11: Distribuição dos positivos na histopatologia por idades**

Como referido anteriormente, a 61 animais foi colhido tanto sangue como a JIC, apresentando-se os resultados na Tabela 19. Houve resultados concordantes (positivos no teste ELISA e PT na histopatologia) em 28 amostras e discordantes em 32 das amostras, sendo que em três delas no intestino de um animal seronegativo foram detetados BAAR.

**Tabela 19: Resultados das amostras para análise por ELISA e histopatologia de um mesmo animal**

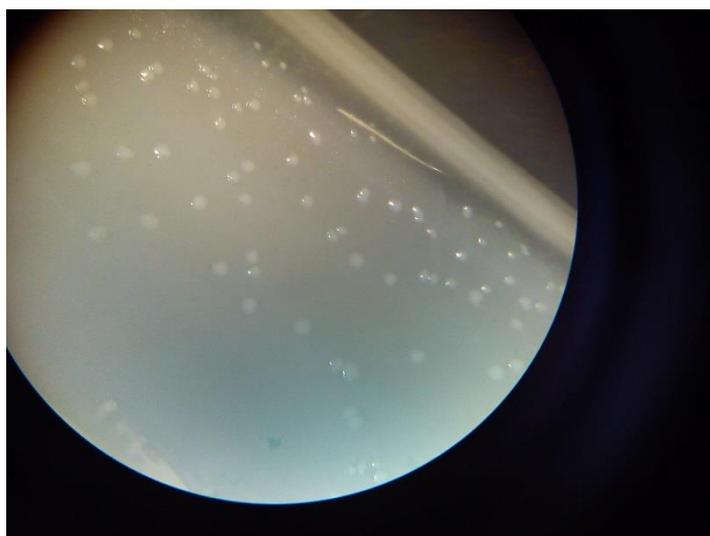
Resultados de ELISA e histopatologia	Número de amostras
<b>Positivo e PT</b>	28
<b>Positivo e enterite</b>	10
<b>Negativo e enterite</b>	19
<b>Negativo e PT</b>	3
<b>Duvidoso e enterite</b>	1

No Gráfico 12 está representada a distribuição dos animais positivos ao teste ELISA e no exame histopatológico, por idades.



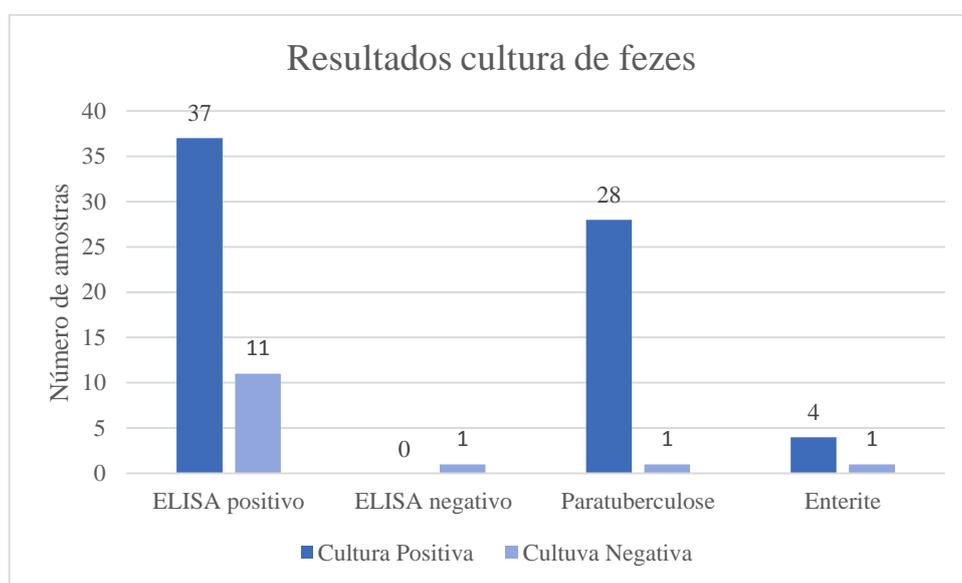
**Gráfico 12: Distribuição por idades dos animais positivos no teste ELISA e na histopatologia**

Das 58 amostras fecais enviadas para análise 42 originaram culturas no meio utilizado e 34 foram positivas no PCR. Oito amostras foram negativas no PCR, mas observou-se crescimento bacteriano. Uma das amostras seropositivas não originou resultados concordantes ao nível da cultura e PCR, sendo positiva no PCR e não apresentando crescimento bacteriano no meio de cultura. As colónias (Figura 11) foram identificadas presumivelmente pelo seu aspeto (brancas, brilhantes), pelo tempo de crescimento e pelo facto de crescerem em meio suplementado com micobactina e não acontecer o mesmo em meio não suplementado.



**Figura 11: Aspeto do crescimento das colónias de MAP no meio HEYM com micobactina**

Relativamente às amostras que tinham resultados seropositivos, 11 das culturas de fezes não foram concordantes com o resultado prévio, não havendo crescimento. No caso da histopatologia, de 29 amostras enviadas apenas numa não foi demonstrado crescimento bacteriano. Em quatro das amostras que, segundo o exame histopatológico o diagnóstico era de enterite, a cultura foi positiva (Gráfico 13). Em suma, 77,08% das amostras seropositivas enviadas tiveram a cultura de *MAP* positiva e, de igual modo, em 96,55% das amostras provenientes de animais com histopatologia compatível com PT houve crescimento bacteriano.



**Gráfico 13: Resultados da cultura de fezes conforme os resultados da serologia e histopatologia**

Quanto ao PCR das amostras de fezes, verificou-se que nem todas as amostras com PCR negativo eram isentas de crescimento bacteriano (Tabela 20). Dezoito das amostras provenientes de animais seropositivos não foram positivas no teste PCR (Gráfico 14). Curiosamente, uma das amostras confirmadas como PT na histopatologia foi negativa em ambos os testes diretos efetuados. Igualmente, quatro amostras com diagnóstico histopatológico de enterite revelaram crescimento bacteriano e positividade no PCR. Assim, 62,50% das amostras positivas no teste de diagnóstico sorológico ELISA foram positivas para o PCR, da mesma forma que 68,97% das amostras com resultado positivo no exame histopatológico.

Tabela 20: Resultados obtidos na cultura de fezes e *Nested PCR*

	Cultura positiva		Cultura negativa	
	Número	Porcentagem	Número	Porcentagem
<b>PCR positivo</b>	31	53,45%	3	5,17%
<b>PCR negativo</b>	11	18,97%	13	22,41%

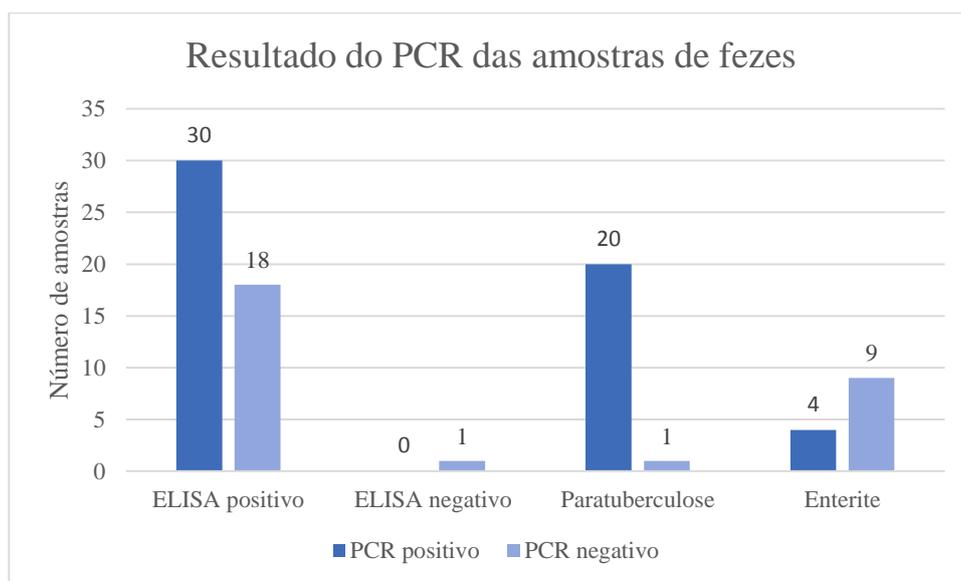


Gráfico 14: Resultado do PCR de fezes conforme os resultados de serologia e histopatologia

Neste estudo apurou-se que 39 explorações de bovinos se encontravam afetadas, isto é, com animais infetados por *MAP* (Tabela 21).

Tabela 21: Número de animais por exploração e casos de PT detetados em cada uma delas

Explorações	N.º animais	N.º casos	Explorações	N.º animais	N.º casos
<b>1</b>	30	2	<b>21</b>	91	1
<b>2</b>	219	1	<b>22</b>	28	1
<b>3</b>	117	6	<b>23</b>	30	1
<b>4</b>	53	1	<b>24</b>	22	1
<b>5</b>	15	1	<b>25</b>	63	1
<b>6</b>	75	1	<b>26</b>	25	1
<b>7</b>	65	1	<b>27</b>	138	1
<b>8</b>	66	1	<b>28</b>	21	2
<b>9</b>	79	1	<b>29</b>	12	1
<b>10</b>	95	1	<b>30</b>	272	1
<b>11</b>	106	1	<b>31</b>	24	1
<b>12</b>	102	1	<b>32</b>	63	1
<b>13</b>	24	1	<b>33</b>	70	1
<b>14</b>	45	1	<b>34</b>	52	1
<b>15</b>	68	1	<b>35</b>	36	1
<b>16</b>	120	1	<b>36</b>	260	7
<b>17</b>	46	2	<b>37</b>	146	2
<b>18</b>	143	4	<b>38</b>	75	9
<b>19</b>	208	1	<b>39</b>	54	1
<b>20</b>	44	1			

A média do número de animais por exploração é de  $82,1 \pm 64,6$ , sendo que a maior exploração tem 272 animais e a menor 12 animais. De modo a averiguar a importância do número de animais nas explorações para o número de casos observados calculou-se o coeficiente de correlação de Spearman ( $R=0,19724$ ;  $p\text{-value}=0,22876$ ) que não revelou qualquer correlação entre estas duas variáveis.

O Gráfico 15 representa o número de animais positivos por exploração. É possível observar que a maioria das explorações envolvidas no estudo tem um caso confirmado de PT.



**Gráfico 15: Explorações agrupadas por número de animais positivos em cada uma delas**

#### **7.4. Discussão**

Neste estudo preliminar pretendeu-se detetar e confirmar os casos clínicos de PT na ilha de São Miguel. Para esse efeito, a todos os animais com sintomatologia compatível com a doença foi colhido material para análise (sangue, fezes e fragmentos da junção ileocecal e linfonodo mesentérico). Com os dados obtidos pretendeu-se averiguar a sua distribuição geográfica, por idades e caracterizar em termos de número de animais e tipo de exploração (móvel ou fixa) as explorações com casos.

Como já foi referido anteriormente, o estudo não compreende uma amostra aleatória e representativa de toda a população bovina da ilha. Com efeito, apenas os animais com sinais clínicos compatíveis foram incluídos no estudo.

Dos 116 animais testados, 77, ou seja, 66,38% tiveram um dos testes positivos. No teste sorológico verificou-se uma positividade de 61,76% em amostras colhidas no matadouro e de 70,27% em amostras colhidas na exploração. Os animais suspeitos que se encontravam no matadouro eram submetidos a uma inspeção *ante mortem* que consistia essencialmente num exame visual da atitude, postura, condição corporal e alterações que fossem visíveis no exterior do animal. Para além disso, os animais apresentavam-se em lotes, o que contribui para que o exame não fosse tão preciso como durante a prática de clínica de campo, em que é observado apenas um animal de cada vez, com maior pormenor.

Por serem muitos animais sujeitos a abate, os principais sinais procurados eram a fraca condição corporal e, quando não era possível observar os animais a defecar, a cauda suja de fezes líquidas (sinal sugestivo de diarreia). Todos estes fatores, juntamente com possível inexperiência, podem ter contribuído para que a percentagem de testes ELISA positivos, em amostras colhidas na exploração, fosse mais elevada.

As explorações afetadas situam-se nos concelhos de Ponta Delgada, Povoação, Vila Franca do Campo e Ribeira Grande. Mais de metade das explorações com pelo menos um teste positivo encontram-se no concelho de Ponta Delgada. De facto, a área onde eram acompanhados casos clínicos com o médico veterinário da AASM era esta, pelo que isso pode ter contribuído para um possível viés no estudo. Ainda assim, foi possível concluir que os casos se concentram nas áreas da ilha que existe um maior número de explorações leiteiras e uma maior densidade populacional de bovinos leiteiros.

O caso clínico de PT confirmado pelo teste ELISA em animal mais jovem respeitou a uma novilha de 23 meses, o que se encontra dentro do que está descrito na bibliografia como sendo o início do aparecimento dos sinais clínicos (Whitlock & Buergelt, 1996), assim como o facto de mais animais terem sido testados com idades compreendidas entre os quatro e seis anos. Como tal, em ambos os testes houve um maior número de positivos nessa faixa etária. A deteção dos anticorpos num animal tão jovem pode ser indicadora de uma pressão de infeção elevada na exploração.

Por outro lado, enquanto o teste ELISA detetou animais dos quatro até mais de seis anos de idade recorrendo à histopatologia foi possível detetar um maior número de animais infetados por *MAP* mais precocemente, ou seja, dos dois aos seis anos. Estes resultados explicam-se com o facto da resposta imunitária se traduzir em produção de anticorpos detetáveis no teste ELISA muito depois dos *MAP* se encontrarem no intestino (Chiodini 1996). A partir dos resultados obtidos a partir de um estudo feito na ilha Terceira, contactou-se um maior número de animais positivos ao *MAP* entre os quatro e cinco anos e os seis e os sete anos de idade (Homem, 2011).

Relativamente à concordância dos resultados do teste ELISA e da histopatologia, esta acontece num maior número de animais dos quatro aos seis anos. Nesta idade a resposta imune já se desenvolveu e já existem anticorpos em níveis detetáveis pelo teste ELISA e os bacilos de *MAP* encontram-se no intestino.

Pela observação da Tabela 19 podemos concluir que existem 10 pares de amostras cujo teste ELISA foi positivo, mas na análise histopatológica não foram detetados BAAR. Na observação microscópica dos fragmentos dos tecidos podem não ser observáveis os bacilos, mas ainda assim o animal encontrar-se infetados por *MAP* e, por isso, demonstrar resposta imune.

Relativamente aos resultados dos testes de diagnóstico efetuados às fezes, 53,45% das amostras que tiveram crescimento bacteriano foram também positivas na técnica de PCR executada e que 22,41% das amostras foram negativas em ambos os métodos. No entanto, verificou-se que em três casos (5,17%) o PCR foi positivo e a cultura negativa. Uma possível justificação será a presença de células de *MAP* nas fezes, mas estas não seriam células viáveis e, portanto, incapazes de formar colónias. Por outro lado, ao efetuar a pesagem das fezes para o protocolo, a homogeneização das mesmas pode ter sido insuficiente. Observou-se ainda a ocorrência de crescimento bacteriano sem que o PCR fosse positivo, o que pode ser causado por inibidores ou, devido ao facto de se tratar de *Nested* PCR (*Real time* PCR precedido de PCR convencional), existir demasiado ADN e os ciclos de amplificação serem tão precoces que o aparelho não os reconhece.

Em ambos os testes diretos verificou-se existir um maior número de negativos quando comparados com o teste ELISA, contrariamente ao que acontece com as amostras com exame histopatológico positivo. Isto confirma a possível ocorrência de reações cruzadas, principalmente em rebanhos em que a tuberculose não está erradicada (Lilenbaum, *et al.*, 2009).

Verificou-se que numa amostra com diagnóstico de PT pelo exame histopatológico, não houve crescimento bacteriano nem positividade no PCR. A confirmação no exame histopatológico como PT é feita pela coloração Ziehl-Neelsen. Esta coloração é específica das micobactérias e não de *MAP*, pelo que as lesões no intestino podem ter sido causadas por outra micobactéria (Savey, *et al.*, 2009). Por outro lado, foram notados casos de enterite que revelaram positividade numa ou em ambas as técnicas diretas, revelando a excreção de *MAP*, mesmo não sendo observados bacilos no intestino. Estes fatos confirmam que as lesões descritas ao nível do intestino não são patognomónicas da infeção por *MAP*.

No total, 39 explorações foram identificadas como infetadas no decorrer do estudo. Não se observou correlação significativa entre o número de animais na exploração

e o número de casos detetados. Por outro lado, a maioria das explorações contempladas apenas tiveram um caso positivo de PT, o que pode ser explicado pelo fato dessas explorações serem de pequena dimensão (sensivelmente até 100 animais) e, por isso, não enviarem tantos animais para abate como uma exploração de maiores dimensões. O mesmo se aplica às explorações onde foram detetados mais casos, adicionando o fato que a três delas foi colhido material para análise (sangue e fezes) a animais suspeitos a pedido do proprietário.

Finalmente, é de considerar que o número de casos detetados neste estudo na ilha de São Miguel está subestimado, não só pela própria tipologia do estudo, mas também devido à patogenia da própria doença e aos testes disponíveis.

## **7.5. Conclusão**

Este estudo é preliminar e permite averiguar de forma muito superficial a problemática de uma doença que causa tantas perdas económicas nas explorações, como a PT. A percentagem de animais positivos do estudo é de 66,38%, o que permite afirmar que na maioria dos casos observados de bovinos com sintomatologia compatível com PT se confirmou a doença laboratorialmente. Em todos os testes verificou-se que a faixa etária com mais casos foi entre os 4 e os 6 anos. O estudo não revelou evidências de que haja uma correlação entre o número de casos numa exploração e a sua dimensão. Verificou-se ainda que é possível confirmar mais precocemente os casos clínicos através da histopatologia, comparativamente com o teste ELISA. Com a cultura de fezes foi possível a confirmação de mais casos positivos do que com a técnica de PCR (em comparação com os testes de ELISA e histopatologia).

Algumas questões são levantadas que carecem de mais trabalhos na ilha a fim de perceber as condições epidemiológicas presentes que favorecem a disseminação do agente e a progressão da doença.

Durante a execução do presente trabalho foi de notar o desconhecimento da maioria dos produtores acerca da PT e das suas implicações económicas ao nível da produção. O fato de ser uma doença crónica e de progressão lenta dificulta o trabalho do médico veterinário para alertar os produtores para o seu controlo, uma vez que as perdas associadas apenas são detetadas a longo prazo e não de imediato. O mesmo sucede com as medidas de controlo, cujo benefício apenas é reconhecido algum tempo após terem sido implementadas.

Por fim, é importante que mais trabalhos sejam feitos no sentido de compreender o comportamento da infeção, não só na ilha de São Miguel, no arquipélago dos Açores e também no resto do país, permitindo uma maior informação disponível para fornecer aos produtores e a implementação de medidas de controlo sistemáticas.

## **8. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

No final deste trabalho, é de notar o papel fundamental do Estágio Curricular como forma de complementar os conhecimentos adquiridos durante a restante formação académica. Acompanhando os vários médicos veterinários com que tive o privilégio de contactar percebi que a aprendizagem é contínua ao longo dos anos de carreira.

Pela natureza multidisciplinar do estágio foi-me possível aprender acerca das várias áreas de intervenção em que o médico veterinário tem participação como sejam a inspeção sanitária, a clínica de espécies pecuárias e a sanidade animal. Considero que os conhecimentos adquiridos nestas áreas que serão uma mais-valia no mercado de trabalho.

O estágio no MSM permitiu-me ter conhecimento do funcionamento do matadouro, incluindo as operações de inspeção sanitária, de higiene, de transporte dos animais e de funcionamento da linha de abate em si. Ao executar o relatório de estágio referente às atividades desenvolvidas no matadouro foi-me possível ter um conhecimento mais profundo da legislação associada.

No acompanhamento da clínica de campo foram acompanhados casos clínicos de variadas áreas, desde as doenças infecciosas e parasitárias à medicina interna. Aliado a um estudo mais aprofundado de casos que suscitaram mais interesse ou que foram mais comuns, esta componente permitiu-me adquirir boas bases de conhecimento para a vida profissional futura.

Foi possível ainda acompanhar alguns procedimentos obrigatórios de sanidade animal no âmbito do Programa de Erradicação da Brucelose na RAA, que contribuiu para fossem alargados os conhecimentos, não só sobre a doença diretamente, mas também sobre as medidas para o seu controlo.

Por fim, o desenvolvimento do estudo sobre PT na ilha de São Miguel permitiu desenvolver o espírito crítico e de responsabilidade, e permitiu que ganhasse experiência na colheita e conservação de amostras de vária natureza, assim como possibilitou o contato com os laboratórios que as processaram. O estágio extracurricular realizado no INIAV contribuiu para complementar os conhecimentos adquiridos ao longo do estágio curricular sobre PT e foi benéfico no sentido em que me permitiu conhecer a rotina e executar os principais procedimentos de um laboratório com aquela dimensão.

## 9. BIBLIOGRAFIA

- Allen, A. J. (2012). *The Merck Veterinary Manual*. Obtido em 24 de Agosto de 2014, de Production-Related Metabolic Disorders: [http://www.merckmanuals.com/vet/metabolic\\_disorders/metabolic\\_disorders\\_introduction/production-related\\_metabolic\\_disorders.html?qt=metabolic\\_disorders&alt=sh](http://www.merckmanuals.com/vet/metabolic_disorders/metabolic_disorders_introduction/production-related_metabolic_disorders.html?qt=metabolic_disorders&alt=sh)
- Angelos, J. A. (2013). *The Merck Veterinarian Manual*. Obtido em 26 de Agosto de 2014, de Overview of Infectious Keratoconjunctivitis: [http://www.merckmanuals.com/vet/eye\\_and\\_ear/infectious\\_keratoconjunctivitis/overview\\_of\\_infectious\\_keratoconjunctivitis.html?qt=moraxella\\_bovis&alt=sh](http://www.merckmanuals.com/vet/eye_and_ear/infectious_keratoconjunctivitis/overview_of_infectious_keratoconjunctivitis.html?qt=moraxella_bovis&alt=sh)
- Baumgart, D. C., & Sandborn, W. J. (2012). Crohn's disease. *Lancet*, 380, pp. 1590-605.
- Cerf, O., Griffiths, M., & Aziza, F. (2007). Assessment of the Prevalence of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in Commercially Pasteurized Milk. *Foodborne Pathogens and Disease*, 4, pp. 433-445.
- Chen, J.-W., Faisal, S. M., Chandra, S., McDonough, S. P., Moreira, M. S., Scaria, J., . . . Chang, Y.-F. (2012). Immunogenicity and protective efficacy of the Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis attenuated mutants against challenge in a mouse model. *Vaccine*, 30, pp. 3015-3025.
- Chi, J., VanLeeuwen, J. A., Weersink, A., & Keefe, G. P. (2002). Direct production losses and treatment costs from bovine viral diarrhoea virus, bovine leukosis virus, Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis, and Neospora caninum. *Preventive Veterinary Medicine*, 55, pp. 137-153.
- Chiodini, R. J. (1996). Immunology: Resistance to Paratuberculosis. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 12, pp. 313-344.
- Chiodini, R. J., & Rossitier, C. A. (1996). Paratuberculosis: A Potential Zoonosis? *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 12, pp. 457-468.
- Cho, J., Tauer, L. W., Schukken, Y. H., Gómez, M. I., Smith, R. L., Lu, Z., & Grohn, Y. T. (2012). Economic analysis of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis vaccines in dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 95, pp. 1855-1872.

- Coelho, A. C., Pinto, M. L., Silva, S., Coelho, A. M., Rodrigues, J., & Juste, R. A. (2007). Seroprevalence of ovine paratuberculosis infection in the Northeast of Portugal. *Small Ruminant Research*, 71, pp. 298-303.
- Collins, M. (2011). Diagnosis of paratuberculosis. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, 27, pp. 581-591.
- Collins, M. T. (2010). Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis and Antimicrobial Agents. Em M. A. Behr, & D. M. Collins, *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control* (1ª ed., pp. 138-143). Cambridge: CAB International.
- Collins, M. T. (2011). Food Safety Concerns Regarding Paratuberculosis. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 27, pp. 631-636.
- Collins, M. T., Wells, S. J., Petrini, K. R., Collins, E., Schultz, R. D., Whitlock, R. H., & Collins, J. E. (2005). Evaluation of Five Antibody Detection Tests for Diagnosis of Bovine Paratuberculosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12, pp. 685-692.
- Constable, P. D. (2012). *The Merck Veterinary Manual*. Obtido em 14 de Agosto de 2014, de Simple Indigestion: [http://www.merckmanuals.com/vet/digestive\\_system/diseases\\_of\\_the\\_ruminant\\_forestomach/simple\\_indigestion\\_in\\_ruminants.html?qt=indigestion&alt=sh](http://www.merckmanuals.com/vet/digestive_system/diseases_of_the_ruminant_forestomach/simple_indigestion_in_ruminants.html?qt=indigestion&alt=sh)
- Cook, K. L., & Britt, J. S. (2007). Optimization of methods for detecting Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in environmental samples using quantitative, real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 69, pp. 154-160.
- Coussens, P., Lamond, E. A., Kabara, E., & Sreevatsan, S. (2010). Host-Pathogen Interactions and Intracellular Survival of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis. Em M. A. Behr, & D. M. Collins, *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control* (1ª ed., pp. 109-120). Cambridge: CAB International.
- Dalziel, T. (1913). Chronical Intestinal Enteritis. *BMJ*.
- Decreto-Lei N.º 148/2008. (2008). *Diário da República*, 1ª Série N.º 145. Portugal.
- Decreto-Lei N.º 244/2000. (2000). *Diário da República*, I série A. Portugal.
- Decreto-Lei N.º 265/2007. (2007). *Diário da República*, 1ª série N.º 141. Portugal.
- Decreto-Lei N.º 28/96. (1996). *Diário da República*, série A. Portugal.
- Decreto-Lei N.º 314/2009. (2009). *Diário da República*, 1ª série, N.º 209. Portugal.
- Diretiva 96/23/CE Do Concelho. (1996).

- Doll, K., Sickinger, M., & Seeger, T. (2009). New aspects in the pathogenesis of abomasal displacement. *Veterinary Journal*, 181, pp. 90-96.
- Duncanson, G. R. (2013). *Farm Animal Medicine and Surgery: For Small Animal Veterinarians*. Boston: CAB International.
- Fecteau, M. E., & Whitlock, R. H. (2011). Treatment and Chemoprophylaxis for Paratuberculosis. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 27, pp. 547-557.
- Fubini, S., & Divers, T. J. (2008). Abomasal Displacement. Em T. J. Divers, & S. F. Peek, *Rebhun's Diseases of Dairy Cattle* (2<sup>a</sup> ed., pp. 156-161). St. Louis: Saunders Elsevier.
- Garcia, L. V. (2012). *Ilha de São Miguel*. Obtido em 20 de Maio de 2014, de Gosverno dos Açores: <http://www.azores.gov.pt/ext/drt-pa/ilha.aspx?id=1>
- Garry, F. (2008). Brucellosis. Em T. J. Divers, & S. F. Peek, *Rebhun's Diseases of Dairy Cattle* (2<sup>a</sup> ed., pp. 622-624). St. Louis: Saunders Elsevier.
- Garry, F. (2011). Control of Paratuberculosis in Dairy Herds. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 27, pp. 599-607.
- George, L. W., Divers, T. J., Ducharme, N., & Welcome, F. L. (2008). Mastitis. Em T. J. Divers, & S. F. Peek, *Rebhun's Diseases of Dairy Cattle* (2<sup>a</sup> ed., pp. 327-392). St. Louis: Saunders Elsevier.
- Gilbert, R. O. (2012). *Retained Fetal Membranes in Cows*. Obtido em 24 de Agosto de 2014, de The Merck Veterinary Manual: [http://www.merckmanuals.com/vet/reproductive\\_system/retained\\_fetal\\_membranes\\_in\\_large\\_animals/retained\\_fetal\\_membranes\\_in\\_cows.html?qt=fetal\\_membrane\\_retention&alt=sh](http://www.merckmanuals.com/vet/reproductive_system/retained_fetal_membranes_in_large_animals/retained_fetal_membranes_in_cows.html?qt=fetal_membrane_retention&alt=sh)
- Goff, J. P., & Horst, R. L. (1997). Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *Journal of Dairy Science*, 80, pp. 1260-1268.
- Gonda, M. G., Chang, Y. M., Shook, G. E., Collins, M. T., & Kirkpatrick, B. W. (2007). Effect of Mycobacterium paratuberculosis infection on production, reproduction, and health traits in US Holsteins. *Preventive Veterinary Medicine*, 80, pp. 103-119.
- Grungerg, W., & Constable, P. D. (2009). Simple Indigestion. Em D. E. Andreson, & M. Rings, *Current Veterinary Therapy: Food Animal Practice* (5<sup>a</sup> ed.). Saunders

- Elsevier. Obtido de [http://books.google.pt/books?id=KbrovF-skfwC&printsec=frontcover&hl=pt-PT&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](http://books.google.pt/books?id=KbrovF-skfwC&printsec=frontcover&hl=pt-PT&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)
- Hillman, R., & Gilbert, R. O. (2008). Retained Fetal Membranes. Em T. J. Divers, & S. F. Peek, *Rebhun's Diseases of Dairy Cattle* (2<sup>a</sup> ed., pp. 395-445). St. Louis: Saunders Elsevier.
- Homem, A. L. (2011). Paratuberculose Bovina: Perspectiva do Abate e Inspeção Sanitária. *Tese de Mestrado Integrago em Medicina Veterinária*, 1-22. Universidade do Porto.
- Jackson, P. G., & Cockcroft, P. D. (2002). *Clinical Examination of Farm Animals* (1<sup>a</sup> ed.). Oxfors: Blackwell Publishing.
- Johnson-Ifearulundu, Y. J., Kaneene, J. B., Sprecher, D. J., Gardiner, J. C., & Lloyd, J. W. (2000). The effect of subclinical Mycobacterium paratuberculosis infection on days open on Michigan, USA, dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine*, 46, pp. 171-181.
- Juste, R. A. (2012). Slow infection control by vaccination: paratuberculosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 46, pp. 190-196.
- Kalis, C. H., Hesselink, J. W., Barkema, H. W., & Collins, M. T. (2000). Culture of Strategically Pooled Bovine Fecal Samples as a Method to Screen Herds for Paratuberculosis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 12, pp. 547-551.
- Khare, S., Ficht, T. A., Santos, R. L., Ficht, A. R., Zhang, S., Grant, I. R., . . . Romano, J. (2004). Rapid and Sensitive Detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in Bovine Milk and Feces by a Combination of Immunomagnetic Bead Rapid and Sensitive Detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in Bovine Milk and Feces by a Comb. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, pp. 1075-7081.
- Khol, J. L., Wassertheurer, M., Sodoma, E., Revilla-Fernández, S., Damoser, J., Osterreicher, E., . . . Baumgartner, W. (2013). Long-term detection of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in individual and bulk tank milk from a dairy herd with a low prevalence of Johne's disease. *Journal of Dairy Science*, 96, pp. 3517-3524.

- Klanicova, B., Slana, I., Roubal, P., Pavlik, I., & Kralik, P. (2012). Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis survival during fermentation of soured milk products detected by culture and quantitative real time PCR methods. *International Journal of Food Microbiology*, 157, pp. 150-155.
- Kruiningen, H. J. (2011). Where are the weapons of mass destruction – the Mycobacterium paratuberculosis in Crohn's disease? *Journal of Crohn's & Colitis*, 5, pp. 638-644.
- Kudahl, A. B., & Nielsen, S. S. (2009). Effect of paratuberculosis on slaughter weight and slaughter value of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 92, pp. 4340-4346.
- Lilenbaum, W., Marassi, C. D., Varges, R., Medeiros, L., Oelemann, W. M., & Fonseca, L. S. (2009). Occurrence of false-positive results in three paratuberculosis - ELISAs performed in a tuberculous herd. *Veterinary Research Communications*, 33, pp. 693-699.
- Lombard, J. E. (2011). Epidemiology and Economics of Paratuberculosis. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 27, pp. 525-535.
- Lorenz, I., Earley, B., Gilmore, J., Hogan, I., Kennedy, E., & More, S. J. (2011). Calf health from birth to weaning. III. housing and management of calf pneumonia. *Irish Veterinary Journal*, 64, pp. 1-9.
- Lorenz, I., Fagan, J., & More, S. J. (2011). Calf health from birth to weaning. II. Management of diarrhoea in pre-weaned calves. *Irish Veterinary Journal*, 64, pp. 1-6.
- Losinger, W. C. (2005). Economic impact of reduced milk production associated with Johne's disease on dairy operations in the USA. *The Journal of Dairy Research*, 72, pp. 425-432.
- Maillard, R., Assié, S., & Douart, A. (2006). Respiratory Disease in Adult Cattle. XXIV *World Buiatrics Congress*. Nice.
- Manning, E. J., & Collins, M. T. (2010). Epidemiology of Paratuberculosis. Em Behr, M. A., & D. M. Collins, *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control* (1<sup>a</sup> ed., pp. 22-26). Cambridge: CAB International.
- Manning, E. J., & Collins, M. T. (2010). Paratuberculosis is Described. Em M. A. Behr, & D. M. Collins, *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control* (1<sup>a</sup> ed., pp. 1-9). Cambridge: CAB International.

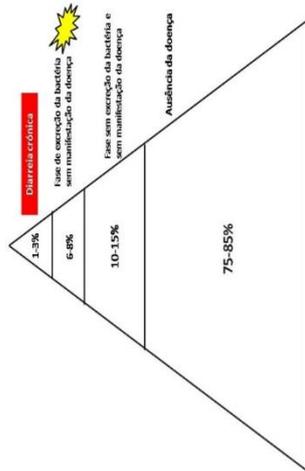
- Meadus, W. J., Gill, C. O., Duff, P., Badoni, M., & Saucier, L. (2008). Prevalence on beef carcasses of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis DNA. *International Journal of Food Microbiology*, 124, pp. 291-294.
- Mendes, S., Boinas, F., Albuquerque, T., Afonso, A., & Amado, A. (2004). Epidemiological Studies on Paratuberculosis. *Epidemiologie et Santé Animale*, 45, pp. 61-71.
- Menzies, P. I. (2011). *Pregnancy toxemia in ewes*. Obtido em 24 de Agosto de 2014, de The Merck Veterinary Manual: [http://www.merckmanuals.com/vet/metabolic\\_disorders/hepatic\\_lipidosis/pregnancy\\_toxemia\\_in\\_ewes.html?qt=pregnancy toxemia&alt=sh](http://www.merckmanuals.com/vet/metabolic_disorders/hepatic_lipidosis/pregnancy_toxemia_in_ewes.html?qt=pregnancy+toxemia&alt=sh)
- Metre, D. C., Tennant, B. C., & Whitlock, R. H. (2008). Calves. Em T. M. Divers, & S. F. Peek, *Rebuhn's Diseases of Dairy Cattle* (2<sup>a</sup> ed., pp. 200-239). St. Louis: Saunders Elsevier.
- Mutharia, L. M., Klassen, M. D., Fairles, J., Barbut, S., & Gill, C. O. (2010). *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in muscle, lymphatic and organ tissues from cows with advanced Johne's disease. *International Journal of Food Microbiology*, 136, pp. 340-344.
- Navarre, C. B. (2007). Common diseases of goats. *Proceeding of the NAVC North American Veterinary Conference*. Orlando.
- Neta, A. V., Mol, J. P., Xavier, M. N., Paixão, T. A., Lage, A. P., & Santos, R. L. (2010). Pathogenesis of bovine brucellosis. *The Veterinary Journal*, 184, pp. 146-155.
- Nicoletti, P. (2013). *Brucellosis in Cattle*. Obtido em 30 de Setembro de 2014, de The Merck Veterinary Manual: [http://www.merckmanuals.com/vet/reproductive\\_system/brucellosis\\_in\\_large\\_animals/brucellosis\\_in\\_cattle.html](http://www.merckmanuals.com/vet/reproductive_system/brucellosis_in_large_animals/brucellosis_in_cattle.html)
- Nielsen, S. S., & Toft, N. (2008). Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: a review of accuracies of ELISA, interferon-gamma assay and faecal culture techniques. *Veterinary Microbiology*, 129, pp. 217-235.
- Nielsen, S. S., & Toft, N. (2009). A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. *Preventive Veterinary Medicine*, 88, pp. 1-14.
- Nielsen, S. S., & Toft, N. (2014). Bulk tank milk ELISA for detection of antibodies to *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis: Correlation between repeated

- tests and within-herd antibody-prevalence. *Preventive Veterinary Medicine*, 113, pp. 96-102.
- OIE. (2008). OIE Terrestrial Manual.
- OIE. (2014). Paratuberculosis General Disease Information Sheets What is Paratuberculosis? General Disease Information Sheets Where is the disease found?
- Ott, S. L., Wells, S. J., & Wagner, B. A. (1999). Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. *Preventive Veterinary Medicine*, 40, pp. 179-192.
- Patton, E. A. (2011). Paratuberculosis vaccination. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, 27, pp. 573-580.
- Peek, S. F., & Divers, T. J. (2008). Ketosis: Causes, Classification and Pathophysiology. Em T. J. Divers, & S. F. Peek, *Rebuhn's Diseases of Dairy Cattle* (2ª ed., pp. 590-596). St. Louis: Saunders Elsevier.
- Peleteiro, M. C., Pinho, M., & Orvalho, J. S. (2001). *Quistos renais - bovino*. Obtido em 29 de Outubro de 2014, de Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa: [http://www.fmv.utl.pt/atlas/urinario/paginas\\_pt/urin\\_036.htm](http://www.fmv.utl.pt/atlas/urinario/paginas_pt/urin_036.htm)
- Pereira, A., Medeiros, A., Amorim, D., & Azevedo, J. P. (2012). Manual Interno Prático de Procedimentos de Inspeção Sanitária de Bovinos.
- Pinto, C. (2010). Hematúria Enzoótica Bovina: Contribuição para o seu Estudo Etiopatogénico. *Tese de Doutoramento em Ciências Veterinárias*, 1-230. Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária.
- Pinto, C., Santos, V. M., Dinis, J., Peleteiro, M. C., Fitzgerald, J. M., Hawkes, A. D., & Smith, B. L. (2005). Pithomycotoxicosis (facial eczema) in ruminants in the Azores, Portugal. *Veterinary Record*, 157, pp. 805-810.
- POSEI Vacas Leiteiras, 2013. (2013).
- Pribylova, R., Slana, I., Kralik, P., Kralova, A., Babak, V., & Pavlik, I. (2011). Correlation of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis counts in gastrointestinal tract, muscles of the diaphragm and the masseter of dairy cattle and potential risk for consumers. *International Journal of Food Microbiology*, 151, pp. 314-318.

- Radostits, O. M., Gay, C. C., Hinchcliff, K. W., & Constable, P. D. (2006). *Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, sheep, goats, pigs and horses* (10<sup>a</sup> ed.). Edinburgh: Elsevier.
- Raizman, E. A., Fetrow, J., Wells, S. J., Godden, S. M., Oakes, M. J., & Vazquez, G. (2007). The association between *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis fecal shedding or clinical Johne's disease and lactation performance on two Minnesota, USA dairy farms. *Preventive Veterinary Medicine*, 78, pp. 179-195.
- Regulamento (CE) N.º 1/2005 Do Concelho. (2005).
- Regulamento (CE) N.º 1099/2009 Do Concelho. (2009).
- Regulamento (CE) N.º 854/2004 Do Parlamento Europeu e Do Concelho. (2004). (2003). *Relatório do Estado e do Ordenamento do Território*.
- Ribas, T. (1984). *Roteiro - Portugal turístico* (1<sup>a</sup> ed.). Lisboa: Círculo de Leitores.
- Rossiter, C. A., & Burhans, W. S. (1996). Farm-Specific Approach to Paratuberculosis (John's Disease) Control. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 12, pp. 383-416.
- Santema, W., Hensen, S., Rutten, V., & Koets, A. (2009). Heat shock protein 70 subunit vaccination against bovine paratuberculosis does not interfere with current immunodiagnostic assays for bovine tuberculosis. *Vaccine*, 27, pp. 2312-2319.
- Savey, M., Cerf, O., Dufour, B., Garin-Bastiji, B., Guillotin, J., Hugot, J. P., . . . Viallard, J. (2009). *Paratuberculose des ruminants*. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments.
- Seawright, A. A. (1989). *Animal Health in Australia: Chemical and Plant Poisons* (2<sup>a</sup> ed.). Bureau of Rural Resources, Department of Primary Industries and Energy.
- Shearer, J. K., & Amstel, S. R. (2011). Lameness in Dairy Cattle. Em C. A. Risco, & P. M. Rematal, *Dairy Production Medicine* (1<sup>a</sup> ed., pp. 233-253). John Willey and Sons, Inc.
- Slana, I., Kralik, P., Kralova, A., & Pavlik, I. (2008). On-farm spread of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in raw milk studied by IS900 and F57 competitive real time quantitative PCR and culture examination. *International Journal of Food Microbiology*, 128, pp. 250-257.

- Smith, R. L., Strawderman, R. L., Schukken, Y. H., Wells, S. J., Pradhan, A. K., Espejo, L. A., . . . Gröhn, Y. T. (2010). Effect of Johne's disease status on reproduction and culling in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, *93*, pp. 3513-3524.
- Stabel, J. R. (1996). Production of Interferon by Peripheral Blood Mononuclear Cells: An Important Diagnostic Tool for Detection of Subclinical Paratuberculosis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *8*, pp. 345-350.
- Stevenson, K. (2010). Comparative Differences between Strains of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis. Em M. A. Behr, & D. M. Collins, *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control* (pp. 126-133). Cambridge: CAB International.
- Sweeney, R. W. (2011). Pathogenesis of paratuberculosis. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, *27*, pp. 537-546.
- Thomsen, V. T., Nielsen, S. S., Thakur, A., & Jungersen, G. (2012). Characterization of the long-term immune response to vaccination against Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in Danish dairy cows. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *145*, pp. 316-322.
- Weering, H., Schaik, G., Meulen, A., Waal, M., Franken, P., & Maanen, K. (2007). Diagnostic performance of the Pourquier ELISA for detection of antibodies against Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in individual milk and bulk milk samples of dairy herds. *Veterinary Microbiology*, *125*, pp. 49-58.
- Whitlock, R. H., & Buergelt, C. (1996). Preclinical and Clinical Manifestations of Paratuberculosis (Including Pathology). *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, *12*, pp. 345-356.
- Whittington, R. J. (2010). Cultivation of Mycobacterium avium subsp paratuberculosis. Em M. A. Behr, & D. M. Collins, *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control* (1<sup>a</sup> ed., pp. 244-260). Cambridge: CAB International.
- Yamasaki, E. M., Brito, M. F., Mota, R. A., Mcintosh, D., & Tokarnia, C. H. (2013). Paratuberculose em ruminantes no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, *33*, pp. 127-140.

# ANEXO 1



## Ideias-chave

A infecção ocorre predominantemente nos primeiros 6 meses de vida e o período de incubação varia de 2 a 7 anos.

Esta doença diminui a produção de leite e a vida produtiva do animal;

A via de transmissão principal é fecal-oral.

Vitelos nascidos de vacas infectadas têm maior probabilidade de desenvolver a doença.

É um problema do efectivo bovino e não apenas uma doença individual.

A propagação da doença aumenta com o tamanho da manada e quando não são implementadas medidas de controlo.

A prevenção e controlo da doença implica mudanças no manejo e na higiene alimentar das vitelas.

É importante a identificação precoce dos bovinos infetados por rastreio serológico.

Refúgio imediato dos bovinos com diarréia crónica.

Não existe tratamento.

## PARATUBERCULOSE



### O que é a doença e como se controla?

### O que é a doença?

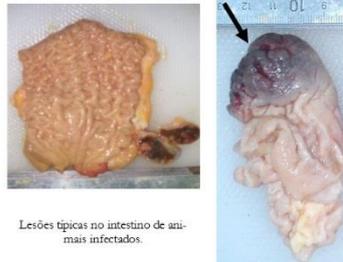
- É causada por uma bactéria de nome *Mycobacterium avium subs. paratuberculosis*;
- A bactéria é caracterizada pelo longo período de incubação, durante o qual os animais não manifestam sintomas, embora já estejam infetados.



Aspecto de animal com paratuberculose: emagrecimento acentuado e diarréia. (zona perianal e cauda sujas com fezes)

### Sintomas

- Manifestam-se entre os dois e sete anos de idade.
- **Diarréia crónica** sem muco e sem sangue;
- O apetite do animal e temperatura rectal normais.
- Perda progressiva da massa muscular e da condição corporal.



Lesões típicas no intestino de animais infetados.

### Perdas económicas

- Quebra na produção de leite superior a 20%;
- Gastos com medicação e assistência veterinária sem sucesso;
- Rejeição total da carcaça por magreza extrema;
- Por cada animal doente estima-se perda de 18 a 22 euros por ano em diminuição da produção.

### Controlo: objetivos

- Identificação dos animais infetados: análise ao sangue e/ou fezes.
- Prevenção das novas infeções: melhoramento da higiene na exploração e evitar introdução de novos animais não rastreados.

Princípios	Medidas a tomar
Minimizar os contactos entre os vitelos e outros bovinos adultos e materiais contaminados com fezes.	Limpeza da maternidade e dos parques dos vitelos após cada utilização Separação do vitelo imediatamente após o parto Alimentação dos vitelos com colostro de vacas seronegativas Utilizar leite pasteurizado ou leite de substituição Fazer recria separadamente dos animais adultos até ao ano de idade Evitar a partilha de fontes de água por jovens e adultos Evitar o trânsito de pessoal entre as áreas ocupadas por adultos e jovens.
Prevenir a contaminação fecal de água e alimento.	Utilizar equipamento diferente para manusear o alimento e o estume; Manutenção dos comedouros e bebedouros limpos e livres de fezes; Evitar o pastoreio de bovinos jovens em pastagens fertilizadas com estume.
Reduzir a exposição da exploração ao microorganismo.	Eliminar os animais com diarréia crónica Testar todos os bovinos adultos pelo menos uma vez por ano; Evitar introduzir bovinos provenientes da exploração com estatuto sanitário desconhecido para esta doença.

## ANEXO 2

Questionário n.º: \_\_\_\_

Data da visita à exploração: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

### DADOS DA EXPLORAÇÃO

#### 1. Dados relativos ao produtor

N.º da exploração	
Nome do produtor	
N.º telefone	
Morada	

#### 2. Dados relativos exploração

Tipo de Exploração:  Móvel  Fixa

Separação dos animais por grupos etários?  Sim  Não

Caracterização da manada:

Grupo etário	Número de animais	Área disponível (alq)
Vitelos lactentes		
Vitelos após desmame		
Novilhas		
Vacas		
TOTAL		

#### 3. Maneio profilático

##### Desparasitação

Desparasitação a todos grupos etários?  Sim  Não

Se não, quais são? \_\_\_\_\_

Qual o desparasitante utilizado? \_\_\_\_\_

Frequência das desparasitações: \_\_\_\_\_ (vezes por ano)

Intervalo de tempo entre desparasitações: \_\_\_\_\_

### Vacinação

Quais as doenças para as quais são vacinados os animais: \_\_\_\_\_

Vacinação a todos grupos etários?  Sim  Não

Se não, quais são? \_\_\_\_\_

Frequência das vacinações: \_\_\_\_\_

### **4. Maneio alimentar**

Qual o tipo de alimentação e quais as quantidades fornecidas aos animais (selecionar com um X os alimentos):

Grupos etários	Pastagem	Silagem	Concentrado	Palha/Feno
Vitelos após desmame				
Novilhas				
Vacas				

Tipo de culturas da pastagem: \_\_\_\_\_

Área total de pastagem:

Grupos etários	Área
Vitelos após desmame	
Novilhas	
Vacas	

Existem épocas de carências alimentares?  Sim  Não

Se sim, quais são? \_\_\_\_\_

### **5. Dados relativos à doença**

Existem casos de diarreias crónicas?  Sim  Não

Casos confirmados de paratuberculose? \_\_\_\_\_

## **QUESTIONÁRIO**

### **1. Maneio da maternidade**

1. Utilização do parque por vários animais?
  - a. Sim
  - b. Não
2. Higiene da maternidade. Possível infecção dos vitelos?
  - a. Maternidade muito suja
  - b. Maternidade suja
  - c. Maternidade limpa
3. A maternidade é utilizada também como enfermaria?
  - a. Sim
  - b. Não
4. Foram colocadas vacas suspeitas ou confirmadas com paratuberculose nesta área?
  - a. Sim
  - b. Não
5. Grau de conspurcação dos úberes e membros pélvicos
  - a. Nenhuma
  - b. Mínima
  - c. Moderada
  - d. Considerável
  - e. Excessiva (tetos, úbere e membros pélvicos cobertos de fezes)
6. Os partos ocorrem em áreas normalmente habitadas por vacas?
  - a. Sim
  - b. Não
7. Quantos horas após o parto são separados os vitelos das mães? \_\_\_\_\_

## 2. Maneio dos vitelos lactentes (pré-desmame)

1. Que tipo de colostro é fornecido ao vitelo?
  - a. Da mãe
  - b. Proveniente de um banco de colostro (constituído por colostro de vários animais)
  - c. Apenas de novilhas até á segunda lactação
2. Que tipo de leite é fornecido aos vitelos?
  - a. Da mãe
  - b. De vacas em tratamento
  - c. De um banco de leite (constituído por leite de vários animais)
  - d. Leite do tanque
  - e. Leite do tanque e pasteurizado
  - f. Leite em pó
3. Os vitelos lactentes estão em contacto direto com vacas adultas?
  - a. Sim
  - b. Não
4. Existe contacto dos vitelos com o estrume/chorume de vacas adultas?
  - a. Sim
  - b. Não
5. Probabilidade de contaminação da água/alimento dos vitelos por estrume/chorume?
  - a. Alta
  - b. Moderada
  - c. Baixa
6. Os vitelos encontram-se numa pastagem anteriormente ocupada por vacas adultas?
  - a. Nunca
  - b. Ocasionalmente
  - c. Frequentemente
  - d. Sempre

### 3. Maneio dos animais no pós-desmame

1. As bezerras compartilham do mesmo pasto que as vacas adultas/encontram-se nas mesmas instalações?
  - a. Sim
  - b. Não
2. É colocado estrume/chorume proveniente das vacas na pastagem onde se encontram as bezerras?
  - a. Sim
  - b. Não
3. Existe probabilidade da água/alimento das novilhas ser contaminado por estrume/chorume?
  - a. Sim
  - b. Não

### 4. Aquisição de animais de outras explorações

1. É frequente a aquisição de animais de reposição provenientes de outras explorações?
  - a. Nunca
  - b. Ocasionalmente
  - c. Frequentemente
  - d. Sempre
2. É conhecido o estado sanitário da exploração de origem dos bovinos adquiridos?
  - a. Sim
  - b. Não
3. São testados para paratuberculose?
  - a. Sim
  - b. Não

### Hábitos do produtor

É consumidor de leite cru?

Sim

Não