

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

U LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA



ESTUDO RETROSPETIVO SOBRE A PREVALÊNCIA DE PARATUBERCULOSE EM
EFETIVOS DE BOVINOS DE CARNE DO ALENTEJO

ANA FILIPA TARECO PEREIRA

ORIENTADOR:

Dr. Rui Martins

COORIENTADOR:

Doutor George Thomas Stilwell

2024

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

U LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA



ESTUDO RETROSPETIVO SOBRE A PREVALÊNCIA DE PARATUBERCULOSE EM
EFETIVOS DE BOVINOS DE CARNE DO ALENTEJO

ANA FILIPA TARECO PEREIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JÚRI

PRESIDENTE:

Doutor Fernando Jorge Silvano Boinas

VOGAIS:

Doutor George Thomas Stilwell

Doutor José Ricardo Dias Bexiga

ORIENTADOR:

Dr. Rui Martins

COORIENTADOR:

Doutor George Thomas Stilwell

2024

DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Nome: Ana Filipa Tareco Pereira

Título da Tese ou Dissertação: ESTUDO RETROSPETIVO SOBRE A PREVALÊNCIA DE PARATUBERCULOSE EM EFETIVOS DE BOVINOS DE CARNE DO ALENTEJO

Ano de conclusão (indicar o da data da realização das provas públicas): 2024

Designação do curso de

Mestrado ou de

Doutoramento: Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Área científica em que melhor se enquadra (assinale uma):

- Clínica Produção Animal e Segurança Alimentar
 Morfologia e Função Sanidade Animal

Declaro sobre compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto (assinale um):

- Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
- Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de 6 meses, 12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial*;

* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar uma das seguintes declarações (incluir apenas uma das três):

- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE/TRABALHO (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
- DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 19 de Abril de 2024

(indicar aqui a data da realização das provas públicas)

Assinatura: Ana Filipa Pereira

Agradecimentos

Primeiramente quero agradecer aos meus pais pelos ensinamentos e valores que me transmitiram e por me apoiarem nos momentos complicados e não me fazerem desistir do sonho. Ao meu irmão, que apesar de longe sempre esteve presente.

Expresso a minha gratidão ao Professor George Stilwell por ter aceitado coorientar-me nesta jornada, pelo tempo e conhecimento.

Ao Dr. Rui Martins não só por ter aceitado orientar o meu estágio, mas também o apoio, ensinamentos, confiança, gargalhas e amizade.

Um agradecimento especial a todos os auxiliares e médicos veterinários do Hospital Veterinário Muralha de Évora. Sei que criei amizades que levarei comigo para sempre.

Não posso esquecer a minha colega de estágio, Paula, pois acho que não poderia ter pedido melhor.

À Dr^a. Teresa Rosa pelo apoio incondicional e pela amizade, por me ouvir e por todos os conselhos.

Ao Dr. Tomé Fino e restante equipa da Equimuralha por tão bem me receberem e me mostrarem o mundo da veterinária equina.

Ao Professor Telmo Nunes pelo tempo, ajuda e sugestões para complementar esta dissertação.

Aos meus avós, José, Antónia, Maria e António.

Ao João por todo o amor e paciência.

Como os últimos são sempre os primeiros, um enorme agradecimento às minhas colegas de curso, Adriana, Ana Carolina, Ana Margarida, Daniela, Francisca, Renata e Tatiana. Por todo o apoio, alegria e memórias criadas, pois sem elas esta aventura não teria sido a mesma coisa.

Resumo

ESTUDO RETROSPECTIVO SOBRE A PREVALÊNCIA DE PARATUBERCULOSE EM EFETIVOS DE BOVINOS DE CARNE DO ALENTEJO

A Paratuberculose é uma enterite granulomatosa crónica incurável em ruminantes provocada pela micobactéria *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* caracterizada por um longo período de incubação e síndrome de má absorção com perda de peso gradual, diarreia intermitente, hipoproteinémia e desenvolvimento de edema submandibular. A transmissão ocorre por via fecal-oral e transplacentária, sendo o agente também excretado no colostro e leite. A disseminação da doença e as perdas económicas associadas (refugo precoce, menor produtividade animal) terão tendência a aumentar na inexistência de controlo, no entanto este é difícil. Os objetivos do presente trabalho são evidenciar, através de um estudo retrospectivo e cálculo de prevalência, a presença da doença nos efetivos de bovinos de carne em extensivo na área de ação do Hospital Veterinário Muralha de Évora nos distritos de Évora e Beja entre 2008 e 2022. A prevalência individual verdadeira foi de 20%, superior aos valores estimados para os bovinos de carne. Das explorações incluídas, 42% foram consideradas infetadas e a maioria das prevalências aparentes nos efetivos testados encontraram-se perto ou dentro de valores considerados moderados (6 a 19%). Foram incluídos 7 dos 14 concelhos do distrito de Évora onde 6 foram positivos. A primavera foi associada a uma maior chance de positividade para Paratuberculose nos casos suspeitos, porém os anos de seca revelaram uma redução da mesma chance nos casos gerais. A média de idade dos animais positivos foi de 5,9 anos, onde as idades destes e dos animais não positivos foram significativamente diferentes, com uma maior chance de positividade com o avançar da idade. Os sinais clínicos predominantes nos animais testados foram a diarreia crónica e caquexia. As idades e quadros clínicos apresentados foram compatíveis com a doença e a existência de animais positivos com menos de 3 anos sugere uma elevada pressão de infeção. O ELISA indireto em soro sanguíneo, teste mais utilizado, é imperfeito e insuficiente para alcançar o controlo. Por não existir um plano de controlo oficial foi realizado um inquérito aos produtores de modo a perceber o seu interesse num plano desta natureza. Os produtores mostraram-se interessados, tendo como principal motivo para o controlo a Saúde Animal. Elaborou-se uma sugestão de plano de controlo para a Paratuberculose, encontrando-se este dividido em três fases: caracterização da exploração e testagem do efetivo, avaliação de risco e criação do plano sanitário. Os resultados sugerem um cenário de subdiagnóstico de Paratuberculose e uma necessidade de mais estudos de prevalência em bovinos de carne.

Palavras-chave: Bovino de carne; *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis*; Paratuberculose; Plano de controlo; Prevalência

Abstract

RETROSPECTIVE STUDY OF THE PREVALENCE OF PARATUBERCULOSIS IN BEEF CATTLE HERDS IN ALENTEJO

Paratuberculosis is an incurable chronic granulomatous enteritis in ruminants caused by *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. The disease is characterized by a long incubation period and a malabsorption syndrome with gradual weight loss, intermittent diarrhea, hypoproteinemia, and development of submandibular edema. Transmission occurs through the fecal-oral and transplacental routes. This pathogen is also excreted in colostrum and milk. The spread of the disease and associated economic losses (early culling, lower animal productivity) will tend to increase in the absence of control measures, but control can be challenging. The objectives of the present work are to highlight, through a retrospective study and prevalence calculation, the presence of the disease in beef cattle in pasture-based production systems herds in the area of action of the Hospital Veterinário Muralha de Évora in the districts of Évora and Beja between the years 2008 and 2022. The true individual prevalence was 20%, higher than the estimated values for beef cattle. Of the included farms, 42% were considered infected, and most of the apparent prevalences for the herds tested were close or within the moderate values (6 to 19%). Farms from 7 of the 14 municipalities in the Évora district were investigated, where 6 out of these 7 municipalities were positive. Spring was associated with a higher chance of positivity of suspected animals, but in the years of drought a decrease in the chance of positivity of general cases was observed. The mean age of the positive animals was 5,9 years, and the ages of positive and non-positive animals were significantly different, with a greater chance of positivity at an older age. The predominant clinical signs in tested animals were chronic diarrhea and cachexia. The ages and clinical signs were compatible with the disease. The existence of positive animals under 3 years old suggests a high pressure of infection. Indirect ELISA in blood serum was the most common test, but it is imperfect and insufficient to achieve control. Due to the lack of an official control plan, a survey was carried out to determine farmers' interest in the matter. Farmers were interested and the main reason for control was Animal Health. A suggestion for a Paratuberculosis control plan was elaborated, divided into three phases: herd characterization and herd testing, risk assessment, and creation of a health plan. These results are suggestive of an underdiagnosis scenario of Paratuberculosis and a need for further prevalence studies in beef cattle.

Key Words: Beef cattle; Control programme; *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*; Paratuberculosis; Prevalence

Índice

| | |
|---|------|
| Agradecimentos | iii |
| Resumo..... | iv |
| Abstract..... | v |
| Índice de figuras..... | viii |
| Índice de gráficos | ix |
| Índice de tabelas | x |
| Lista de Abreviaturas..... | xii |
| 1. Introdução..... | 1 |
| 1.1. Relatório de estágio | 1 |
| 2. Revisão bibliográfica..... | 4 |
| 2.1. Caracterização do agente etiológico | 4 |
| 2.2. Epidemiologia | 5 |
| 2.3. Transmissão | 6 |
| 2.4. Fisiopatogenia..... | 9 |
| 2.5. Sinais clínicos e aspetos anatomo-histopatológicos..... | 10 |
| 2.6. Efeito iceberg | 11 |
| 2.7. Diagnóstico diferenciais | 11 |
| 2.8. Diagnóstico | 12 |
| 2.8.1. Métodos diretos..... | 13 |
| 2.8.2. Métodos indiretos..... | 14 |
| 2.8.3. Outros métodos..... | 16 |
| 2.9. Tratamento..... | 16 |
| 2.10. Impacto económico | 17 |
| 2.11. Saúde Pública..... | 18 |
| 2.12. Prevenção e Controlo..... | 18 |
| 3. Estudo retrospectivo sobre a prevalência de Paratuberculose em efetivos de bovinos de carne do Alentejo | 24 |
| 3.1. Objetivos..... | 24 |
| 3.2. Material e Métodos..... | 24 |
| 3.2.1. Estudo retrospectivo sobre a prevalência de Paratuberculose em efetivos de bovinos de carne do Alentejo | 24 |
| 3.2.2. Estudo de caso de uma exploração considerada infetada com Paratuberculose | 26 |
| 3.2.3. Elaboração de uma sugestão de um plano de controlo de Paratuberculose em explorações de bovinos de carne em regime extensivo | 27 |
| 3.3. Resultados | 28 |

| | | |
|--------|--|----|
| 3.3.1. | Estudo retrospectivo sobre a prevalência de Paratuberculose em efetivos de bovinos de carne do Alentejo | 28 |
| 3.3.1. | Estudo de caso de uma exploração considerada infetada com Paratuberculose | 35 |
| 3.3.2. | Elaboração de uma sugestão de um plano de controlo de Paratuberculose em explorações de bovinos de carne em regime extensivo | 36 |
| 3.4. | Discussão | 55 |
| 3.4.1. | Estudo retrospectivo sobre a prevalência de Paratuberculose em efetivos de bovinos de carne do Alentejo | 55 |
| 3.4.1. | Estudo de caso de uma exploração considerada infetada com Paratuberculose | 61 |
| 4. | Conclusão | 67 |
| 5. | Referências bibliográficas | 68 |
| Anexos | | 75 |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Iceberg da Paratuberculose (fonte: Coelho e Rodrigues 2007; Savey et al. 2009) | 11 |
| Figura 2. Países participantes no estudo de Whittington et al. (2019) com um plano de controlo para a PT (fonte: Whittington et al. 2019) | 19 |
| Figura 3. Vaca positiva para PT com perda de peso crónica (A) e diarreia profusa (B) (original) | 35 |

Índice de gráficos

| | |
|--|----|
| Gráfico 1. Principais espécies alvo de intervenção durante o estágio no Departamento de Animais de Produção do HVME | 2 |
| Gráfico 2. Evolução das respostas imunitárias celular e humoral e da excreção fecal de MAP durante a progressão da infeção (fonte: Rosseels e Huygen 2008) | 12 |
| Gráfico 3. Distribuição anual dos resultados dos animais testados para PT pedidas pelo HVME entre os anos de 2008 e 2022 (n=951)..... | 29 |
| Gráfico 4. Distribuição dos resultados de testagem para PT nos distritos de Évora (A) e Beja (B) de acordo com o tipo de ano (normal/chuva fraca ou seca)..... | 30 |
| Gráfico 5. Mapa de prevalência de Paratuberculose na área de ação do HVME nos distritos de Évora e Beja (concelhos a branco: sem dados de testagem no período estudado)..... | 32 |

Índice de tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Áreas desenvolvidas durante o estágio no Departamento de Animais de Produção do HVME..... | 2 |
| Tabela 2. Motivos de consulta registados durante o estágio em clínica de animais de produção no HVME..... | 2 |
| Tabela 3. Motivos de consulta organizados por sede da patologia correspondentes ao estágio em clínica de equinos..... | 3 |
| Tabela 4. Resultados das análises para a PT entre os anos de 2008 e 2022 organizados por tipo de testagem (n=951) | 28 |
| Tabela 5. Prevalência aparente e verdadeira de PT por categoria de testagem (PA: prevalência aparente; PV: prevalência verdadeira; IC: intervalo de confiança)..... | 28 |
| Tabela 6. Prevalência aparente e verdadeira de PT dentro dos efetivos completos testados (PA: Prevalência aparente; PV: Prevalência verdadeira; IC: intervalo de confiança)..... | 29 |
| Tabela 7. Distribuição dos animais testados e dos resultados positivos para PT de acordo com as estações do ano | 30 |
| Tabela 8. Resultados para PT por tipo de análise (n=956)..... | 32 |
| Tabela 9. Distribuição dos resultados de testagem para PT (negativo, positivo e duvidoso) de acordo com o intervalo de idades em anos (n=112)..... | 33 |
| Tabela 10. Sinais clínicos e/ou observações reportados pelos animais suspeitos testados para PT (n=34) (A) e reportados pelos animais suspeitos seropositivos (n=7) (B)..... | 33 |
| Tabela 11. Distribuição dos resultados da testagem para PT de acordo com o intervalo de idades em anos nos animais com idade e quadro clínico determinado (n=27) | 34 |
| Tabela 12. Quadro clínico apresentado pelos animais suspeitos a PT com idade determinada (n=27) (A) e pelos animais suspeitos positivos com idade determinada (n=6) (B)..... | 34 |
| Tabela 13. Resultados o inquérito um Plano de Vigilância, Controlo e Erradicação de PT...36 | |
| Tabela 14. Medidas de manejo para controlo de PT na fase de Parto..... | 38 |
| Tabela 15. Medidas de manejo para controlo de PT na fase de Criação do bezerro | 39 |
| Tabela 16. Medidas de manejo para controlo de PT na fase de Bezerro pós-desmame | 39 |
| Tabela 17. Medidas de manejo para controlo de PT na fase de Bovinos com mais de 1 ano (animais de substituição)..... | 40 |
| Tabela 18. Medidas de manejo do alimento e fontes de água para controlo de PT | 42 |
| Tabela 19. Medidas de manejo das pastagens para controlo de PT..... | 43 |
| Tabela 20. Aplicação da sugestão de plano de controlo para a Paratuberculose: Caracterização da exploração | 45 |
| Tabela 21. Aplicação da sugestão de plano de controlo para a Paratuberculose: Perda de produtividade nos últimos 5 anos, História pregressa de Paratuberculose na exploração e Animais introduzidos | 46 |

| | |
|--|----|
| Tabela 22. Aplicação da sugestão de plano de controlo para a Paratuberculose: Cálculo da prevalência..... | 47 |
| Tabela 23. Aplicação da sugestão de plano de controlo para a Paratuberculose: Avaliação de Risco – Parto..... | 47 |
| Tabela 24. Aplicação da sugestão de plano de controlo para a Paratuberculose: Avaliação de Risco – Criação de bezerros | 48 |
| Tabela 25. Aplicação da sugestão de plano de controlo para a Paratuberculose: Avaliação de Risco – Bezerros pós-desmame..... | 49 |
| Tabela 26. Aplicação da sugestão de plano de controlo para a Paratuberculose: Avaliação de Risco – Bovinos com mais de 1 ano de idade | 49 |
| Tabela 27. Aplicação da sugestão de plano de controlo para a Paratuberculose: Avaliação de Risco – Bovinos com mais de 2 anos de idade | 50 |
| Tabela 28. Aplicação da sugestão de plano de controlo para a Paratuberculose: Avaliação de Risco – Animais introduzidos..... | 51 |
| Tabela 29. Aplicação da sugestão de plano de controlo para a Paratuberculose: Avaliação de Risco – tabela resumo..... | 51 |
| Tabela 30. Comparação entre as prevalências individuais aparente e verdadeira para PT calculadas e referidos na literatura..... | 56 |
| Tabela 31. Comparação dos resultados do inquérito feito aos produtores relativamente à aplicação de um Plano de Controlo, Vigilância e Erradicação de Paratuberculose com os dados das publicações de Whittington et al. (2019) e Zoche-Golob et al. (2021)..... | 61 |
| Tabela 32. Número de animais infetados de acordo com o número de animais com PT clínica segundo Fecteau (2018) e respetiva classificação como verdadeiros positivos (VP), falsos positivos (FP), verdadeiros negativos (VN) e falsos negativos (FN) pelos valores de Sen (48,5%) e Spe (98,9%) atribuídos por Diéguez et al. (2007)..... | 65 |

Lista de Abreviaturas

AAR Álcool-ácido resistência

AGID Imunodifusão em agar gel

BID *Bis in die* (duas vezes ao dia)

BVD Diarreia Viral Bovina

°C Graus Celsius

CHeCS *Cattle Health Certification Standards*

DC Doença de Crohn

DD Diagnósticos diferenciais

DGAV Direção Geral de Agricultura e Veterinária

DJ Doença de Johne

DP Desvio padrão

ELISA Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EUA Estados Unidos da América

FC Fixação de complemento

FN Falso negativo

FP Falso positivo

HVME Hospital Veterinário Muralha de Évora

IBR Rinotraqueíte Infeciosa Bovina

IC Intervalo de confiança

IDTC Intradermotuberculinação de comparação

IFN- γ Interferão Gama

kg Quilograma

MAP *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis*

med Mediana

mg Miligrama

ml Mililitro

OPSA Organizações de Produtores para a Sanidade Animal

OR Odds Ratio

PA Prevalência aparente

PB Parque de bezerros desmamados

PCR *Polymerase Chain Reaction*

PD Parque de desmame

PG Parque de gestantes
PISA Programa Informático de Saúde Animal
PNG Parque de não gestantes
PO *Per os*
PP Parque de partos
PPD Extrato proteico purificado
PR Parque de refugio
PS Parque de animais de substituição
PT Paratuberculose
PV Prevalência verdadeira
Sen Sensibilidade
SID *Semel in diei* (uma vez ao dia)
Spe Especificidade
TB Tuberculose bovina
TE Transferência de embriões
VN Verdadeiro negativo
VP Verdadeiro positivo
WOAH Organização Mundial da Saúde Animal/World Organisation for Animal Health
ZN Ziehl-Nielsen

1. Introdução

Esta dissertação de mestrado foi realizada no cumprimento do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, com principal objetivo de alertar para a presença de Paratuberculose em bovinos de carne em regime extensivo e para a necessidade de colocação desta doença na lista de doenças prioritárias para a Saúde e Bem-Estar Animal. Ao longo do documento o leitor irá encontrar o relatório do Estágio Curricular, seguido de uma revisão bibliográfica sobre o tema, materiais e métodos, resultados e discussão, onde estarão incluídas a caracterização da doença nas áreas de intervenção do Hospital Veterinário Muralha de Évora nos distritos de Évora e Beja, a descrição de um caso referente a uma exploração considerada infetada e uma sugestão de um plano de controlo da doença, seguidas pelas respetivas conclusões.

1.1. Relatório de estágio

No contexto do plano de estudos do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, o estágio curricular foi realizado no Hospital Veterinário Muralha de Évora (HVME) e na Equimuralha nas áreas de Clínica de Animais de Produção e Clínica de Equinos, respetivamente. O estágio curricular teve a duração de seis meses, compreendido entre os dias 1 de setembro de 2022 e 2 de março de 2023, contemplando um total de 1256 horas. O período de estágio dividiu-se em dois momentos: os primeiros quatro meses no Departamento de Animais de Produção do HVME (1 de setembro a 31 de dezembro de 2022; 864 horas) e os restantes dois meses na Equimuralha (2 de janeiro a 2 de março de 2023; 392 horas). O HVME, sediado em Évora, possui, além do departamento de Animais de Produção, um departamento de Clínica de Animais de Companhia e de Clínica de Equinos (Equimuralha). O departamento de Animais de Produção do HVME apresenta uma vasta área de atuação, não só por todo o Alentejo como também Ribatejo, Lisboa e Vale do Tejo e Algarve oferecendo serviços de profilaxia médica e sanitária, consultas, urgências, cirurgia e reprodução. A Equimuralha é o parceiro do HVME especializado em equinos, oferecendo serviços por todo o país desde consultas, urgências, cirurgia, reprodução, neonatologia, profilaxia médica, dentisteria, exames em ato de compra, exames de locomotor, reabilitação e fisioterapia.

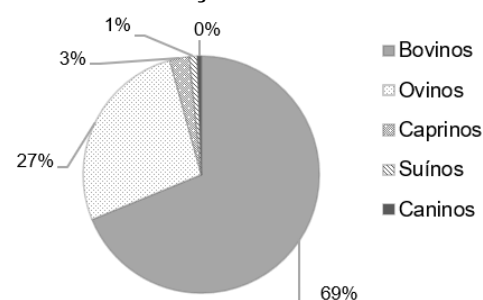
A primeira parte do estágio, no departamento de Animais de Produção do HVME, sob orientação do Dr. Rui Martins, permitiu à autora acompanhar os diferentes membros da equipa em serviços de profilaxia e clínica (Tabela 1) maioritariamente de ruminantes (Gráfico 1), havendo também algum contacto com as espécies suína e canina. Foram acompanhados diversos serviços OPSA (Organizações de Produtores para a Sanidade Animal), como saneamentos e testes de pré-movimentação. Dentro da área da profilaxia foram realizadas várias atividades de desparasitação (orais e sistémicas) e de vacinação que incluíram: para a

febre catarral ovina/língua azul (Syvazul[®]) em ovinos, para clostridioses (Multivac 9[®], Heptavac[®] P Plus, Bravoxin 10[®]), em pequenos ruminantes e bovinos; para peeira em ovinos (Footvax[®]); para imunização ativa de vacas e novilhas em gestação avançada de forma a elevar o nível de anticorpos contra os agentes de diarreias neonatais em bovinos (Bovilis[®] Rotavec[®] Corona); programa Bovicare para controlo de rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) e diarreia viral bovina (BVD) (Hiprabovis[®] Balance, Bovilis[®] IBR viva marcada); contra a doença respiratória bovina (Bovilis[®] Bovipast[®] RSP); entre outras. A participação em serviços OPSA possibilitou à autora um maior conhecimento e familiarização com o *software* Programa Informático de Saúde Animal (PISA). A autora participou ainda em diversas visitas reprodutivas de bovinos onde se realizaram protocolos de sincronização para inseminação artificial a tempo fixo, acompanhamento reprodutivo, diagnósticos de gestação e exames andrológicos.

Tabela 1. Áreas desenvolvidas durante o estágio no Departamento de Animais de Produção do HVME

| Área | Frequência absoluta |
|--------------|---------------------|
| Clínica | 208 |
| Profilaxia | 86 |
| Serviço OPSA | 45 |
| Reprodução | 30 |
| Cirurgia | 3 |

Gráfico 1. Principais espécies alvo de intervenção durante o estágio no Departamento de Animais de Produção do HVME



Relativamente à área de clínica, foram presenciadas consultas/urgências em que a maioria dos estímulos iatrotópicos classificaram-se com sede no aparelho digestivo, nomeadamente as diarreias neonatais, seguidas pelo aparelho reprodutor e respiratório (Tabela 2).

Tabela 2. Motivos de consulta registados durante o estágio em clínica de animais de produção no HVME

| Motivos de consulta | Frequência absoluta | Motivos de consulta | Frequência absoluta |
|-----------------------|---------------------|---------------------------------|---------------------|
| Aparelho digestivo | 56 | Alterações cutâneas | 7 |
| Aparelho reprodutor | 30 | Neonatologia | 7 |
| Aparelho respiratório | 18 | Processos infecciosos | 7 |
| Aparelho locomotor | 16 | Glândula mamária | 4 |
| Doenças metabólicas | 12 | Traumas | 3 |
| Morte súbita | 11 | Alterações de condição corporal | 1 |
| Doenças infecciosas | 10 | Intoxicações | 1 |
| Sistema nervoso | 8 | Sistema cardiovascular | 1 |

A segunda parte do estágio, na área da clínica de equinos, realizou-se na Equimuralha onde a autora acompanhou o Dr. Tomé Fino e a restante equipa em regime ambulatorio e também em alguns casos de internamento que exigiram cuidados mais intensivos. Todas as segundas-feiras existiu uma reunião de equipa para passagem de casos da semana anterior e preparação das consultas da semana. As consultas de aparelho locomotor foram as mais presentes, onde se realiza o exame de locomoção que inclui o exame estático e dinâmico do animal, radiografia, ecografia e bloqueio anestésico para determinação da origem da claudicação. A reabilitação de equinos com lesões músculo-esqueléticas também esteve bastante presente ao longo do estágio, onde existe o recurso a terapia laser, electroestimulação e técnicas alternativas como a acupuntura. Em termos de urgência, a cólica foi a mais presenciada. As atividades de profilaxia, dentisterias, traumas, exames de compra e cirurgia de tecidos moles também estiveram bastante presentes no dia-a-dia (Tabela 3).

Tabela 3. Motivos de consulta organizados por sede da patologia correspondentes ao estágio em clínica de equinos

| Motivo de consulta | Frequência absoluta |
|-----------------------------|----------------------------|
| Profilaxia | 28 |
| Aparelho locomotor | 26 |
| Sistema muscular | 20 |
| Trauma | 13 |
| Cavidade oral | 12 |
| Aparelho digestivo | 9 |
| Aparelho reprodutor | 6 |
| Exame em ato de compra | 4 |
| Cirurgia de tecidos moles | 3 |
| Alterações cutâneas | 2 |
| Maneio da dor | 2 |
| Neonatologia | 2 |
| Necropsia | 2 |
| Transfusão de sangue/plasma | 2 |

2. Revisão bibliográfica

2.1. Caracterização do agente etiológico

A Paratuberculose (PT) ou Doença de Johne (DJ) é caracterizada por uma enterite granulomatosa crônica incurável em ruminantes (Arsenault et al. 2014; Behr et al. 2020), tanto domésticos como selvagens (Smith et al. 2020), provocada pela micobactéria *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* (MAP) (Spickler 2017). As estirpes de MAP podem ser divididas de acordo com a preferência de hospedeiro: tipo I ou S (pequenos ruminantes) e tipo II ou C (bovinos), apesar de ambas infetarem outras espécies (Spickler 2017). As micobactérias são bacilos Gram positivos não flagelados (Mcvey et al. 2013), no entanto são frequentemente resistentes a esta coloração. Na aplicação da coloração *Ziehl-Nielsen* (ZN) coram de vermelho (Coelho e Rodrigues 2007) revelando álcool-ácido resistência (AAR) (Mcvey et al. 2013) devido à sua parede rica em lípidos (Mcvey et al. 2013). Esta parede tem tendência a formar aglomerados de células, permitindo ao MAP sobreviver em condições menos favoráveis (Lombard 2011). As micobactérias são mesófilas (Coelho e Rodrigues 2007) e aeróbias de crescimento lento (Willey et al. 2014), produzindo sideróforos (micobactinas) em condições deficientes em ferro (Coelho e Rodrigues 2007), elemento necessário à sua replicação (Lombard 2011). Esta é produzida *in vitro* pela maioria das micobactérias, mas não pelo MAP havendo a necessidade da sua adição aos meios de cultura e esta característica, apesar de não ser exclusiva do MAP, tem sido usada na sua identificação (Coelho e Rodrigues 2007). O MAP apresenta uma elevada capacidade de sobrevivência ambiental (Spickler 2017) resistindo mais do que um ano nas pastagens e até dois anos nas fontes de água (Spickler 2017). O microrganismo é resistente ao calor, tendo-se mostrado resistente à pasteurização de alta temperatura e tempo curto (72°C durante 15 segundos) se presente em número suficiente no leite cru (Lombard 2011). Todavia, a pasteurização do colostro a 60°C por 60 minutos está demonstrada suficiente para eliminar o MAP na maioria das condições e o agente não foi detetado em amostras de leite de descarte identificadas como infetadas após 30 minutos a 65,6°C (Lombard 2011). Os desinfetantes não o inativam rapidamente, pois a ação destes é bloqueada pela presença de fezes ressequidas havendo a necessidade de humidificação prévia (Coelho e Rodrigues 2007). Por outro lado, a luz do sol direta, a radiação ultravioleta (Lombard 2011) e a secagem decrescem a sua sobrevivência (Coelho e Rodrigues 2007). Quando no ambiente, o MAP permanece nas camadas superficiais do solo constituindo um potencial perigo para os animais em pastoreio (Field et al. 2022).

A PT tem sido cada vez mais diagnosticada em bovinos nos últimos anos, principalmente devido ao maior movimento de animais e à intensificação da produção (Otter e Cranwell 2007). A PT não está incluída na lista de doenças de declaração obrigatória nacional (Ministério da Agricultura 1989), mas pertence à lista homóloga da Organização

Mundial da Saúde Animal (WOAH). A Lei da Saúde Animal classifica a PT como uma doença de categoria E, requerendo vigilância no interior da União Europeia (Jornal Oficial da União Europeia 2018).

2.2. Epidemiologia

Toda a importância patológica e económica da infeção por MAP é espelhada nos ruminantes (Coelho e Rodrigues 2007), apesar do seu vasto espectro de hospedeiros (Spickler 2017). Em Portugal já foi demonstrada a presença do organismo em canídeos, mustelídeos, herpestídeos e leporídeos apesar da sua importância como reservatórios ainda não estar determinada (Matos et al. 2014). A PT encontra-se distribuída a nível mundial (Fecteau 2018), introduzida e disseminada entre nações através da importação de animais subclínicos (Coelho e Rodrigues 2007). A maioria dos países europeus classifica-a como uma doença enzoótica, nomeadamente na Europa Central, enquanto os países da Europa do Norte e Leste classificam-na como ausente (Fanelli et al. 2020). No entanto, a prevalência da PT é subestimada (Barkema et al. 2018), pois a informação epidemiológica disponível é limitada e a ausência de notificação não assegura a verdadeira indemnidade da doença (Fanelli et al. 2022). Estima-se que a prevalência da infeção nos efetivos seja superior a 50% na maioria dos países de grande atividade leiteira (Barkema et al. 2018) havendo poucos países com este valor inferior a 1%, como a Noruega e Suécia (Behr et al. 2020). No gado de carne, a nível individual, estima-se uma prevalência inferior a 5% com poucos países a participar os seus relatórios (Lombard 2011) onde as prevalências aparentes variam entre os 0,52% na Bélgica, 1,2% na Finlândia (Boelaert et al. 2000), 3,7% em Orkney (Beasley et al. 2011) e 1,59% na Galiza (Diéguez et al. 2007). Já a prevalência verdadeira a nível individual estima-se em 2% na Bélgica (Boelaert et al. 2000), 3,09% na Irlanda (Good 2009) e 1,03% na Galiza (Diéguez et al. 2007). Nos Estados Unidos da América (EUA), a prevalência nos efetivos de bovinos leiteiros aproxima-se dos 68%, enquanto os valores para a aptidão carne encontram-se abaixo dos 10% (Fecteau 2018), assemelhando-se a países como a Bélgica e Canadá que apresentam uma prevalência aparente nos efetivos desta aptidão de 7% e 7,9%, respetivamente (Boelaert et al. 2000; Geraghty et al. 2014). Por outro lado, na Irlanda este valor atinge os 17,9% (Good 2009) e na região da Galiza e nas ilhas escocesas de Orkney estes valores são de 10,68% e 64,4%, respetivamente (Diéguez et al. 2007; Good 2009; Beasley et al. 2011). No geral, a prevalência em explorações leiteiras é superior às de carne (Lombard 2011) e por este motivo a PT é considerada por alguns autores como uma doença de gado leiteiro (Roussel 2011). O valor superior nos bovinos de leite pode ser justificado pela preocupação associada ao impacto da doença na indústria e receio do seu potencial zoonótico (Good 2009), enquanto o valor inferior na aptidão carne relaciona-se com as reduzidas

investigações nestes animais e pelo regime extensivo maioritariamente praticado associado a um menor risco de transmissão (Radostits et al. 2002; Behr et al. 2020).

A suscetibilidade à infeção depende da idade do animal e, apesar do primeiro mês de vida ser o mais suscetível (Radostits et al. 2002), os animais são considerados de alto risco até aos seis meses de idade (Lombard 2011). A causa desta suscetibilidade é incerta, porém é especulado que a imaturidade imunitária e a maior permeabilidade da mucosa intestinal nas primeiras horas de vida (Sweeney 2011), associados à presença de goteira esofágica com *bypass* do rúmen (Behr et al. 2020) e à maior área de tecido linfóide intestinal (Radostits et al. 2002) contribuam para o caso. A resistência desenvolve-se entre os quatro e os doze meses de idade e é nesta fase que os indivíduos atingem um nível de resistência equiparável à de um adulto (Arsenault et al. 2014). A resistência poderá dever-se não à falha do MAP de entrar nos tecidos, mas sim à contenção ou eliminação deste após a entrada na mucosa intestinal (Sweeney 2011). Apesar da resistência aparente dos adultos, esta pode ser ultrapassada por uma elevada pressão de infeção (Behr et al. 2020). A resistência ou predisposição à PT poderá ter uma componente genética (Sweeney 2011), pois raças de bovinos como a *Guernsey*, *Jersey*, *Shorthorn*, algumas raças *Bos indicus* (Behr et al. 2020) e a raça de carne *Limousine* (Scott et al. 2011) parecem apresentar alguma predisposição. Vários marcadores genéticos específicos associados à resistência para seleção de animais têm sido estudados, mas com resultados inconclusivos (Sweeney 2011; Behr et al. 2020).

O período de incubação da PT é longo, entre os 2 e 7 anos (Behr et al. 2020), sendo inversamente proporcional à dose de exposição (Lombard 2011). O tempo médio de vida de uma vaca, aleitante ou leiteira, ultrapassa este período pelo que existe uma maior oportunidade para manifestação e disseminação da doença (Behr et al. 2020).

A PT é considerada uma doença de zonas húmidas e frias, com maior concentração de casos no final do inverno e início da primavera. Todavia, a seca tem sido proposta como um fator predisponente no território espanhol (Coelho e Rodrigues 2007).

2.3. Transmissão

Os adultos infetados excretam o MAP nas fezes, de forma contínua ou intermitente, aumentando gradualmente a quantidade excretada com o avançar da infeção (Sweeney 1996; Field et al. 2022). Os animais infetados são classificados de acordo com a quantidade de micobactéria excretada (leves, moderados, fortes e superexcretadores) (Lombard 2011; Behr et al. 2020), sendo os principais disseminadores os animais excretadores leves e intermitentes (Field et al. 2022). A excreção nas fezes e a presença de lesões no intestino suportam a rota fecal-oral como a principal via de transmissão (Lombard 2011), em que a maioria das infeções ocorre nos primeiros dias ou meses de vida, através da ingestão (Sweeney 2011). Apesar de a PT ser entendida como uma doença entérica, existe disseminação extraintestinal,

nomeadamente para o útero, linfonodos supramamários, úbere e órgãos sexuais masculinos (Sweeney 1996). As fêmeas infetadas em fase avançada podem excretar a micobactéria no colostro e leite tornando-os possíveis fontes de infeção para os bezerros. No entanto, é mais provável que a conspurcação do úbere com material fecal resulte na contaminação das secreções (Behr et al. 2020). O agente é excretado no leite por 35% das vacas em fase clínica. Nas fêmeas subclínicas, este valor atinge os 19% nas excretoras fortes e 3% nas excretoras leves (Sweeney et al. 1992). Estudos mais recentes indicam a excreção do agente no leite em 49,2% e 12,6% das fêmeas em fase clínica e subclínica, respetivamente (Stabel et al. 2014). Relativamente ao colostro, 9% das excretoras leves e 36% das excretoras fortes excretam MAP nesta matriz. Em vacas subclínicas, 22,2% apresentam MAP no colostro (Streeter et al. 1995). As fêmeas aleitantes amamentam os bezerros desde o nascimento e durante vários meses, fornecendo uma maior oportunidade de transmissão através do colostro e leite (Fecteau 2018). A transmissão de PT poderá ser um dos potenciais riscos do uso de leite de descarte para alimentar bezerros (Leão et al. 2017) e a administração de *pools* funcionará como um meio de ampliação deste risco (Lombard 2011).

A transmissão transplacentária está documentada (Sweeney 1996) e, apesar do mecanismo ainda não ser totalmente conhecido, especula-se que haja uma contaminação uterina e conseqüente disseminação hematogénica e linfática para o embrião/feto (Lombard 2011). Aproximadamente 9% dos fetos de mães em fase subclínica e 39% dos fetos de mães em fase clínica são infetados (Whittington e Windsor 2009), sabendo-se que bezerros nascidos de fêmeas seropositivas têm 6,6 vezes maior chance de também o serem (Fecteau 2018). A transferência de embriões (TE) tem sido investigada como potencial meio de transmissão pois, apesar não existirem evidências de que os oócitos ou embriões consigam alojar a bactéria quando as recomendações para a TE são respeitadas (Kruip et al. 2003), o MAP já foi encontrado nas lavagens uterinas de vacas infetadas (Rohde e Shulaw 1990). A infeção de embriões de dadoras infetadas é teoricamente possível, mas raramente resultou na infeção do bezerro sendo considerada segura para a descendência e para a recetora (Sweeney 1996). A infeção fetal após a implantação a partir de uma recetora infetada é possível e mais provável de ocorrer (Sweeney 1996; Manning et al. 2003). Touros infetados podem apresentar infeção disseminada no trato reprodutivo e sémen impondo um potencial risco de transmissão por via sexual (Velázquez-Morales et al. 2019). O MAP já foi isolado em tecidos uterinos e em linfonodos mesentéricos de fêmeas após a inoculação por inseminação artificial ou monta natural (Perry et al. 2006). Porém, outros estudos demonstram que o agente é destruído não resultando na infeção sistémica da fêmea (Radostits et al. 2002). Apesar deste tipo de transmissão não estar documentada (Buergelt et al. 2004), a hipótese não deve ser descartada (Sweeney 1996).

A principal causa de entrada da doença numa exploração é a introdução de indivíduos com doença subclínica. A grande maioria das explorações de vacas aleitantes cria as suas próprias fêmeas de reposição, mas adiciona nova genética com a compra de touros que poderão ser animais em fase subclínica (Lombard 2011). Devido ao longo período de incubação, os animais são aparentemente saudáveis e negativos aos testes de diagnóstico (Sweeney 1996). O uso de bovinos leiteiros para alimentar bezerros ou como recetoras de TE deve igualmente ser visto como um risco de introdução da doença (Behr et al. 2020). A transmissão entre espécies é possível, havendo casos de infeção de pequenos ruminantes com historial de partilha de pastagem com bovinos infetados (Sweeney 1996). O MAP já foi isolado em vários animais selvagens considerados hospedeiros reservatório e o contacto com fezes destes é provável em manadas em extensivo (Sweeney 1996; Daniels et al. 2001). Os bovinos tendem a evitar as pastagens contaminadas com fezes de outros animais (Daniels et al. 2001), por exemplo a aparência de *pellet* das fezes de veado tornam a ingestão das fezes destes animais aquando do pastoreio improvável (Sweeney 1996). No entanto, os bovinos parecem não evitar as zonas contaminadas com fezes de coelho (Daniels et al. 2001) e em Portugal o MAP já foi identificado nestes animais (Matos et al. 2014), tornando-os uma potencial via de transmissão (Daniels et al. 2001). Os pombos também já foram sugeridos como possíveis disseminadores mecânicos e reservatórios de MAP (Seva et al. 2022). Apesar destas evidências, o risco de uma vacada se infetar por contacto com animais selvagens é mínimo, sendo mais provável um *spillover* da infeção a partir dos ruminantes domésticos para a vida selvagem (Lombard 2011).

O uso de charcas e de água corrente para abeberamento já foram apontados como fonte de infeção. Neste último, a água poderá correr a partir de uma exploração infetada com disseminação entre explorações (Roussel et al. 2005). Existe ainda a hipótese de transmissão por aerossóis, à semelhança do que acontece com o *Mycobacterium bovis*, pois o MAP já foi detetado em poeiras e a sua presença apenas nos linfonodos traqueobrônquicos sugerem uma possível componente de *airborne disease* (Lombard 2011). Outros potenciais riscos de introdução e disseminação da doença incluem o trânsito de estrume entre explorações, a criação de novilhas em local diferente da vacada principal, alojamento conjunto de animais de diferentes idades, uso de restos de forragens ou de outros alimentos distribuídos para alimentação de animais adultos para posterior alimentação de animais jovens (Lombard 2011) e partilha de machos para reprodução (Sweeney 1996). Outras falhas de biossegurança abrangem veículos e vestuário contaminado, apesar de pouco relevantes quando comparados com a entrada de um animal portador em fase subclínica (Sweeney 1996).

2.4. Fisiopatogenia

Após a ingestão o principal local de entrada do MAP são as placas de *Peyer* do íleo, no intestino delgado (Sigurdardóttir et al. 2004; Sweeney 2011). Aqui, a micobactéria é transferida para o espaço subepitelial através das células M (Arsenault et al. 2014) e células dendríticas (Behr et al. 2020) onde é fagocitada por macrófagos (Sigurdardóttir et al. 2004). A partir deste momento, existem dois percursos possíveis: o sistema imunitário consegue controlar a infeção e eliminar o MAP ou este sobrevive dentro dos macrófagos e a infeção prossegue (Behr et al. 2020). Os macrófagos criam um ambiente química e bioquimicamente estruturado para a destruição das partículas internalizadas (Arsenault et al. 2014), no entanto a micobactéria apresenta mecanismos de evasão que transformam esta célula num refúgio para a sua sobrevivência, proliferação e disseminação (Arsenault et al. 2014; Behr et al. 2020) constituindo a base da natureza progressiva e crónica da PT (Sweeney 2011). A micobactéria interage com certos recetores que levam à alteração do padrão de secreção de citocinas e das consequentes ações de defesa imunitária, criando um ambiente pró-inflamatório com inibição da sinalização pelo interferão γ (IFN- γ) e diminuição da ativação de macrófagos e respostas bactericidas (Arsenault et al. 2014).

Numa fase inicial, existe uma contenção da infeção com proliferação e disseminação lenta no trato gastrointestinal e no tecido linfóide associado (Sweeney 2011). Nesta fase, não existe quadro clínico nem quebras na produtividade evidentes (Behr et al. 2020) desenvolvendo-se uma resposta inflamatória granulomatosa (Sweeney 2011) com lesões iniciais nas placas de *Peyer* e válvula íleo-cecal (Coelho e Rodrigues 2007). A produção de anticorpos e a excreção fecal nestes animais ainda está abaixo dos limites detetáveis (Behr et al. 2020). As concentrações de MAP no intestino aumentam com a progressão da doença (Behr et al. 2020) e as lesões avançam na direção da lâmina própria da mucosa adjacente e linfonodos mesentéricos (Coelho e Rodrigues 2007). A progressão da doença atribui-se a uma alteração no padrão de resposta imunitária do tipo Th1 para Th2 (Koets et al. 2015) com perda do sinal de agregação dos macrófagos infetados (Coelho e Rodrigues 2007) e aumento da excreção fecal e disseminação extraintestinal (Sweeney 2011). O motivo da alteração é desconhecido, podendo ser atribuída à carga da infeção, à exaustão de células T, a alterações hormonais do periparto ou *stress* metabólico (Koets et al. 2015). Nesta fase verificam-se ligeiras reduções de produtividade e da eficiência reprodutiva (Behr et al. 2020) e a excreção fecal torna-se detetável, geralmente, quando o animal já tem mais de dois anos de idade (Coelho e Rodrigues 2007). Quando o animal entra na fase clínica, existe excreção fecal a níveis elevados e aumento tardio dos anticorpos circulantes (Mcvey et al. 2013; Behr et al. 2020).

2.5. Sinais clínicos e aspetos anatomo-histopatológicos

A doença clínica não surge antes dos dois anos de idade, sendo mais comum entre os dois e seis anos, porém em bezerros nascidos de vacas infetadas esta pode ocorrer aos doze a dezoito meses de vida (Radostits et al. 2002). A progressão da doença leva a uma síndrome de má absorção e enteropatia com perda de proteína (Field et al. 2022) resultando numa perda de peso gradual (Fecteau 2018). Surge uma diarreia aquosa, o sinal clínico típico em bovinos, sem tenesmo, muco, sangue ou odor desagradável (Coelho e Rodrigues 2007). A diarreia poderá ter carácter intermitente, tornando-se mais constante e severa com o tempo (Spickler 2017). Relativamente aos sinais vitais, estes encontram-se inalterados, os animais permanecem alerta e o apetite, apesar da perda de peso, encontra-se normal (Sweeney 2011; Spickler 2017; Fecteau 2018). O decréscimo da proteína plasmática resulta em edemas subcutâneos nas zonas dependentes como a barbela e zona submandibular (Sweeney 2011). A produção leiteira e a eficiência reprodutiva são afetadas negativamente (Fecteau 2018) e o quadro clínico pode ser exacerbado pelo *stress* do parto ou início de lactação (Sweeney 2011). O animal poderá ainda apresentar sinais de anemia (Garcia e Shalloo 2015). Nas fases avançadas, os animais encontram-se letárgicos, fracos, edemaciados e com o pelo em mau estado acabando por sucumbir devido à desidratação e caquexia (Behr et al. 2020).

Não há uma correlação evidente entre a gravidade das lesões macro e microscópicas e o quadro clínico apresentado. No exame *post mortem* de um animal em fase avançada de PT, este encontra-se caquético, com atrofia das massas musculares e perda dos depósitos adiposos com possível líquido livre nas cavidades corporais (Coelho e Rodrigues 2007). A mucosa do intestino delgado encontra-se espessada, esbranquiçada, sem ulceração e com evidentes granulomas submucosos (Coelho e Rodrigues 2007; Arsenault et al. 2014; Spickler 2017). Na válvula ileocecal, íleo e porções caudais do jejuno pode existir um aumento duas a três vezes da espessura da mucosa, sendo que as pregas não desaparecem quando se estira o intestino conferindo-lhe um aspeto cerebriforme (Coelho e Rodrigues 2007). Existe uma linfadenomegália mesentérica e ileo-cecal associada a palidez (Field et al. 2022) e os vasos linfáticos da subserosa encontram-se proeminentes (Spickler 2017). As lesões disseminadas consistem em microgranulomas noutros órgãos e linfonodos estando descritas em bovinos adultos (Radostits et al. 2002). Nos casos subclínicos, estas lesões podem estar ausentes ou serem muito subtis (Spickler 2017). Em termos histológicos, a inflamação granulomatosa do intestino e linfonodos regionais é indicativa de infeção por MAP (Collins [s.d.]). Existe um infiltrado celular constituído por macrófagos e células epitelioides (Coelho e Rodrigues 2007), onde os macrófagos infetados, estão rodeados por outros macrófagos e linfócitos (Collins [s.d.]). A coloração ZN de cortes histológicos de tecido intestinal ou linfonodos mesentéricos evidencia a presença do MAP com AAR (avermelhados) no interior dos macrófagos (Collins [s.d.]). Estas lesões, inicialmente de forma focal nas placas de Peyer, estende-se para o

restante intestino, evoluindo para uma forma multifocal e posteriormente difusa (Coelho e Rodrigues 2007).

2.6. Efeito iceberg

A maioria dos animais infetados estão em fase subclínica da doença (Behr et al. 2020) podendo excretar grandes quantidades de micobactéria nas fezes (Spickler 2017). Menos de 5% dos animais infetados vão demonstrar PT clínica (Behr et al. 2020). Por cada animal com doença avançada é provável que outros quinze a vinte e cinco animais estejam infetados (Fecteau 2018), sendo apenas 25 a 30% destes detetáveis pelas técnicas mais sensíveis (Cheng et al. 2020). Pode-se definir a ocorrência de PT num efetivo como um *iceberg* (Figura 1), onde os casos clínicos correspondem somente à parte emergente e a infeção assintomática distribui-se nas camadas imersas, sendo difícil de diagnosticar na exploração (Coelho e Rodrigues 2007). A excreção fecal, inicialmente intermitente, inicia-se até dois anos e meio antes do aparecimento dos sinais clínicos contribuindo para a contaminação ambiental e disseminação silenciosa da doença (Jaber et al. 2018). Os casos subclínicos representam um dos maiores desafios no controlo da PT (Lombard 2011).

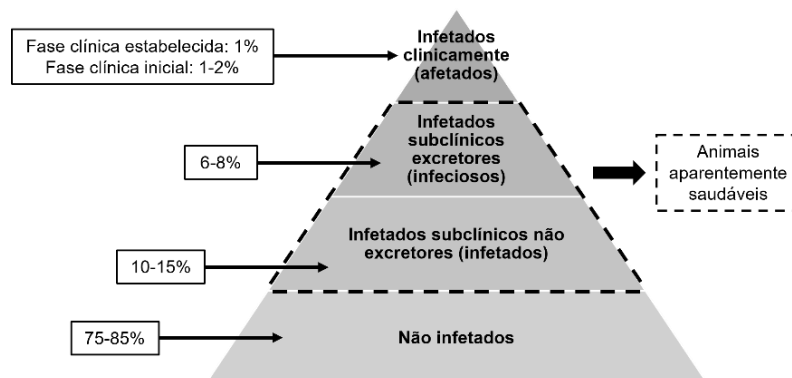


Figura 1. Iceberg da Paratuberculose (fonte: Coelho e Rodrigues 2007; Savey et al. 2009)

2.7. Diagnóstico diferenciais

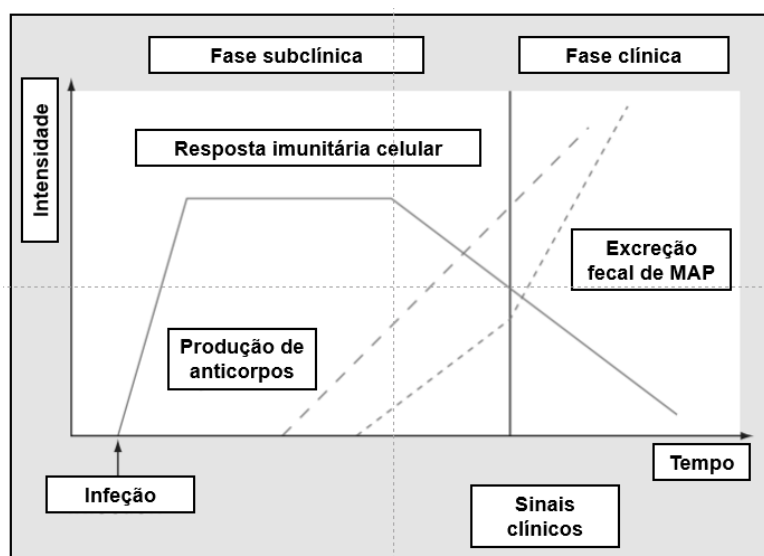
Devido ao carácter crónico e caquetizante da PT, os diagnósticos diferenciais (DD) devem incluir todas causas de caquexia, associadas ou não à diarreia (Savey et al. 2009). A PT deve ser diferenciada de outras doenças que provoquem diarreia crónica em adultos, como BVD, disenteria de inverno, fasciolose, nematodes gastrointestinais, acidose (Otter e Cranwell 2007) ou salmonelose (Smith et al. 2020). Os DD poderão ainda incluir indigestões vagais, intoxicações por plantas e febre catarral maligna (Smith 2015). Num animal com menos de um ano, os DD podem incluir a PT, apesar da idade improvável, coccidiose ou ostertagiose (Smith et al. 2020). A perda de peso é comum a todos os processos crónicos, entre elas a PT, tuberculose, doenças tumorais, parasitismo, má nutrição, intoxicações, dificuldade na mastigação e problemas de dentição (Esteves et al. 2021). Outros DD incluem

leucose bovina, deslocamento do abomaso à esquerda, lipomatose, yersiniose (Cousins et al. 2002), doença dos edemas, enterite idiopática eosinofílica, carência em cobalto, micotoxicode, metrite, abscessos hepáticos, doença hepática, reticuloperitonite traumática, trombose da veia cava caudal (Coelho e Rodrigues 2007), deficiência de selênio, amiloidose renal, falha cardíaca ou uremia (Smith et al. 2020).

2.8. Diagnóstico

O diagnóstico da PT é complicado devido ao longo período de incubação, à complexidade da fisiopatologia, excreção fecal intermitente e flutuações dos níveis de anticorpos (Savey et al. 2009). Todos os métodos disponíveis apresentam uma sensibilidade (Sen) baixa e/ou especificidade (Spe) imperfeita em animais individuais (Field et al. 2022) e a escolha do melhor teste de diagnóstico vai depender da fase da doença (Spickler 2017): nas fases iniciais, observa-se uma resposta imunitária do tipo celular, indicadora de exposição, enquanto a resposta humoral é predominante nas fases avançadas, existindo uma seroconversão tardia indicativa de progressão (Coelho e Rodrigues 2007; World Organisation for Animal Health 2021) (Gráfico 2). Já na fase terminal, pode existir um estado de anergia em que tanto a imunidade celular como humoral podem não ser detetadas (Radostits et al. 2002). Relativamente à excreção fecal, a sua ocorrência estima-se entre os 7 e 84 meses após a infecção e inicia-se antes da seroconversão, ocorrendo esta última perto de 7 meses após o início da primeira (Yamamoto et al. 2018). As técnicas disponíveis podem ser divididas em métodos diretos, que detetam o organismo, e métodos indiretos, que detetam a resposta imunitária (Field et al. 2022). Quase todos os animais na fase clínica são positivos a ambos os métodos (Behr et al. 2020).

Gráfico 2. Evolução das respostas imunitárias celular e humoral e da excreção fecal de MAP durante a progressão da infecção (fonte: Rosseels e Huygen 2008)



2.8.1. Métodos diretos

O exame microscópico em amostras fecais com coloração ZN atribui resultados rápidos (Coelho e Rodrigues 2007) e um diagnóstico presuntivo dos casos clínicos através da visualização de aglomerados de bacilos com AAR (Spickler 2017). A Sen é de 49%, sendo prejudicada aquando da diarreia devido à diluição ou em animais excretores subclínicos (Savey et al. 2009; Weber et al. 2009). A Spe é de 83%, relacionada com a impossibilidade de distinguir morfológicamente o MAP de outras micobactérias, apesar de os aglomerados serem característicos de MAP (Savey et al. 2009). Durante a necropsia podem-se recolher amostras da mucosa ileocecal e linfonodos mesentéricos para observação histológica (Savey et al. 2009) através de colorações com hematoxilina-eosina complementada com a técnica ZN (Coelho e Rodrigues 2007). As lesões histológicas compatíveis com inflamação granulomatosa e a observação do bacilo com AAR confirmam o diagnóstico de PT (Coelho e Rodrigues 2007) com Sen superior apenas à observação em exame microscópico da micobactéria em amostras fecais ou teciduais (Savey et al. 2009).

As técnicas de imunocoloração permitem detetar o agente nas amostras de tecido frescas ou fixadas, apresentando maior Sen que a técnica ZN (Coelho e Rodrigues 2007). No entanto, têm as desvantagens da possibilidade de reação cruzada com outras micobactérias (Spickler 2017), de serem demoradas e dispendiosas (Coelho e Rodrigues 2007).

A cultura fecal é considerada o *gold standard* para o diagnóstico de PT em animais vivos. A Sen da cultura fecal pode ser desdobrada de acordo com o estado de infeção: 74% para animais infecciosos, 70% para animais afetados e 23 a 29% para animais infetados (World Organisation for Animal Health 2021a). A Spe é estimada de 100% (Centro di Referenza Nazionale per la Paratuberculosis 2022), no entanto devido à passagem passiva do agente pelo trato gastrointestinal ser teoricamente possível, um animal não infetado pode revelar-se positivo (World Organisation for Animal Health 2021a). Existem desvantagens associadas ao método como o custo elevado e o tempo demorado para obtenção de resultados (Barkema et al. 2018) que, no caso de MAP, o resultado negativo definitivo só pode ser obtido após dezoito semanas de incubação (Savey et al. 2009). O critério de crescimento fastidioso associado à dependência em micobactina, morfologia da colónia e presença de bacilos com AAR oferecem pouca oportunidade de erro na identificação (Coelho e Rodrigues 2007). Outras amostras usadas na cultura incluem íleo, jejuno, válvula ileocecal, linfonodo mesentérico (Field et al. 2022) e leite (Radostits et al. 2002).

O *Polymerase Chain Reaction* (PCR) através da deteção da sequência IS900 ou F57, específicas de MAP (Barkema et al. 2018), em amostras de fezes, leite (Savey et al. 2009), válvula ileocecal e linfonodos mesentéricos (Coelho e Rodrigues 2007) permite detetar um número reduzido de microrganismos (Savey et al. 2009), não dependendo da existência de micobactérias viáveis (Barkema et al. 2018). As grandes vantagens deste método são a

rapidez de resultados (48 horas) (Savey et al. 2009) e o menor custo quando comparado com a cultura (Barkema et al. 2018). A existência de certos inibidores nas amostras fecais revela-se uma desvantagem (Coelho e Rodrigues 2007), proporcionando falsos negativos, mas a adição de uma etapa prévia de extração de ácidos nucleicos permite a sua atenuação (Savey et al. 2009). Field et al. (2022) compilou os valores Sen estimadas para o PCR fecal quando comparados com a cultura na mesma matriz, sendo que a Sen variou entre 17,6% e 89%, sendo este valor superior nas amostras teciduais devido ao menor efeito de diluição e de inibidores (Coelho e Rodrigues 2007).

2.8.2. Métodos indiretos

2.8.2.1. Métodos de deteção da resposta celular

A resposta de origem celular inclui uma componente de hipersensibilidade tardia do tipo IV que pode ser verificada através de teste intradérmico, teste de transformação linfoblástica, teste de inibição da migração e teste de IFN- γ (Savey et al. 2009), porém estes ensaios são raramente feitos (Sweeney 2011). O teste intradérmico consiste na administração intradérmica duma suspensão de extratos micobacterianos, idealmente um extrato proteico purificado (PPD) de MAP (johnina) (Coelho e Rodrigues 2007), com medição da prega de pele no local de injeção imediatamente antes e 72 horas após a inoculação (Savey et al. 2009; World Organisation for Animal Health 2021a). No caso da PT, um aumento da prega de pele de dois ou mais milímetros é considerado positivo (Coelho e Rodrigues 2007; World Organisation for Animal Health 2021). O teste *in vitro* de produção de IFN- γ compreende a medição da quantidade de interferão produzido pelos linfócitos já sensibilizados durante a incubação com PPD (World Organisation for Animal Health 2021a). Esta técnica poderá ser útil na deteção precoce dos animais infetados (Coelho e Rodrigues 2007), todavia a existência de reações cruzadas pode resultar em falsos positivos (Spickler 2017). A Spe situa-se entre os 67 e 94% e a Sen entre os 13 e 85% (World Organisation for Animal Health 2021a). Já com a utilização de johnina, estima-se uma Spe de 95 a 99% e Sen de 50 a 90%, dependendo da idade do animal (Savey et al. 2009). Outros métodos *in vitro*, incluem as provas de inibição da migração leucocitária com observação do grau de dispersão em que a fixação ocorre nos leucócitos já sensibilizados e a prova de transformação linfocitária com demonstração da regressão das populações de linfócitos sensibilizados perante os antigénios micobacterianos (Coelho e Rodrigues 2007).

2.8.2.2. Métodos de deteção de resposta humoral

A identificação da resposta humoral ajuda na confirmação de PT num animal suspeito (Spickler 2017). O teste serológico mais sensível e específico, e também o mais utilizado, é o *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (World Organisation for Animal Health 2021a).

Outros métodos, como o teste de fixação de complemento (FC) e imunodifusão em agar gel (AGID) têm uma Sen e Spe inferiores, não sendo recomendados (World Organisation for Animal Health 2021a).

A Sen do ELISA depende do nível de excreção (World Organisation for Animal Health 2021a), existindo evidências que os títulos obtidos são preditivos da probabilidade de o indivíduo ser excretor (Barkema et al. 2018). O valor da Sen aumenta com a idade (World Organisation for Animal Health 2021a), não sendo o teste aconselhado em animais com quinze a dezoito meses de idade (Savey et al. 2009). As respostas serológicas podem ser fracas em animais não excretores gerando falsos negativos e os animais que eliminam a infecção ou interagiram com outras micobactérias podem revelar-se falsos positivos (Spickler 2017). A existência de animais em fase clínica avançada seronegativos pode dever-se ao estado de anergia atribuído a esta fase (Savey et al. 2009). Nos casos clínicos a Sen média é de 87%, diminuindo para 15% nos casos subclínicos (Radostits et al. 2002), já a Spe é entendida entre 98 e 99% (Centro di Referenza Nazionale per la Paratuberculosis 2022). No geral, o ELISA tem uma performance superior à FC e AGID quando aplicados em soro bovino (Smith et al. 2020), sendo também mais atrativo devido ao baixo custo e possibilidade de automatização, tornando-o prático para testagens em grandes quantidades (Smith et al. 2020). Um resultado positivo em animais clínicos indica a presença de PT, todavia a doença não pode ser descartada apenas com uma serologia negativa (Coelho e Rodrigues 2007). A prova da intradermotuberculinação de comparação (IDTC) pode interferir temporariamente com a viabilidade do teste ELISA para PT, havendo reações falso positivo e por este motivo os testes serológicos devem ser evitados pelo menos durante noventa dias após a inoculação (Vargues et al. 2009). Se o ELISA for realizado inadvertidamente, deverá ser repetido um mês após a IDTC (Cattle Health Certification Standards 2021).

O teste de FC aplica-se a suspeitas clínicas (World Organisation for Animal Health 2021a), apresentando Sen de 90% e Spe de 70% (Radostits et al. 2002), no entanto este valor de Spe é insuficiente para que seja utilizado para controlo da doença e para testagem individual (World Organisation for Animal Health 2021a). Os falsos positivos resultam de reações cruzadas ou da exposição sem infecção efetiva (Radostits et al. 2002). O método AGID é útil na confirmação de suspeitas (World Organisation for Animal Health 2021a) sendo rápido e barato (Coelho e Rodrigues 2007) com Sen para animais subclínicos e clínicos de 19% e 96%, respetivamente, e com Spe a 94% (Radostits et al. 2002). O AGID apenas poderá ser aplicado em efetivos livres de tuberculose bovina (TB), devido à possibilidade de reações cruzadas (Radostits et al. 2002).

2.8.3. Outros métodos

Apesar de pouco frequentes, existem novos desenvolvimentos de técnicas de diagnóstico tais como a detecção de ácidos nucleicos micobacterianos circulantes no sangue, o uso de biomarcadores para detecção precoce da doença (Barkema et al. 2018) como é o caso do aumento das proteínas de fase aguda (Espinosa et al. 2020) ou o uso de bacteriófagos como agente lítico para extração de ácidos nucleicos associado ao PCR como alternativa para agentes fastidiosos (Swift et al. 2020).

2.9. Tratamento

Não existe nenhum fármaco eficaz (Spickler 2017) nem aprovado para o tratamento de PT em animais de produção (Smith et al. 2020). Em casos em que o tratamento é tentado, pode existir remissão dos sinais clínicos e redução da excreção fecal (Smith et al. 2020) com prolongamento da vida do animal (Coelho e Rodrigues 2007), mas a infecção raramente é eliminada (Smith et al. 2020). Existem alguns antibióticos com ação contra MAP, todos pertencentes à Categoria A não estando autorizados como medicamento veterinário na Europa (Committee for Veterinary Medical Products 2022). Estes incluem a isoniazida (20mg/kg PO SID), rifampina (20mg/kg PO SID) e clofazimina (600-1000mg/kg PO SID) (Fecteau e Whitlock 2011). Alguns aminoglicosídeos (estreptomicina, canamicina, gentamicina e ampicilina), assim como alguns macrólidos, fluoroquinolonas experimentais e fármacos como ciclosporina A, rapamicina, tacrolimus, ácido aminosalicílico, metotrexato e azatioprina têm revelado atividade contra várias micobactérias, incluindo MAP (Fecteau e Whitlock 2011; Mcvey et al. 2013). As plantas *Ocimum sanctum* e *Solanum xanthocarpum* possuem componentes bioativos com atividade anti-MAP (Bharath et al. 2023), existindo ainda outros compostos naturais que inibem o crescimento micobacteriano como o óleo de canela, óleo de oregão e carvacrol. Os probióticos, como a *Dietzia*, quando adicionados diariamente ao alimento têm demonstrado um aumento significativo do tempo de sobrevivência do animal (Fecteau e Whitlock 2011). O gálio tem atividade *in vitro* contra as micobactérias partilhando algumas semelhanças ao ferro, substituindo-o nas vias metabólicas celulares promovendo a sua disrupção através de mimetismo (Fecteau e Whitlock 2011). Em bovinos, o ionóforo monensina inibe o crescimento de MAP (Smith et al. 2020) interferindo no gradiente eletroquímico intracelular (Fecteau e Whitlock 2011). A alimentação diária de vacas infetadas com monensina (450mg) contribuiu para a redução das lesões histológicas e contagens fecais. Em neonatos posteriormente infetados, a adição de monensina (35mg BID) ao leite promoveu um menor número de culturas positivas. Isto sugere que o ionóforo reduz a colonização dos tecidos por MAP e a excreção fecal (Fecteau e Whitlock 2011). No entanto, a monensina é atualmente proibida na União Europeia, exceto para tratamento de cetoses em bovinos leiteiros (Committee for medical products for Veterinary use 2007).

2.10. Impacto económico

A PT é considerada como uma das principais doenças limitantes à produção, principalmente nos bovinos de leite (Coelho e Rodrigues 2007). Os casos clínicos graves são apenas a ponta do *iceberg* (Coelho e Rodrigues 2007) e as perdas por mortalidade podem não parecer significativas, tornando-se consideráveis quando associadas à deterioração do estado de saúde do animal e da sua produtividade (Radostits et al. 2002). Os estudos sobre o impacto económico em bovinos de carne são limitados (Lombard 2011) e as baixas prevalências adicionadas à falta de registos dificultam a sua determinação (Roussel 2011). É razoável assumir que algumas das perdas observadas nos bovinos leiteiros possam ser estendidas à produção de carne (Lombard 2011), como o aumento do índice de conversão, diminuição do ganho de peso (Garcia e Shalloo 2015) e venda de animais mais leves (Roussel 2011). A quebra da produção leiteira também ocorre em bovinos de carne, o que justifica o menor peso ao desmame dos bezerros filhos de vacas positivas (Lombard 2011; Roussel 2011), com reduções possíveis de 21,48kg (Garcia e Shalloo 2015). Os bezerros filhos de excretoras fortes e moderadas podem apresentar quebras de 58,51kg e 40,81kg, respetivamente (Garcia e Shalloo 2015). As vacas infetadas têm uma maior dificuldade na absorção de nutrientes, divergindo a energia para a sua manutenção em vez da gestação. Estes animais podem apresentar bezerros mais leves ao nascimento, com reduções de 2,3 a 6,9 kg (Elzo et al. 2009). Outras perdas relacionam-se com a mortalidade (Roussel 2011), que chega a ser 3% superior em efetivos positivos (Garcia e Shalloo 2015), com a má condição corporal, refugo precoce e custos de substituição (Lombard 2011). As carcaças de animais caquéticos e com lesões de PT podem não ser aprovadas para consumo humano, com quebras no valor da carcaça entre 20 e 30% (Garcia e Shalloo 2015). Existe ainda uma maior suscetibilidade a outras doenças (Garcia e Shalloo 2015) como laminites (Cheng et al. 2020), afeções respiratórias e digestivas (Garcia e Shalloo 2015). O estado subclínico afeta negativamente o balanço energético da fêmea contribuindo para o atraso do retorno à ciclicidade e aumento dos dias em aberto, demorando mais um a três quartos de ciclo éstrico a ficar gestante com maior probabilidade de ocorrência do parto fora da época (Elzo et al. 2009). A confirmação da positividade num efetivo leva à perda do seu valor comercial, especialmente em produtores de raças puras (Coelho e Rodrigues 2007), pois os animais positivos não são aptos como reprodutores e terão um tempo de vida produtiva reduzido (Collins 2011a). As perdas neste nicho são muito superiores quando comparadas com a produção de animais de engorda (Lombard 2011), não só pela perda de genética como também pela quebra de vendas, dificuldades de exportação e perda da confiança do comprador (Roussel 2011). Segundo a Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), alguns países para os quais Portugal exporta bovinos vivos requerem a emissão de um certificado sanitário que inclui a PT. A natureza insidiosa da PT torna-a uma potencial ameaça

à indústria animal (Radostits et al. 2002), onde o impacto económico terá tendência a aumentar num efetivo infetado onde não existam medidas de controlo (Garcia e Shalloo 2015) e, se o MAP se vier a confirmar como um agente zoonótico transmissível através de alimentos de origem animal, estas consequências serão ainda mais profundas (Coelho e Rodrigues 2007).

2.11. Saúde Pública

O MAP tem sido proposto como um dos agentes causais da Doença de Crohn (DC), uma doença entérica crónica em humanos sem etiologia conhecida (Waddell et al. 2015). Esta doença é caracterizada por uma perda de peso crónica e diarreia com períodos de remissão e recidiva (Spickler 2017), assemelhando-se em termos patológicos e clínicos à PT (Waddell et al. 2015). Este facto, associado à capacidade de infeção de espécies não ruminantes (Waddell et al. 2015), à evidência de elevados níveis de anticorpos anti-MAP e isolamento de micobactérias semelhantes e até mesmo do próprio MAP em pacientes com DC (Coelho e Rodrigues 2007) contribui para a teoria de potencial agente zoonótico (Waddell et al. 2015). A pasteurização pode não ser totalmente eficaz em eliminar a micobactéria (Mcvey et al. 2013) e os produtos crus originários de explorações infetadas têm elevada probabilidade de serem contaminados *ante mortem* durante as fases de disseminação da infeção onde o agente pode ser encontrado no músculo, órgãos e leite (Collins 2011b). No entanto, o consumo destes produtos ainda não foi associado com a DC (Waddell et al. 2016) e os estudos atualmente existentes são inconclusivos e, mesmo que o MAP seja comum nas pessoas doentes, poderá apenas ser um achado ocasional onde o intestino inflamado proporciona melhores condições para o seu crescimento, já que a micobactéria é também encontrada no intestino saudável (Spickler 2017). A preocupação com a possibilidade de MAP ser uma ameaça à Saúde Pública e Segurança dos Alimentos tem sido uma motivação silenciosa para o estabelecimento de programas de controlo e certificação de efetivos em vários países (Collins 2011b; Mcvey et al. 2013; Spickler 2017; Behr et al. 2020). Todavia, apesar das evidências, o papel desta micobactéria na DC ainda é incerto (Mintz e Lukin 2023) e, segundo a WOAHA (2021b), a PT não é considerada uma zoonose.

2.12. Prevenção e Controlo

Atualmente vários países disponibilizam programas de controlo para PT, fornecendo ferramentas para redução da sua prevalência ou evitar a entrada na exploração (Nielsen 2007; Spickler 2017). A existência de trocas comerciais de animais a nível global associadas ao carácter endémico e transfronteiriço da PT, leva à necessidade de um código internacional, idealmente publicado pela WOAHA, que especifique para controlo desta doença (Behr et al. 2020). Uma revisão publicada por Whittington et al. (2019) relativamente à existência de um

plano de controlo para PT em 48 países, relata a presença de um plano desta natureza em apenas 22 países, sendo a maioria europeus (Figura 2) e a notificação foi apontada como obrigatória em bovinos de carne em 33 países.



Figura 2. Países participantes no estudo de Whittington et al. (2019) com um plano de controlo para a PT (fonte: Whittington et al. 2019)

A estratégia aplicada é dependente do objetivo e da prevalência da doença. Por exemplo na Suécia, onde a doença é pouco comum, o objetivo é a manutenção do estatuto sendo o abate sanitário e a epidemiovigilância contínua as principais estratégias. Na maioria dos países a doença é endémica e o objetivo estabelece-se para a redução da prevalência com estratégia preferencial a identificação e refugo dos casos clínicos e subclínicos, melhoramento da higiene, do manejo dos animais e pastagens e da biossegurança (Whittington et al. 2019). Os testes de diagnóstico mais utilizados nos programas de controlo incluem a cultura e PCR fecal e o ELISA. O uso de amostras fecais de origem ambiental também está reportado, assim como o ELISA em *pools* de cinco ou dez animais (Ly et al. 2019; Whittington et al. 2019). Relativamente ao uso de amostras ambientais não existe Sen suficiente para uso num regime em extensivo (Barkema et al. 2018) devido ao potencial impacto da contaminação ambiental (Field et al. 2022). O teste mais rápido e mais barato para aplicar numa suspeita clínica é o ELISA em soro sanguíneo (Radostits et al. 2002), mas devido à natureza crónica da PT (Behr et al. 2020) e à baixa Sen do teste, especialmente em jovens, apenas um teste negativo não garante a não infeção (Field et al. 2022). A testagem do efetivo mitiga as perdas financeiras, elimina os animais infeciosos com redução da disseminação e reduz o risco de contaminação dos géneros alimentícios de origem animal (Barkema et al. 2018). Todos os animais com mais de dois anos devem ser testados (Radostits et al. 2002) por ELISA (sangue ou leite) para deteção de anticorpos (Field et al. 2022) e, idealmente, os animais positivos eliminados. Por opção do produtor, poderá ser realizada a deteção fecal nos animais seronegativos para identificação dos excretores (Radostits et al. 2002). Se o objetivo for a erradicação, qualquer resultado positivo culmina na decisão de refugo. Já o objetivo focado no controlo, algumas considerações de manejo em alternativa ao refugo poderão ser tomadas (Smith et al. 2020). Os animais infetados devem ser separados dos mais novos e

dos animais de reprodução e, se existirem vacas positivas em fase avançada de gestação ou a criar o bezerro, estas podem ser mantidas em condições de isolamento até ao desmame. Após este, as fêmeas infetadas devem ser eliminadas e a descendência não deve ser guardada para reprodução (Truyers e Jennings 2016). Poderá ser prudente refugar as duas últimas descendências antes da identificação da fêmea como infetada (Truyers e Jennings 2016) devido à probabilidade de infeção *in útero* (Radostits et al. 2002; Kahn e Line 2010; Whittington et al. 2019; World Organisation for Animal Health 2021), através da ingestão de colostro, leite ou fezes principalmente em bezerros de vacas aleitantes que estão em contacto próximo com a mãe durante o período de maior suscetibilidade (Roussel 2011). Em alternativa, a descendência pode ser criada separadamente até que esteja pronta para ser vendida como animal de engorda (Radostits et al. 2002), enquanto a descendência que já entrou em reprodução deve ser monitorizada e testada anualmente (Truyers e Jennings 2016). Quando o refugo dos animais positivos não é imediatamente exequível é possível a divisão do efetivo em infetado e não infetado, mantendo a parte infetada isolada e usar apenas animais do grupo negativo para reposição e ir gradualmente refugando os indivíduos infetados (Truyers e Jennings 2016). A testagem anual de toda a vacada com idade superior a dois anos é recomendada (Kahn and Line 2010; Smith et al. 2020; Cattle Health Certification Standards 2021; Centro di Referenza Nazionale per la Paratuberculosis 2022) associada à separação e refugo de positivos (Spickler 2017; World Organisation for Animal Health 2021a) até que a prevalência seja inferior a 5% (Kahn e Line 2010), esperando-se reduzir o valor inicial em 10% após cinco a sete anos (Truyers e Jennings 2016). Todavia, esta estratégia aplicada isoladamente sem alterações de manejo não será suficiente para o controlo da PT a longo prazo (Whittington et al. 2019; Smith et al. 2020). Quando a doença é detetada na exploração pretende-se diminuir a exposição da vacada ao material infetante (fezes, leite, colostro) (Spickler 2017) através de alterações de manejo e de práticas de higiene (World Organisation for Animal Health 2021a). A execução de uma avaliação de risco é importante para determinar e priorizar quais as alterações de manejo a implementar (Centro di Referenza Nazionale per la Paratuberculosis 2022). A recomendação é a reavaliação anual dos fatores de risco e a redução de cada um em 85% (New York State Cattle Health Assurance Program 2019; Centro di Referenza Nazionale per la Paratuberculosis 2022).

Nas vacarias de leite, a existência de parques específicos para partos, a separação do bezerro da progenitora após o nascimento e a criação dos jovens separadamente dos adultos pelo menos durante o primeiro ano de vida contribuem para a minimização da exposição do jovem ao material infetante (Spickler 2017). As estratégias aplicadas nestas explorações são impraticáveis nas vacadas de carne (Radostits et al. 2002). Nestas últimas, os bezerros são mantidos com as mães até aos seis a sete meses de idade, altura do desmame, apresentando uma maior probabilidade de exposição. No pós-desmame, os animais ainda são suscetíveis

e devem ser colocados em pastagens livres de fezes de adultos (Roussel 2011). Em explorações de bovinos de carne, a área onde os bezerros irão viver o período mais suscetível à infecção por MAP deve seguir algumas recomendações tais como: parcela de pastagem destinada ao parto e a parcela para onde são transferidos os bezerros devem ter uma manutenção de modo a evitar a acumulação de estrumes e a prevenir o contacto dos animais jovens com o material infetante, o produtor deverá garantir zonas separadas para os partos de animais positivos, manter as vacas em período perinatal o mais limpas possível (Truyers e Jennings 2016) e proporcionar uma distribuição adequada dos animais evitando concentrações através da criação de cercas com áreas amplas (Roussel 2011). Nestas explorações, é ainda frequente uma vaca com baixa condição corporal ser colocada num curral para tratamento, sendo este curral igualmente utilizado para manter bezerros fracos e doentes após o nascimento. Em explorações com animais infetados, qualquer animal com sinais compatíveis com PT deve ser isolado num curral exclusivo para este efeito (Roussel 2011).

Relativamente ao manejo alimentar do neonato, deve-se dar preferência ao colostro e leite de vacas não infetadas e, idealmente, ao colostro artificial e substitutos do leite (Spickler 2017). Devem igualmente ser tomadas precauções de higiene relativamente aos utensílios de alimentação que possam funcionar como fomites (Mcvey et al. 2013) e, nos casos em que se recolhe o colostro ou leite para posterior alimentação, os devidos cuidados de higiene devem ser tomados evitando a sua contaminação (Radostits et al. 2002). O tratamento térmico destes produtos é um passo importante no controlo de MAP (Mcvey et al. 2013), reduzindo o risco de transmissão desta e outras doenças infecciosas (Smith et al. 2020).

Considerando a elevada resistência do MAP no ambiente, o manejo da pastagem torna-se relevante para reduzir a exposição dos animais no regime extensivo (Whittington et al. 2019). Nas cercas onde foram identificados animais positivos, onde permanecem as suas fezes, estas cercas deverão ficar pelo menos três ou seis meses sem animais, sendo o ideal pelo menos doze meses (Department for Environment Food and Rural Affairs 2004; Whittington et al. 2004; Tuyers e Jennings 2016). A contaminação ambiental e do alimento pode ser influenciada pelo modo como o alimento é distribuído. Por exemplo, os suportes de feno circulares tendem a reunir o gado contribuindo para a produção de áreas lamacentas com maior probabilidade de contaminação dos úberes e tetos; já a mudança do local de distribuição da forragem diariamente é eficaz em reduzir a contaminação. Distribuir mais forragem do que aquela que o gado consegue consumir por dia leva a que esta se torne cama contaminando-se com fezes, havendo a probabilidade de consumo por parte dos bezerros quando se deitam sobre ela (Roussel 2011). A elevação dos comedouros e bebedouros para diminuir a sua contaminação com fezes e a manutenção da sua limpeza (Radostits et al. 2002; Kahn e Line 2010; Spickler 2017), o uso de manjedouras separadas para bezerros e adultos

(Radostits et al. 2002), a restrição do acesso a lagoas e barragens (Radostits et al. 2002) e a preferência pelo uso de água canalizada para abeberamento (Radostits et al. 2002; Kahn e Line 2010; Spickler 2017) devem igualmente ser considerados.

A compra de animais em fase subclínica é a principal causa de introdução da doença na exploração (Whittington et al. 2019). Os produtores devem obter os animais em explorações de estatuto negativo para a PT (Kahn e Line 2010; Spickler 2017; Smith et al. 2021). Se esta garantia não for possível, a preferência serão as explorações sem história recente de PT e acordar com o vendedor a testagem dos animais antes da compra (Radostits et al. 2002). Se o vendedor não estiver disposto a tal, os animais comprados devem ser testados e sujeitos a uma quarentena até o produtor obter os resultados da testagem, sendo os animais introduzidos no efetivo após o resultado negativo (Truyers e Jennings 2016). O teste recomendado é o ELISA no soro sanguíneo (Radostits et al. 2002), porém é provável que os animais com menos de três anos portadores não manifestem seropositividade (Smith et al. 2020) e a deteção fecal será útil nestes casos (Radostits et al. 2002). O produtor poderá sempre optar por manter um efetivo fechado (Smith et al. 2020), produzindo os próprios animais de substituição (Truyers e Jennings 2016). A execução de um programa de controlo para PT permite identificar as explorações de baixo risco (Spickler 2017) para um comércio de animais mais seguro (World Organisation for Animal Health 2021a). A introdução de um sistema de certificação ajudará na redução do risco associado à compra de um animal em fase subclínica (Barkema et al. 2018), como é o caso do exemplo britânico e irlandês *Cattle Health Certification Standards* (CHeCS) que permite monitorizar, controlar e erradicar diversas doenças como a PT (Truyers e Jennings 2016).

O contato com a vida selvagem deve ser controlado de modo a diminuir o risco de transmissão de MAP a partir desta para os animais domésticos (Spickler 2017). As boas práticas de armazenamento do alimento, prevenção do acesso dos animais silváticos a este e outros materiais atrativos e controlo da sua entrada na exploração são essenciais neste ponto (Barkema et al. 2018). A transmissão esporádica entre ovinos e bovinos está documentada devendo ser aplicados cuidados para mitigar o contacto entre as duas espécies, particularmente no primeiro ano de vida (Truyers e Jennings 2016). A reintrodução de animais que estiveram em leilões ou feiras, onde existiu contacto com animais de estatuto desconhecido deve ser vista igualmente como uma via de introdução da doença na exploração (Truyers e Jennings 2016).

Os motivos para o controlo da PT incluem não só a melhoria da Saúde e Bem-estar Animal, como também a prevenção das quebras de produtividade, melhor relação com o mercado e mitigação do potencial risco para a Saúde Pública. Por outro lado, as principais razões para a não implementação de um programa de controlo incluem os motivos de natureza económica e a divergência de recursos para outras doenças prioritárias (Whittington

et al. 2019). Devido à percepção de uma baixa prevalência e à falta de sensibilização, esta doença não tem sido vista como uma prioridade ao longo dos anos (Roussel et al. 2005). O controlo de MAP num efetivo é um processo longo em que os produtores são desaconselhados a participar se não estiverem dispostos a permanecer pelo tempo necessário para obter resultados (Nielsen 2007), sendo que estes só poderão ser avaliados após pelo menos cinco anos (Barkema et al. 2018). O custo da testagem do efetivo pode não ser economicamente apelativo e os produtores podem revelar-se relutantes ao investimento (Radostits et al. 2002) tornando a disponibilidade de fundos um desafio (Behr et al. 2020). A grande maioria dos programas de controlo são voluntários, sendo que as considerações dos produtores pela saúde do efetivo e preocupações do consumidor poderão ser elementos motivadores para a participação nos mesmos (Barkema et al. 2018), assim como a existência de incentivos para a adesão (melhores preços, maior procura de animais ou produtos de origem animal, custos de testagem subsidiados) e penalidades para a não participação (restrições de mercado e movimento de animais) (Whittington et al. 2019). Entre os produtores o conhecimento sobre a doença é limitado (Roussel 2011) e o sucesso de um programa de controlo depende da boa comunicação entre o médico veterinário e o produtor de modo que este último mostre uma maior aderência às recomendações do primeiro (MacDonald-Phillips et al. 2022). A PT é apenas uma das várias doenças infecciosas transmitidas por via fecal-oral em bovinos e as medidas para o seu controlo podem igualmente beneficiar o controlo dessas outras doenças, como é o caso da salmonelose e diarreias neonatais (Barkema et al. 2018).

A vacinação não é uma prática comum no controlo da doença em bovinos (Whittington et al. 2019), apesar de promover proteção parcial com redução do número de casos clínicos e da excreção de MAP (Thomsen et al. 2012), contribuindo para a diminuição das perdas económicas e da transmissão (Behr et al. 2020), mas não prevenindo a infeção (Radostits et al. 2002). Apenas a prática da vacinação, sem implementação de alterações do manejo e melhoramento da higiene para reduzir a exposição dos animais jovens ao MAP, pode ser uma medida pouco bem-sucedida pois qualquer imunidade resultante da vacinação pode ser ultrapassada por uma forte exposição ao agente (Whittington et al. 2019; Smith et al. 2020). Existem desvantagens na vacinação, sendo a principal a interferência nos diagnósticos da TB e PT (Patton 2011). A vacinação induz uma resposta humoral com positividade aos testes serológicos, tornando-os não viáveis em animais vacinados devendo as explorações vacinadas recorrer aos métodos diretos de diagnóstico (Patton 2011). A interferência com a tuberculinização faz com que a vacinação para PT em bovinos seja uma medida proibida (Serrano et al. 2017) e a principal razão para a não vacinação de bovinos (Whittington et al. 2019). A IDTC é utilizada para diferenciar os animais infetados por *M. bovis* daqueles que respondem à tuberculina bovina como resultado da exposição a outras micobactérias (World Organisation For Animal Health 2022), em que os animais vacinados apresentam uma

resposta muito superior ao *M. avium* do que ao *M. bovis* (Patton 2011). No entanto, a resposta promovida pela vacina da PT à tuberculina aviária pode mascarar uma resposta à análoga mamífera positiva à TB, construindo um falso negativo (Coad et al. 2013). A administração da vacina está limitada à aprovação das entidades oficiais de Saúde Animal nos EUA e para tal é necessário cumprir as seguintes premissas: confirmação da infeção por MAP, teste de tuberculina negativo em todos os animais elegíveis da exploração e assinatura de um acordo para a utilização da vacina entre o proprietário e a entidade oficial (Patton 2011). Desenvolveram-se várias vacinas para a PT ao longo dos anos, entre vivas atenuadas e inativadas (Gupta et al. 2019). Em Portugal a única vacina autorizada é inativada para pequenos ruminantes (Gudair[®]). Existe uma vacina inativada para bovinos (Silirum[®]), mas devido à possibilidade de interferência com o teste de tuberculinização não está autorizada em Portugal.

3. Estudo retrospectivo sobre a prevalência de Paratuberculose em efetivos de bovinos de carne do Alentejo

3.1. Objetivos

Os objetivos desta dissertação são evidenciar a existência de PT nos efetivos de carne em extensivo através do cálculo da prevalência da doença e sensibilizar para a necessidade de formação dos bovinicultores e para importância da adição da doença à lista de preocupações dos médicos veterinários e entidades de Saúde Animal com a criação de um plano de controlo. Pretendeu-se, através de uma análise retrospectiva, avaliar a prevalência da PT, a distribuição geográfica e temporal dos casos positivos e analisar o quadro clínico e a metodologia de diagnóstico aplicada nas explorações de bovinos de carne em extensivo na área de ação do HVME nos distritos de Évora e Beja. Como atualmente não existe em Portugal um plano de controlo para a PT oficial, tencionou-se saber qual a posição dos produtores de bovinos de carne relativamente ao assunto e elaborar uma sugestão para o plano. A partir da abordagem a uma exploração considerada infetada, aplicou-se teoricamente o plano sugerido à exploração em questão de modo a exemplificar as etapas do plano.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Estudo retrospectivo sobre a prevalência de Paratuberculose em efetivos de bovinos de carne do Alentejo

Para a análise retrospectiva, os dados foram obtidos através da base de dados informática do HVME e do histórico de análises laboratoriais (laboratórios Exopol, Segalab e Coprapeç). Foram recolhidos 221 relatórios de testagem para a PT entre os anos de 2007 e 2022. Destes 221 relatórios todos aqueles cujas explorações não pertenciam aos distritos de Évora ou Beja ou que apresentavam falhas de informação (sem espécie ou sem identificação

da exploração) e ainda os referentes a ruminantes diferentes de bovinos de carne foram excluídos, reduzindo o período estudado para os anos de 2008 a 2022. No total foram excluídos 20 documentos, contanto esta dissertação com 201 relatórios (Anexo 1). Destes, foi possível extrair informações sobre a localização da exploração, tipo de análise, tipo de amostra, número de animais testados, resultado (negativo, positivo, duvidoso), idade e quadro clínico apresentado. As idades e sinais clínicos, quando ausentes no relatório, foram obtidos pela pesquisa do número de identificação animal na base de dados informática do HVME e acesso à ficha clínica respetiva. Esta base de dados informática apenas tem registos a partir de 2020, ano em que foi criada. As idades foram organizadas em duas subcategorias: animais testados com idade determinada e animais testados com idade e quadro clínico determinados. Estes relatórios, após a exclusão de dois animais retestados com ambos os resultados seropositivos, correspondem à testagem de um total de 951 animais em 71 explorações de bovinos de carne em regime extensivo clientes do HVME nos distritos de Évora e Beja. A prevalência individual foi determinada apenas a partir de testagem ELISA indireto, ou seja, para o cálculo foram considerados 947 dos 951 animais. As prevalências aparentes e verdadeiras foram determinadas com recurso à ferramenta *online* Epitools, utilizando os valores de Sen e Spe referidos no estudo de Diéguez et al. (2007) sobre a prevalência de anticorpos contra MAP na região da espanhola da Galiza (Sen 48,5%, Spe 98,9%) com um intervalo de confiança a 95%. O critério utilizado para classificar uma exploração como infetada foi a presença de pelo menos um animal positivo, incluindo métodos diretos e indiretos.

3.2.1.1. Animais testados

As testagens são referentes a bovinos de carne em extensivo pertencentes a explorações da área de ação do HVME nos distritos de Évora e Beja, onde se incluem animais com quadro clínico suspeito, animais de vacadas suspeitas com casos anteriormente confirmados e animais aleatórios (testagens pré-venda/leilão). O critério para determinar a testagem como de vacada foi a observação de vários animais da mesma exploração testados num curto espaço de tempo, enquanto o critério para estabelecer a testagem como pré-venda/leilão foi a sua associação com pelo menos uma das seguintes doenças, besnoitiose, IBR e BVD. Os animais que não se enquadraram em nenhuma das categorias referidas devido a falta de dados foram classificados como “Não Definido”.

3.2.1.2. Análise estatística

Os dados foram organizados com recurso ao Microsoft Office Excel®, onde foi realizada, através da criação de tabelas dinâmicas e gráficos de barras, a análise descritiva dos mesmos. O mapa de prevalência de PT na área de ação do HVME foi criado no mesmo *software*, onde apenas 7 dos 14 concelhos do distrito de Évora e 3 dos 14 do distrito de Beja foram incluídos uma vez que os restantes não apresentavam dados de testagens para a PT

no período estudado. A estatística descritiva da idade dos animais testados foi realizada no IBM SPSS Statistics®, onde foram determinados os percentis utilizados para a construção dos intervalos de idade. A análise estatística para verificar a associação entre variáveis foi realizada através deste último *software*, onde se aplicou o teste de Qui-Quadrado quando as frequências esperadas fossem superiores a 5 em todas as células numa tabela de 2x2 ou quando 80% das células de tabelas de maiores dimensões tivessem uma frequência esperada mínima de 5. Quando estes requisitos não se verificaram ou quando existiam células com frequência observada igual a zero recorreu-se ao Teste Exato de Fisher. Através da observação do histograma e teste de Shapiro-Wilk avaliou-se a normalidade da distribuição das idades dos animais testados. Como esta não seguia uma distribuição normal, a comparação entre as idades dos animais testados positivos e não positivos (onde se incluem negativos e duvidosos) foi realizada com recurso ao teste U de Mann-Whitney. Pelo mesmo *software* foi determinado o *Odds Ratio* (OR) através de uma regressão logística binária para a idade/faixa etária, tipo de ano e estação do ano. A análise dos registos fornecidos pelo Instituto Português do Mar e da Atmosfera sobre os índices *Palmer Drought Severity Index* permitiu averiguar quais os anos considerados de seca e a partir destes determinar a influência da seca na dinâmica da doença e aparecimento de animais positivos a PT. Foi selecionado um valor de significância de $p < 0,05$ para todos os testes realizados.

3.2.2. Estudo de caso de uma exploração considerada infetada com Paratuberculose

Durante o estágio foram confirmados, num período inferior a um mês, dois animais com PT na mesma exploração. Para a descrição da exploração e do quadro clínicos destes animais foram preenchidas duas folhas, uma de consulta com os parâmetros do exame físico (Anexo 2) e outra para caracterização da exploração (Anexo 3). A exploração em questão, localizada no concelho de Alvito, distrito de Beja, caracteriza-se pelo regime extensivo com uma área total de 390 hectares onde coabitam perto de 200 bovinos adultos (195 fêmeas e 5 machos) com idade média de 10 anos, de Raça Cruzado de Carne com influências *Salers*. O terreno encontra-se dividido em parcelas de 20 hectares o que permite a divisão da vacada em grupos com cerca de 70 animais: novilhas, vacas gestantes e vacas paridas. Os animais doentes são alojados numa área separada de 5 hectares. Na exploração apenas existe esta vacada, não havendo criação simultânea de outros ruminantes. Os animais estão todo o ano em pastagem, sendo esta a base da sua alimentação. Entre os meses de setembro e fevereiro ocorre suplementação alimentar com feno e tacos, sendo este distribuído no solo e em simultâneo a animais jovens e adultos. Estes são armazenados em locais limpos e afastados de áreas conspurcadas e o abeberamento dos animais é garantido por águas de pequenos lagos e barragens testadas para os parâmetros microbiológicos incluídos no guia de boas práticas publicado pela DGAV sobre a água adequada para alimentação animal. Existe a

prática de mudança dos animais de parcela de pastagem e alteração regular dos locais dos comedouros e bebedouros nos currais. Em termos de manejo reprodutivo, efetua-se exclusivamente a monta natural e não existe uma época de partos definida nem é realizado um controlo reprodutivo do efetivo. Os touros encontram-se sempre com a vacada o que resulta numa distribuição de partos durante todo o ano, com maior concentração no mês de outubro sendo o intervalo entre partos médio de 12 a 14 meses. Os neonatos ingerem o colostro diretamente das mães e na necessidade de administrar colostro à mão este tem origem na exploração. As fêmeas de substituição são nascidas e criadas na exploração enquanto os machos são comprados sendo testados para PT, BVD, IBR e besnoitiose. Os bezerros saem da exploração ao desmame, realizado aos 6 a 7 meses com peso médio de 200kg. A profilaxia da exploração inclui a desparasitação semestral com ivermectina e vacinação contra clostridioses, BVD e IBR. Relativamente à biossegurança externa, há o registo dos movimentos dos animais, veículos e equipamentos e existe uma zona de estacionamento de veículos externos afastada dos animais. A quarentena é praticada aos novos animais (touros), no mínimo de 30 dias. Dentro das medidas de biossegurança interna, a exploração pratica a limpeza regular das alfaias usadas para a distribuição de alimento e das mangas e currais com remoção de estrume. Estabelece também uma ordem de trabalhos em que os animais mais novos e/ou saudáveis são os primeiros a ser tratados. Por outro lado, a ausência de rodilúvio, da desinfecção de baldes e tetinas utilizados para a alimentação, de vedações duplas/muro contribuem para a degradação da biossegurança, quer externa e interna, da exploração.

3.2.3. Elaboração de uma sugestão de um plano de controlo de Paratuberculose em explorações de bovinos de carne em regime extensivo

De modo a entender o interesse dos produtores num plano voluntário de controlo para PT e quais as suas motivações, foi aplicado a estes, entre o dia 1 e 31 de dezembro de 2022, um questionário (Anexo 4) construído com base nos documentos de Rangel et al. (2015) e Zoche-Golob et al. (2021). O questionário foi realizado de forma presencial, distribuído pela autora da dissertação aquando da deslocação à exploração para consultas, serviços de profilaxia ou serviços OPSA. A sugestão do plano de controlo de PT para uma exploração de vacas aleitantes com objetivo de produção de bezerros, posteriormente aplicada teoricamente à exploração descrita anteriormente, foi criada com base na revisão bibliográfica efetuada, nos programas italiano (Centro di Referenza Nazionale per la Paratuberculosis 2022), irlandês (Animal Health Ireland 2021), neozelandês (Johne's Disease Research Consortium and DairyNZ 2015), dinamarquês (Nielsen et al. 2006; Nielsen 2007) e americano (Animal and Plant Health Inspection Service 2010) e nos documentos CHeS (Cattle Health Certification

Standards 2021) e *How to Do Risk Assessments and Management Plans for Johne's Disease* (United States Animal Health Association 2002).

3.3. Resultados

3.3.1. Estudo retrospectivo sobre a prevalência de Paratuberculose em efetivos de bovinos de carne do Alentejo

Durante o período estudado foram testados 953 animais, entre os quais existem dois animais retestados o que altera o número total de animais para 951. Destes, 100 acusaram positivo (10,5%), 844 negativo (88,7%) e 7 duvidoso (0,7%) (Tabela 4).

Tabela 4. Resultados das análises para a PT entre os anos de 2008 e 2022 organizados por tipo de testagem (n=951)

| Categoria de testagem | Positivo | Negativo | Duvidoso | Total de animais por Categoria |
|-------------------------|----------|----------|----------|--------------------------------|
| Aleatório | 3 | 46 | 1 | 50 |
| Não Definido | 50 | 245 | 3 | 298 |
| Quadro clínico suspeito | 7 | 27 | 0 | 34 |
| Vacada Suspeita | 40 | 526 | 3 | 569 |
| Total | 100 | 844 | 7 | 951 |

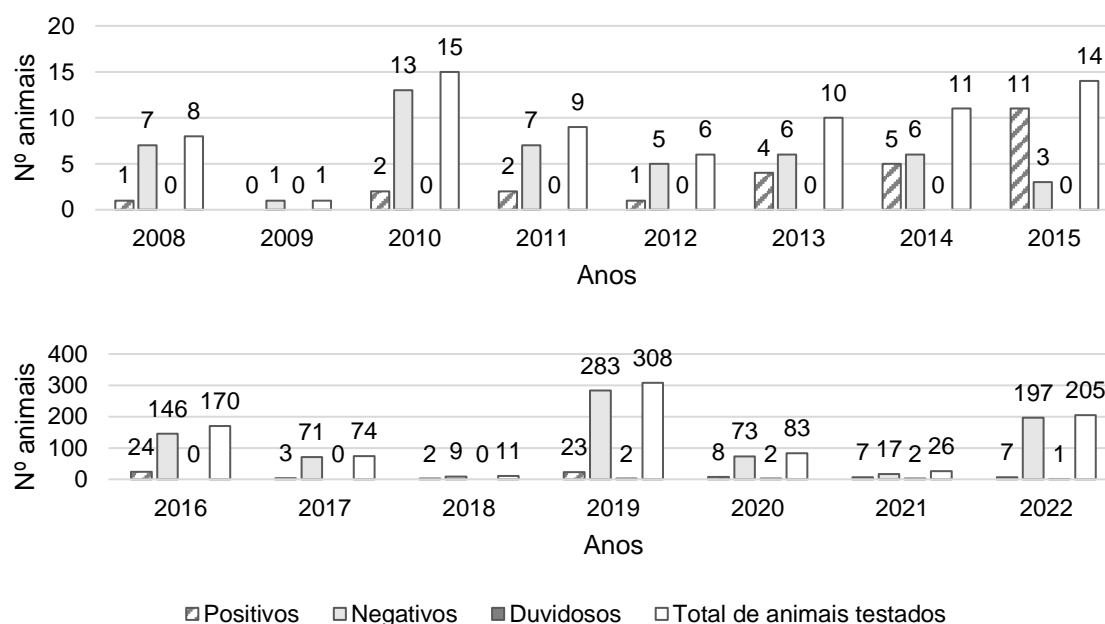
A classificação da testagem (Aleatório, n=50; Quadro clínico suspeito, n=34; Vacada suspeita, n=569) foi possível em 653 dos 951 animais, no entanto 31,3% (298/951) destes encontra-se na categoria de “Não Definido” devido à ausência de informação sobre o quadro clínico ou motivo da testagem no relatório ou ficha clínica. O maior número de animais testados (n=569) encontra-se na categoria “Vacada suspeita”, pois este tipo de testagem contribui para uma entrada de um grande número de animais num curto espaço de tempo. A mesma categoria é aquela onde existe maior número de animais positivos (n=40), com exceção da categoria “Não definido” (n=50) (Tabela 4). As prevalências aparentes e verdadeiras calculadas para cada uma das categorias variaram entre 6 e 20,6% e entre 10,3 e 41,1%, respetivamente. A categoria “Quadro clínico suspeito” foi aquela em que ambas as prevalências foram superiores (Tabela 5).

Tabela 5. Prevalência aparente e verdadeira de PT por categoria de testagem (PA: prevalência aparente; PV: prevalência verdadeira; IC: intervalo de confiança)

| | Nº Seropositivos | PA (IC 95%) | PV (IC 95%) |
|----------|--------------------------------|----------------------|-----------------------|
| Testagem | Aleatório (n=50) | 3 (2,1%; 16,2%) | 6% (1,2%; 32,9%) |
| | Não Definido (n=294) | 50 (13,1%; 21,7%) | 17% (25,2%; 43,5%) |
| | Quadro clínico suspeito (n=34) | 7 (10,4%; 36,8%) | 20,6% (18,5%; 78%) |
| | Vacada suspeita (n=569) | 40 (5,2%; 9,4%) | 7% (8,6%; 17,6%) |
| | Total (n=947) | 100 | |

As prevalências aparentes e verdadeiras a nível individual foram de 10,6% (IC 95%: 8,8%; 12,7%) e 20% (IC 95%: 16,1%; 24,5%), respetivamente. Perante a análise dos relatórios inferiram-se 71 explorações testadas por métodos diretos e indiretos, onde 26 destas (37%) apresentaram apenas um animal testado durante o período estudado. Das 71 explorações, 30 (42%) acusaram pelo menos um resultado positivo, onde 37% (11/30) verificaram mais que um animal positivo e 63% (19/30) apenas apresentaram um positivo. Entre os anos de 2008 e 2022, todos os anos, exceto 2009, registaram animais positivos. O ano de 2019 foi onde se verificou o maior número de animais testados (n=308), seguido pelo ano de 2022 (n=205) (Gráfico 3).

Gráfico 3. Distribuição anual dos resultados dos animais testados para PT pedidas pelo HVME entre os anos de 2008 e 2022 (n=951)



Foram testados, através de ELISA indireto em soro sanguíneo, quatro efetivos entre os anos de 2008 e 2022 onde a prevalência aparente dentro dos mesmos variou entre 2,3 e 15,5%. O valor da prevalência verdadeira variou entre 2,6 e 30,4% (Tabela 6).

Tabela 6. Prevalência aparente e verdadeira de PT dentro dos efetivos completos testados (PA: Prevalência aparente; PV: Prevalência verdadeira; IC: intervalo de confiança)

| Exploração | Nº animais testados | Nº positivos | PA (IC 95%) | PV (IC 95%) |
|------------|---------------------|--------------|----------------------|----------------------|
| 1 | 129 | 20 | 15,5% (10,3%; 22,7%) | 30,4% (18,7%; 45,8%) |
| 42 | 252 | 15 | 6% (3,6%; 9,6%) | 10,2% (5%; 18%) |
| 52 | 17 | 1 | 5,9% (1,1%; 27%) | 10,1% (0%; 58,3%) |
| 70 | 171 | 4 | 2,3% (0,9%; 5,9%) | 2,6% (0%; 10,4%) |

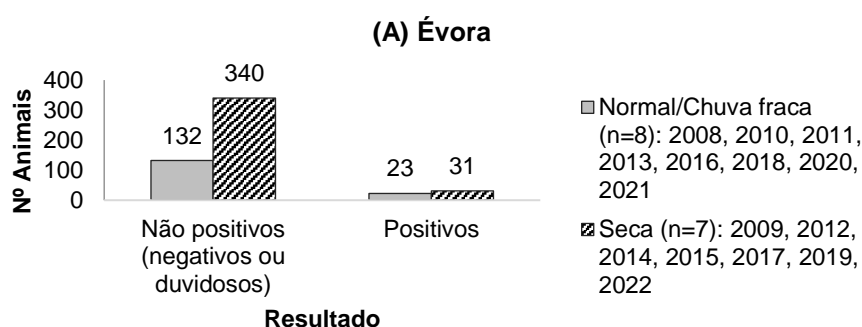
Verificou-se uma associação significativa na ocorrência de casos clínicos positivos e as estações do ano ($p=0,03$) (Anexo 5), onde a proporção de positivos foi de 60% (Tabela 7). A estação primaveril apresenta uma chance de positividade para os casos suspeitos 10,5 vezes superior quando comparada com a estação outonal ($p=0,047$; $OR=10,5$) (Anexo 5), que foi aquela onde se verificou o maior número de positivos totais ($n=63$). Este valor superior no outono poderá ser justificado pela testagem de vacadas suspeitas realizadas durante esta altura do ano, no entanto foi nos meses de verão em que a proporção de positivos totais foi maior (19,2%) (Tabela 7).

Tabela 7. Distribuição dos animais testados e dos resultados positivos para PT de acordo com as estações do ano

| | Total | | Quadro clínico suspeito | |
|---------------------------|----------|------------|-------------------------|-----------|
| | Testados | Positivos | Testados | Positivos |
| Inverno (dez, jan, fev) | 91 | 10 (11%) | 8 | 0 (0%) |
| Primavera (mar, abr, mai) | 65 | 12 (18,5%) | 5 | 3 (60%) |
| Verão (jun, jul, ago) | 78 | 15 (19,2%) | 5 | 2 (40%) |
| Outono (set, out, nov) | 717 | 63 (8,8%) | 16 | 2 (12,5%) |

Na área de ação do HVME, nos distritos de Évora e Beja, foram detetados 54 e 46 animais positivos, respetivamente, durante o período estudado. No entanto, ao considerar os anos de seca, nestes o distrito de Évora apresentou 31 animais positivos (57% dos casos positivos) (Gráfico 4A), enquanto em Beja o número foi de 22 casos positivos (48%) (Gráfico 4B).

Gráfico 4. Distribuição dos resultados de testagem para PT nos distritos de Évora (A) e Beja (B) de acordo com o tipo de ano (normal/chuva fraca ou seca)



Nº total de positivos: 54
 %Positivos em anos de seca: 57% (31/54)
 Nº médio de positivos em anos de seca: 4,4
 Nº médio de positivos em anos normais/chuva fraca: 2,8

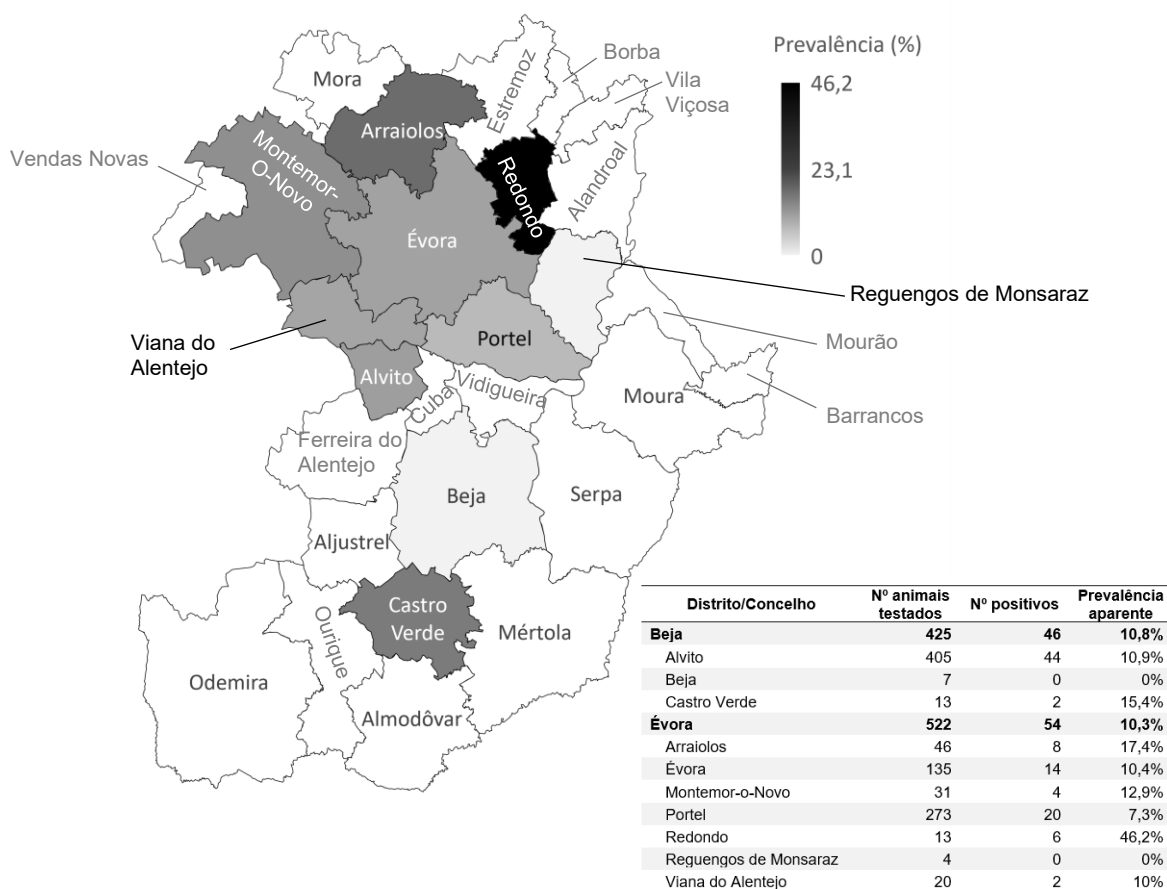


Nº total de positivos: 46
 %Positivos em anos de seca: 48% (22/46)
 Nº médio de positivos em anos de seca: 2,2
 Nº médio de positivos em anos normais/chuva fraca: 4,8

Nos dois distritos foi verificada uma associação significativa entre o tipo de ano (seca ou normal/chuvas fracas) e a ocorrência de casos positivos (Évora, $p=0,026$; Beja, $p=0,017$). Constatou-se ainda, nos dois distritos, uma menor chance de positividade nos anos de seca (Évora $p=0,027$; $OR=0,523$; Beja $p=0,019$; $OR=0,479$) quando comparado com os anos normais/chuvas fracas (Anexo 6). O número médio de casos positivos nos anos de seca foi superior ao valor para os anos normais/chuva fraca no distrito de Évora (4,4 e 2,8, respetivamente). Já no distrito de Beja, a situação foi inversa (2,2 e 4,8).

O Gráfico 5 representa o mapa de prevalência de PT durante o período estudado na área de influência do HVME nos distritos de Évora e Beja, revelando um maior valor de prevalência no concelho de Redondo (42,6%). O maior número de casos positivos está registado no concelho de Alvito, distrito de Beja. Focando no distrito de Évora, sede do HVME, apenas 7 dos 14 concelhos do distrito foram incluídos, uma vez que os restantes não apresentavam dados de testagem. Destes sete, seis apresentam positividade (86%) sendo o concelho de Portel aquele com mais positivos e o concelho do Redondo, novamente, o com maior valor de prevalência.

Gráfico 5. Mapa de prevalência de Paratuberculose na área de ação do HVME nos distritos de Évora e Beja (concelhos a branco: sem dados de testagem no período estudado)



Para um total de 951 animais testados existem 956 testes realizados, justificado pela existência de animais testados com mais do que uma metodologia (Anexo 1). Destes 956 testes, 947 foram de ELISA indiretos para pesquisa de anticorpos no soro sanguíneo. Os métodos diretos apenas aparecem nove vezes. Nesta última categoria inclui-se o PCR, realizado três vezes. A metodologia ELISA revelou a existência de 100 animais seropositivos, 840 seronegativos e 7 duvidosos (Tabela 8).

Tabela 8. Resultados para PT por tipo de análise (n=956)

| Tipo de teste | Nº Positivos | Nº Negativos | Nº Duvidosos |
|-------------------------------------|--------------|--------------|--------------|
| PCR | 0 | 3 | 0 |
| Imunoperoxidase | 0 | 1 | 0 |
| Imunofluorescência | 0 | 3 | 0 |
| ELISA indireto | 100 | 840 | 7 |
| Coloração fluorescente com auramina | 0 | 2 | 0 |

Nas condições já descritas, foi possível determinar a idade de 112 animais testados. Estas variaram entre 0,33 (4 meses) e 16 anos (média 4,1 anos, DP 3,8 anos), sendo a idade mais frequente os 2 anos (Anexo 7). A faixa etária inferior ou igual a 2 anos foi a mais representada (n=55) (Tabela 9). A idade dos animais positivos (n=18) variou entre 2 e 13 anos (média 5,9 anos, DP 2,8 anos) e a idade mais frequente foi de 6 anos (Anexo 7).

Tabela 9. Distribuição dos resultados de testagem para PT (negativo, positivo e duvidoso) de acordo com o intervalo de idades em anos (n=112)

| | Faixa etária | | | | Total |
|-----------------|--------------|------------|------------|---------|-------|
| | ≤2 anos |]2;3] anos |]3;5] anos | >5 anos | |
| Positivo | 1 | 3 | 4 | 10 | 18 |
| Negativo | 54 | 14 | 8 | 17 | 93 |
| Duvidoso | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| Total | 55 | 18 | 12 | 27 | 112 |
| Seroprevalência | 1,9%* | 16,7% | 33,3% | 37% | |

*Consideraram-se apenas os 53 animais testados por ELISA (exclusão de 2 animais testados por PCR fecal)

Verificou-se uma diferença significativa ($p=0,001$) entre as idades dos animais positivos ($med=6$ anos) e não positivos ($med=2$ anos) a PT. Observou-se ainda uma maior chance de positividade (incluindo métodos diretos e indiretos) com o avançar da idade ($p=0,038$; $OR=1,129$), onde os animais com mais de 5 anos apresentaram a maior chance ($p=0,001$; $OR=31,765$) (Anexo 8). A seroprevalência mostrou-se crescente ao longo das faixas etárias sendo a faixa superior a 5 anos a com maior valor (37%, Tabela 9). O quadro clínico encontrava-se descrito em 34 animais, testados por ELISA (Anexo 9), onde os sinais clínicos e/ou observações mais reportados foram a diarreia crónica (25 animais), caquexia (23 animais) e a ausência de resposta a tratamento anterior (4 animais) (Tabela 10A). Destes, apenas 7 foram positivos (21%) e os sinais clínicos e/ou observações predominantes foram a diarreia crónica (6 animais), caquexia (6 animais) e a não resposta a tratamento anterior (3 animais) (Tabela 10B).

Tabela 10. Sinais clínicos e/ou observações reportados pelos animais suspeitos testados para PT (n=34) (A) e reportados pelos animais suspeitos seropositivos (n=7) (B)

| (A) | | (B) | |
|-------------------------------------|------------|-------------------------------------|------------|
| Sinal clínico e/ou observação | Nº animais | Sinal clínico e/ou observação | Nº animais |
| Diarreia crónica | 25 | Diarreia crónica | 6 |
| Caquexia | 23 | Caquexia | 6 |
| Sem resposta ao tratamento anterior | 4 | Sem resposta ao tratamento anterior | 3 |
| Hipertermia ligeira | 3 | Hipertermia ligeira | 2 |
| Edema submandibular | 3 | Edema submandibular | 2 |
| Ectoparasitas | 2 | Hálito cetónico | 2 |
| Hálito cetónico | 2 | Mucosas pálidas | 2 |
| Mucosas pálidas | 2 | Pelo em mau estado/baço | 2 |
| Pelo em mau estado/baço | 2 | | |
| Melena | 1 | | |
| Metrite | 1 | | |
| Vaca caída | 1 | | |
| Anorexia | 1 | | |
| Aumento da motilidade intestinal | 1 | | |

Verificou-se uma associação significativa entre o resultado e presença de certos sinais clínicos/observações, tais como o animal não responder ao tratamento anterior ($p=0,021$), apresentar hálito a acetona, mucosas pálidas e pelo em mau estado ($p=0,037$) (Anexo 10).

Apenas 27 animais tinham descritos o quadro clínico e a idade (Anexo 9). As idades destes encontravam-se distribuídas entre 1 e 14 anos de idade (média 5,6 anos, DP 4 anos) e a idade mais frequente foi de 2 anos (Anexo 7). A maioria dos animais estão nas faixas etárias até aos 6 anos ($n=21$) (Tabela 11). Ao contrário da totalidade dos animais testados, nos animais suspeitos não se verificou diferença significativa ($p=0,251$) entre as idades dos indivíduos positivos ($med=6$ anos) e não positivos ($med=4$ anos) (Anexo 11). Os sinais clínicos mais registados foram a diarreia crónica (17 animais) e a caquexia (17 animais) (Tabela 12A).

Tabela 11. Distribuição dos resultados da testagem para PT de acordo com o intervalo de idades em anos nos animais com idade e quadro clínico determinado (n=27)

| | Faixa etária (suspeitos) | | | | Total |
|----------|--------------------------|------------|------------|---------|-------|
| | ≤2 anos |]2;4] anos |]4;6] anos | >6 anos | |
| Negativo | 7 | 6 | 2 | 6 | 21 |
| Positivo | 0 | 1 | 5 | 0 | 6 |
| Total | 7 | 7 | 7 | 6 | 27 |

Destes 27 animais, 6 foram seropositivos (22%) estando os animais distribuídos entre os 3 e 6 anos de idade (média 5,3 anos, DP 1,2 anos). A idade mais frequente foi de 6 anos (Anexo 7), estando a maioria destes animais distribuídos na faixa etária dos 4 aos 6 anos (Tabela 11). Os sinais clínicos mais representados foram a diarreia crónica (5 animais) e caquexia (5 animais) (Tabela 12B).

Tabela 12. Quadro clínico apresentado pelos animais suspeitos a PT com idade determinada (n=27) (A) e pelos animais suspeitos positivos com idade determinada (n=6) (B)

| (A) | | (B) | |
|-------------------------------------|------------|-------------------------------------|------------|
| Sinal clínico e/ou observação | Nº animais | Sinal clínico e/ou observação | Nº animais |
| Diarreia crónica | 17 | Diarreia crónica | 5 |
| Caquexia | 17 | Caquexia | 5 |
| Sem resposta ao tratamento anterior | 3 | Sem resposta ao tratamento anterior | 2 |
| Hipertermia ligeira | 3 | Hipertermia ligeira | 2 |
| Edema submandibular | 3 | Edema submandibular | 2 |
| Ectoparasitas | 2 | Hálito cetónico | 2 |
| Hálito cetónico | 2 | Mucosas pálidas | 2 |
| Mucosas pálidas | 2 | Pelo em mau estado | 2 |
| Pelo em mau estado | 2 | | |
| Metrite | 1 | | |
| Vaca caída | 1 | | |
| Anorexia | 1 | | |
| Aumento da motilidade intestinal | 1 | | |

3.3.1. Estudo de caso de uma exploração considerada infetada com Paratuberculose

3.3.1.1. Descrição dos casos clínicos

Em setembro de 2022 foram avaliadas em consulta duas fêmeas bovinas de raça Cruzada de Carne com influência *Salers* com 6 anos de idade pertencentes ao grupo das fêmeas “paridas”. Estes animais, nascidos na exploração e sem qualquer relação de parentesco entre si, apresentavam uma história clínica de fraqueza, perda de peso e diarreia crónica intermitente. Ao exame físico, os animais apresentavam uma baixa condição corporal (2 em 5) e evidência de edema submandibular, apesar de permanecerem alerta e com comportamento normal. O pelo observava-se em mau estado (baço) e a zona posterior encontrava-se bastante conspurcada (Figura 3A). Verificou-se a presença de diarreia líquida, esverdeada e com espuma (Figura 3B). O restante exame físico encontrava-se normal, exceto a palidez das mucosas e a presença de hálito cetónico (Anexo 2). Neste caso, os diagnósticos diferenciais colocados incluíram parasitismo gastrointestinal (diarreia e perda de peso), hemoparasitoses por *Theileria*, *Anaplasma* e *Babesia* spp (palidez) e PT (diarreia e perda de peso).



Figura 3. Vaca positiva para PT com perda de peso crónica (A) e diarreia profusa (B) (original)

O tratamento instituído foi decidido de acordo com o quadro clínico e DD considerados. Este incluiu o antibiótico oxitetraciclina (Oxymycin® LA 300, 1ml/15kg) via intramuscular, anti-inflamatório carprofeno (Rimadyl, 1ml/35kg) via subcutânea e vitaminas intramusculares (Duphafrol SE®, 20ml). Os animais foram igualmente desparasitados com ivermectina (Noromectin®, 1ml/50kg). Apesar do tratamento, os animais não apresentaram melhorias. Os exames complementares realizados incluíram esfregaço sanguíneo com coloração *Diff-Quick*, coprologia pelo método de *Willis* (flutuação) e ELISA para pesquisa de anticorpos anti-MAP no sangue. Destes apenas se detetou positividade ao último. O produtor, perante o cenário, optou por separar os animais positivos e testar por ELISA todos os animais com mais de um ano de idade. Dos 171 animais testados, verificaram-se 4 seropositivos e 1 duvidoso (Anexo 1, Exploração 70). As prevalências aparente e verdadeira foram de 2,3% e 2,6%, respetivamente. A recomendação foi o refugo dos animais positivos e duvidosos assim como

da sua descendência, não guardando estes animais para reposição do efetivo. A decisão do produtor foi de encontro à recomendação médico-veterinária.

3.3.2. Elaboração de uma sugestão de um plano de controlo de Paratuberculose em explorações de bovinos de carne em regime extensivo

O inquérito relativo à aplicação de um plano voluntário de controlo para PT (Anexo 4) foi preenchido por oito produtores. Os produtores inquiridos caracterizam-se pelo regime extensivo de bovinos de carne (sete com objetivo de venda de bezerros ao desmame e uma com objetivo de criação de raça pura) e vacadas superiores a 50 animais. São explorações onde o proprietário possui algum tipo de formação superior na área da produção animal e onde existe, pelo menos, um outro trabalhador (vaqueiro) geralmente sem formação. As explorações dos inquiridos localizam-se nos distritos de Évora (sete explorações) e Beja (uma exploração). No início de cada inquérito os produtores foram questionados se sabiam o que era a PT, sendo que a maioria desconhecia o termo, associando apenas a descrição de “diarreia das vacas velhas”. Através do inquérito apenas um dos oito produtores mostrou ter conhecimento da possível relação da PT com a DC e cinco dos oito inquiridos já tiveram casos positivos na sua exploração. Todos os produtores se mostraram interessados em aplicar um plano voluntário de controlo, vigilância e erradicação para a PT. As principais motivações para tal incluíram a preservação da Saúde Animal (100%), o aumento da produtividade (87,5%), a preservação da Saúde Pública (62,5%) e os incentivos financeiros (62,5%). Os motivos de facilidade de compra/venda de reprodutores (50%) e ameaça à Segurança dos Alimentos (37,5%) foram os menos selecionados (Tabela 13).

Tabela 13. Resultados o inquérito um Plano de Vigilância, Controlo e Erradicação de PT

| Motivação para aplicar o programa | Nº de seleções |
|--|-----------------------|
| Preservação da Saúde Animal | 8 (100%) |
| Aumentar a produtividade | 7 (87,5%) |
| Preservação da Saúde Pública | 5 (62,5%) |
| Incentivos financeiros | 5 (62,5%) |
| Facilitar a compra/venda de reprodutores | 4 (50%) |
| Ameaça à Segurança dos Alimentos | 3 (37,5%) |

A intenção deste subcapítulo é a elaboração de um programa de controlo de PT para explorações de vacas aleitantes com objetivo comercial de venda de bezerros pós-desmame. Devido à falta de um protocolo oficial, pretende-se fornecer diretrizes para o produtor que deseja reduzir a prevalência da doença na sua exploração e prevenir a entrada da mesma no efetivo. O programa encontra-se dividido nas seguintes fases:

Fase 1: Caracterização da exploração, história progressiva de Paratuberculose e testagem e cálculo de prevalência de infecção no efetivo

a) Caracterização da exploração

A recolha de dados sobre a exploração (Anexo 12) irá permitir ao médico veterinário assistente uma maior compreensão do estado de saúde do efetivo. Estas informações irão auxiliar o desenvolvimento do plano sanitário, havendo interligação entre as práticas de manejo correntes e o controlo da doença. É ainda sugerido o registo das perdas de produtividade (Anexo 13) verificadas nos últimos 5 anos com o intuito de determinar o possível impacto anual da doença na exploração. Deverá ser investigada a história progressiva de PT, permitindo ao profissional veterinário compreender se a exploração já está infetada ou potencialmente infetada, e a entrada de novos animais (Anexo 13).

b) Testagem dos animais e estimativa da prevalência de infecção

Nas explorações de bovinos de carne com objetivo de venda de bezerros pós-desmame deve-se proceder à colheita de sangue de todos os animais com mais de dois anos de idade para testagem ELISA indireto para pesquisa de anticorpos com posterior cálculo da prevalência de infecção pela fórmula: $\text{prevalência} = (\text{número de animais positivos} / \text{número de animais testados}) \times 100$. De acordo com o valor de prevalência obtido a classificação faz-se em três níveis: baixa ($\leq 5\%$), moderada (6 a 19%) e alta ($\geq 20\%$) (Centro di Referenza Nazionale per la Paratuberculosis 2022). A testagem ELISA não deverá ser realizada nos 90 dias seguintes à prova de IDTC para diagnóstico de TB devido a possibilidade de reação cruzada e aparecimento de falsos positivos a PT. Nos casos em que o descrito se suceda, a retestagem deverá ser feita um mês após a inoculação.

Fase 2: Avaliação de risco

Permite a identificação, em cada fase de criação, dos fatores de risco para a disseminação da infecção específicos da exploração. A avaliação prevê uma pontuação para cada fase: Parto, Criação do bezerro, Bezerros pós-desmame, Bovinos com mais de 1 ano de idade, Bovinos com mais de 2 anos de idade e Animais introduzidos. O risco, assim como a pontuação, é maior em bezerros e progressivamente menor para animais mais velhos devido à diminuição da suscetibilidade à infecção com a idade. Após o preenchimento dos inquéritos será possível obter uma avaliação numérica associada ao risco de cada fase e consequentemente determinar quais as fases a priorizar. As medidas devem ser aplicadas de modo a reduzir cada risco prioritário em 85%. A avaliação de risco deve ser revista anualmente de modo a averiguar o resultado das alterações de manejo e quais os pontos ainda a melhorar.

Os inquéritos da avaliação de risco foram adaptados a partir do manual para o controlo de PT em bovinos de carne publicado pelo centro de referência italiano para a doença (*Manuale per il controllo della Paratuberculosis negli allevamenti di bovini da carne*). As matrizes destes inquéritos estão dispostas nos anexos desta dissertação (Anexo 14 a 20).

Fase 3: Plano sanitário

Esta última fase caracteriza-se pela criação de um plano sanitário onde são estipuladas as medidas a adotar na exploração de modo a prevenir a introdução e disseminação da infeção. As medidas são definidas pela prevalência calculada, fatores de risco determinados, objetivos do produtor e prioridade atribuída relativamente a outras doenças. De seguida apresentam-se as medidas recomendadas para redução da probabilidade de exposição ao agente de acordo com a fase de produção. Durante a seguinte leitura algumas considerações devem ser tomadas, tal como a limpeza e desinfeção dos materiais e a definição de pastagem ou parque “limpo”. Os materiais devem ser limpos da matéria mais grosseira e humedecidos antes da aplicação de desinfetante (álcool etílico a 70%, desinfetantes cresolados, hipocloreto de cálcio) (Coelho e Rodrigues 2007); o termo “limpo” define uma pastagem/parque que permaneceu mais de 12 meses sem animais. Em alternativa, quando não é possível a execução dos 12 meses, poderá recorrer-se a um descanso da pastagem de pelo menos 3 ou 6 meses (Department for Environment Food and Rural Affairs 2004; Whittington et al. 2004). Idealmente, os parques/currais devem ter o solo revirado regularmente.

As medidas gerais sugeridas para cada fase de criação e para manejo de alimento, água, pastagens e animais introduzidos estão dispostas nas Tabelas 14 a 19.

Parto

Tabela 14. Medidas de manejo para controlo de PT na fase de Parto

| Objetivo: Proporcionar um ambiente limpo e seco ao neonato e progenitora. | |
|--|---|
| Geral | Animais positivos |
| Preferência pela criação de um parque de partos: <ul style="list-style-type: none"> - Considerar parques interiores; - Considerar parques individuais; - Se parque múltiplo, garantir uma área adequada; - Se no exterior: área adequada, minimizar lamas e acumulação de estrumes (criação de zonas protegidas das intemperes); | Criação de um parque de partos exclusivo para animais positivos, separado da restante vacada (parques individuais ou múltiplos, interiores ou exteriores); Extrator obstétrico (macaco), cordas e outros equipamentos utilizados na resolução de partos distócicos devem ser devidamente limpos e desinfetados após cada utilização; |

Tabela 14. Medidas de manejo para controlo de PT na fase de Parto (continuação)

| Geral | Animais positivos |
|--|---|
| <p>Manutenção da limpeza das vacas no período perinatal, evitando a contaminação fecal do úbere através da limpeza do parque e, se possível, tosquiando úberes e caudas;</p> <p>Não usar a zona de partos como enfermaria;</p> <p>Após a época de partos, o parque deverá permanecer, idealmente, pelo menos 12 meses sem animais.</p> | <p>Uso de utensílios de limpeza e alimentação (pás, forquilhas, manjedouras, bebedouros) exclusivos para animais positivos;</p> <p>Após a época de partos, a terra do parque deverá ser revirada.</p> |

Criação do bezerro

Tabela 15. Medidas de manejo para controlo de PT na fase de Criação do bezerro

| Objetivo: Evitar o contacto do bezerro com material, ambiente e adultos potencialmente infetados. | |
|--|--|
| Geral | Animais positivos |
| <p>Após o parto, transferir o mais rapidamente possível o par cria-progenitora para uma zona de pastagem “limpa”;</p> <p>Este parque deve ser amplo, com adequada densidade animal;</p> <p>Manutenção da limpeza do úbere da progenitora;</p> <p>Na necessidade de administração de colostro à mão deve-se dar preferência ao colostro artificial, seguido de colostro pasteurizado de vacas negativas ou oriundo de explorações de estatuto negativo para a PT, com atenção à higiene na recolha do colostro/leite;</p> <p>Evitar uso de pools de colostro ou leite;</p> <p>Todos os utensílios utilizados para a alimentação de bezerros (tetinas, baldes, tubos) devem ser limpos e desinfetados antes e depois de cada utilização.</p> | <p>Após o parto, o par fêmea-bezerro deve ser transferido para pastagens exclusivas, sempre separados fisicamente dos animais negativos;</p> <p>Exclusividade de utensílios para a alimentação da descendência de fêmeas positivas e desinfecção destes antes e depois de cada utilização.</p> |

Bezerros pós-desmame

Tabela 16. Medidas de manejo para controlo de PT na fase de Bezerro pós-desmame

| Objetivo: Prevenir o contacto com animais infetados e respetivas fezes e a contaminação fecal do alimento e fontes de água. | |
|--|---|
| Geral | Animais positivos |
| <p>Evitar o contacto direto ou indireto com animais adultos e respetivas fezes através da criação de currais separados;</p> <p>Animais com destino a engordas devem ser colocados em currais exclusivos para este grupo (parque de bezerros desmamados);</p> | <p>Transferir os animais desmamados para um curral exclusivo para posterior saída da exploração;</p> <p>Evitar o contacto entre estes animais e a restante vacada e não permitir que as suas fezes contaminem o ambiente dos animais negativos;</p> |

Tabela 16. Medidas de manejo para controlo de PT na fase de Bezerro pós-desmame (continuação)

| Geral | Animais positivos |
|--|--|
| <p>Colocação dos bezerros desmamados destinados a animais de substituição em pastagens “limpas”;</p> <ul style="list-style-type: none"> - Uso de equipamentos exclusivos para este grupo de animais e limpeza e desinfecção regular dos mesmos; - Uso de indumentária limpa aquando do contacto com estes animais; <p>Não utilizar sobras de alimento de animais adultos para estes animais.</p> | <p>Uso de indumentária exclusiva aquando do contacto com estes animais;</p> <p>Não usar estes animais para reposição do efetivo.</p> |

Bovinos com mais de 1 ano

Tabela 17. Medidas de manejo para controlo de PT na fase de Bovinos com mais de 1 ano (animais de substituição)

| Objetivo: Prevenir o contacto com animais infetados e respetivas fezes e a contaminação fecal do alimento e fontes de água. | |
|--|--|
| Geral | Animais positivos |
| <p>Evitar o contacto direto ou indireto com animais adultos e respetivas fezes através da criação de currais separados;</p> <p>Manutenção destes animais em pastagens “limpas”;</p> <p>Uso de equipamentos exclusivos para este grupo de animais e limpeza e desinfecção regular dos mesmos;</p> <p>Uso de indumentária limpa aquando do contacto com estes animais;</p> <p>Não utilizar sobras de alimento de animais adultos para estes animais.</p> | <p>Estes animais devem ser retirados da exploração o mais depressa possível (alternativa: isolamento e criação para venda como animal de engorda);</p> <p>Não utilizar estes animais para reposição do efetivo;</p> <p>Evitar o contacto entre estes e a restante vacada e não permitir que as suas fezes contaminem o ambiente dos animais negativos;</p> <p>Uso de indumentária exclusiva aquando do contacto com estes animais.</p> |

Bovinos com mais de 2 anos

O objetivo é refugar animais positivos ou promover a sua gestão reduzindo o risco de transmissão e a contaminação ambiental. O produtor deverá proceder à testagem de todo o efetivo com mais de dois anos de idade como estipulado na Fase 1. A testagem deve ser repetida anualmente, sempre associada à separação e refugo dos animais positivos até que a prevalência seja inferior a 5%. A partir dos resultados o produtor deverá ter em conta os seguintes pontos:

1. Decisão de refugo dos animais positivos
 - a. Machos e fêmeas não gestantes e sem bezerro

Idealmente, os animais seropositivos não devem permanecer na exploração e devem ser refugados o mais depressa possível sendo fortemente aconselhado em explorações de baixa prevalência ($\leq 5\%$) ou quando os animais em questão são animais clínicos. Estes

animais devem ser transferidos para um curral de permanência temporária exclusivo, onde aguardam a saída da exploração. No entanto, quando o refugio imediato não é possível (por exemplo, quando o número de vacas positivas não é compatível com o refugio imediato) o produtor pode optar pelo refugio imediato de uma parte das vacas segundo algum critério (vacas com maior número de dias em aberto, vacas mais velhas ou vacas com historial de perdas gestacionais) e manter os restantes animais positivos na exploração. Nesta situação, o produtor terá de ter infraestruturas para garantir a separação física do efetivo permitindo um refugio gradual dos animais positivos e utilizar apenas os animais negativos para reposição.

Para executar tal separação o produtor deve:

- Determinar o efetivo “positivo” e “negativo”;
- Manter o estado de isolamento do grupo “positivo”;
- Possuir instalações e parcelas de pastagens exclusivas para “positivos”;
- Possuir mangas exclusivas para cada grupo de animais (caso não seja possível, a ordem de trabalhos deverá ser primeiro animais negativos e só depois os positivos e a manga e a área ao seu redor deverá ser limpa de estrume e desinfetada após a passagem do grupo positivo);
- Delegar equipamentos de distribuição de alimento e outros exclusivamente para “positivos”;
- Evitar indumentária ou veículos a circular entre os dois grupos (se não for possível, o equipamento que circule entre estes deve seguir a ordem primeiro os animais negativos, seguido pelos positivos e ser devidamente limpo e desinfetado após utilização).

Relativamente aos animais seronegativos, o produtor poderá optar pela retestagem através de PCR fecal em *pools* de 10 animais para identificação dos animais infecciosos: se *pool* positiva esta deve ser desdobrada e os animais testados individualmente; os animais positivos a PCR fecal são considerados excretadores e promotores da disseminação da infeção, devendo ser eliminados.

b. Fêmeas gestantes ou a criar o bezerro

As fêmeas positivas gestantes ou a criar bezerro devem ser separadas dos animais negativos e mantidas em instalações exclusivas até ao desmame, sendo posteriormente refugadas e o bezerro vendido como animal de engorda.

c. Descendência de fêmeas positivas:

Pelo menos as últimas duas descendências de fêmeas positivas devem ser vistas como potencialmente infetadas devido a:

- Risco de transmissão da mãe para o bezerro ainda no útero;

- Risco de transmissão por ingestão do agente causal através do colostro ou leite;
- Risco de ingestão do agente através do úbere contaminado com material fecal.

Não se devem utilizar animais infetados nem a sua descendência para reprodução. Os descendentes que já tenham entrado em reprodução e tenham testado negativo devem ser monitorizados. Em alternativa ao refugo, a descendência poderá ser criada em instalações exclusivas até que esteja pronta para ser vendida como animal de engorda.

2. Resultados “Duvidosos”

O animal duvidoso deverá ser visto como um risco e o produtor poderá decidir pelo refugo ou repetir o ELISA para confirmação após um mês. Entretanto, o animal deverá ser mantido isolado dos restantes. Se o novo resultado for negativo, o animal será considerado não positivo e poderá reunir-se à restante vacada.

3. Outras considerações

Qualquer bovino com quadro clínico compatível com PT deve ser imediatamente isolado, em curral exclusivo, para se proceder à sua testagem (ELISA para pesquisa de anticorpos ou PCR fecal, sendo este último preferível em animais com menos de 3 anos) e refugo se positivo; deve-se decidir pelo refugo de animais positivos, mesmo sem sinais clínicos. O produtor, sempre que possível, não deverá manter os animais positivos na exploração pois a PT é uma doença incurável e estes animais apenas contribuirão para a sua disseminação. Qualquer bovino com idade inferior ou igual a 2 anos de idade que apresente quadro clínico suspeito e/ou seropositividade é sugestivo de exposição pré-natal ou nos primeiros dias de vida ou ainda de uma elevada pressão de infeção (ambiente extremamente contaminado e exposições repetidas ao agente). Neste cenário é recomendada a testagem através de PCR fecal das novilhas destinadas a reprodução antes da inseminação artificial/entrada do touro, de modo a quebrar o ciclo de transmissão e reduzir a exposição dos bezerros ao agente causal.

Alimento e fontes de água

Tabela 18. Medidas de manejo do alimento e fontes de água para controlo de PT

| |
|---|
| Objetivo: Evitar a conspurcação e contaminação do alimento e fontes de água. |
| Geral |
| Elevação dos comedouros e bebedouros evitando a sua conspurcação com fezes; Limpeza regular dos comedouros e bebedouros; Evitar o uso de manjedouras fixas, onde existe concentração diária de animais produzindo áreas lamacentas que proporcionam maior contaminação dos úberes; Mudança regular dos bebedouros e comedouros; Evitar o uso da mesma manjedoura para adultos e animais jovens; Evitar a distribuição de alimento diretamente no solo; |

Tabela 18. Medidas de manejo do alimento e fontes de água para controlo de PT (continuação)

| Geral |
|--|
| Se alimento distribuído no solo, evitar fornecer mais forragem do que aquela que o gado consegue consumir num dia; Vedar o acesso a águas estagnada (lagoas, barragens); Utilizar fontes de água controlada, incluindo MAP nas análises microbiológicas. |

Pastagem**Tabela 19. Medidas de manejo das pastagens para controlo de PT**

| Objetivo: Prevenção do contacto com animais infetados e respetivas fezes e da contaminação fecal da pastagem e fontes de água; a eliminação do MAP das pastagens é difícil devido à sua elevada capacidade de sobrevivência no ambiente, mas o risco pode ser mitigado. | |
|--|---|
| Geral | Animais positivos |
| Evitar a partilha de pastagens entre novilhas e adultos; Não introduzir novilhas em parcelas de pastagem onde esteve recentemente gado adulto; Garantir uma densidade animal adequada; Idealmente, após a saída dos animais, as pastagens devem repousar pelo menos um ano antes da entrada destes; o solo deve ser revirado; Evitar distribuir estrume na pastagem ou no campo de corte de plantas para forragem. | Determinar parcelas de pastagem exclusivas para animais positivos, afastadas e sem contacto físico com os animais negativos; O solo destes parques deve ser revirado com regularidade. |

Animais introduzidos

O objetivo é evitar a compra de animais em fase subclínica de PT, sendo que esta é a causa mais frequente para a entrada da doença numa exploração. O produtor deve adquirir animais apenas de explorações com estatuto negativo ou, se tal não for possível, preferir explorações sem história recente de PT acordando com o vendedor a testagem dos animais antes da compra. Se o vendedor não se mostrar disponível os animais podem ser comprados, mas devem ser testados e deve ser feita uma quarentena enquanto aguardam os resultados da mesma, introduzindo os animais no efetivo apenas após o resultado negativo. O teste recomendado é o ELISA para pesquisa de anticorpos no soro sanguíneo, associado a PCR fecal principalmente em animais com menos de 3 anos de idade. O produtor deverá evitar a partilha de machos para reprodução, pois poderá estar a introduzir um macho em fase subclínica na sua exploração. O produtor poderá optar por manter o efetivo fechado com produção dos próprios animais de substituição em condições de separação física do gado adulto. Os animais que saíram da exploração para leilão ou feiras devem ser monitorizados. Se o animal permaneceu menos de 7 dias fora da exploração em condições de prevenção de contacto com outros bovinos e materiais potencialmente contaminados poderão ser adicionados novamente ao efetivo sem necessidade de isolamento ou testagem.

Contacto com espécies reservatório da doença e pequenos ruminantes

O objetivo é evitar a infeção da vacada através do contacto e ingestão de fezes de espécies reservatório (veados, coelhos e outros pequenos mamíferos) aquando do pastoreio e evitar a infeção através do contacto com pequenos ruminantes. O produtor deverá implementar infraestruturas que impeçam o contacto com potenciais reservatórios como cercas altas, cercas duplas e redução da abertura da rede. O alimento (forragens, rações, entre outros) deverá estar devidamente armazenado e deverá evitar-se fornecer mais alimento do que o gado consegue consumir e evitar distribuí-lo no solo precavendo restos que possam ser um chamariz de animais silváticos. A elevação dos bebedouros e comedouros é recomendada para prevenir o acesso a estes pelos animais silváticos de pequeno porte. O pastoreio partilhado com ovinos e caprinos é desaconselhado.

Inseminação artificial e transferência de embriões

O uso de inseminação artificial é considerado seguro para a fêmea e bezerro, mitigando o risco de introdução da doença através da aquisição de um touro portador. O procedimento de TE em fêmeas de elevado valor genético que se tenham revelado positivas pode ser considerado, sendo a prática segura para a recetora e bezerro. Neste caso, a fêmea recetora deve ser devidamente testada e conhecido o estatuto de PT da exploração de origem pois uma fêmea recetora infetada poderá transmitir a doença ao feto por via transplacentária.

Vacinação

Atualmente não existe vacina para a PT para bovinos autorizada em Portugal.

O plano sugerido foi aplicado teoricamente à exploração descrita anteriormente, estando os resultados dispostos nas próximas páginas.

Fase 1: Apesar da exploração apresentar uma prevalência inferior a 5% é recomendada a realização de uma avaliação de risco e aplicação de medidas de controlo para mitigar e prevenir a disseminação da doença e o aumento do valor de prevalência.

- a) Caracterização da exploração: tópico descrito anteriormente nesta dissertação (Material e Métodos);
- b) Perdas de produtividade, História pregressa de PT e Animais introduzidos na exploração: o produtor aponta como perdas de produtividade o refugio de animais com má condição corporal e a ocorrência de mortes na exploração; foram confirmados por ELISA indireto em soro sanguíneo dois animais com quadro clínico compatível com idades entre os 2 e 6 anos, ambos nascidos na exploração; os animais apresentavam

descendência na exploração (bezerros posteriormente vendidos após o desmame); a decisão foi o refugo dos animais; houve a introdução de um touro com origem externa, devidamente testado, nos últimos 2 a 5 anos.

- c) Testagem dos animais e cálculo da prevalência de infecção: a execução da testagem de todos os bovinos com mais de um ano de idade (n=171) com recurso a ELISA para deteção de anticorpos anti-MAP no soro sanguíneo permitiu o cálculo de uma prevalência aparente de infecção de 2,3%; este valor é categorizado como baixo ($\leq 5\%$).

Fase 2: Os resultados obtidos nos inquéritos das Tabelas 20 a 29 permitem estabelecer uma ordem de prioridades nas fases a intervir: Criação de bezerros (30,7%), Animais introduzidos (26,7%), Parto (20%), Bovinos com mais de um ano (10,7%), Bezerros pós-desmame (6,7%) e Bovinos com mais de 2 anos (5,3%). Tendo em conta que o objetivo será a redução em 85% de cada fator de risco, para objetivos impõem-se os seguintes valores: Criação de bezerro 4,6%, Animais introduzidos 4%, Parto 3%, Bovinos com mais de um ano 1,6%, Bezerros pós-desmame 1% e Bovinos com mais de 2 anos 0,8%. As fases com valores menores de percentagem não devem ser desvalorizadas. As medidas de higiene e boas práticas de manejo nestas fases devem continuar a ser praticadas e, se necessário, aprimoradas. A avaliação de risco deve ser atualizada anualmente.

Tabela 20. Aplicação da sugestão de plano de controlo para a Paratuberculose: Caracterização da exploração

| Caracterização da exploração | |
|--|--|
| Produtor: _____ | |
| Exploração: <u>Exploração 71</u> | Marca de exploração: _____ |
| Regime de produção: Intensivo <input type="checkbox"/> Extensivo <input checked="" type="checkbox"/> Semi-extensivo <input type="checkbox"/> | |
| Área total da exploração: <u>390 ha</u> | |
| Divisão da área em parcelas? Sim <input checked="" type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> | |
| Número de animais com mais de 2 anos: <u>+ 12 meses : 200 (195 ♀, 5 ♂) Aprov.</u> | |
| Vacas: <u>150</u> Novilhas: <u>40</u> Touros: <u>5</u> Novilhos: _____ | |
| Número de animais com menos de 2 anos (incluindo bezerros): <u>170 bezerros (210</u> | |
| Idade média dos animais da exploração: <u>10 Anos</u> <u>+ 40 novilhas</u> | |
| Idade média de refugo dos animais: _____ | |
| Mortalidade dos animais adultos nos últimos 12 meses: _____ | |
| Divisão do gado em grupos? Sim <input checked="" type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> | |
| Se sim, qual o critério de divisão? <u>Novilhas, Paridas, gestantes</u> | |
| Área de terreno para cada grupo? <u>20ha</u> | Número médio de animais por grupo: <u>70</u> |
| Outros animais presentes na exploração? Sim <input type="checkbox"/> Não <input checked="" type="checkbox"/> Se sim quais? | |
| Existe separação física entre estes animais e a vacada principal? Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> | |

Tabela 20. Aplicação da sugestão de plano de controlo para a Paratuberculose: Caracterização da exploração (continuação)

| Maneio reprodutivo e do neonato | |
|---|---|
| Monta natural <input checked="" type="checkbox"/> | Inseminação artificial <input type="checkbox"/> |
| Se usa monta natural, qual a altura de entrada dos touros? <i>Sempre 4 as vacas</i> Qual a altura de saída dos touros? <i>—</i> | |
| Origem dos machos reprodutores: Própria exploração <input type="checkbox"/> Origem externa/compra <input checked="" type="checkbox"/> Se comprados, pede testagem para Paratuberculose ou tem conhecimento do estatuto da doença na exploração de origem? Sim <input checked="" type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> | |
| Origem das fêmeas de reposição: Própria exploração <input checked="" type="checkbox"/> Origem externa/compra <input type="checkbox"/> Se compradas, pede testagem para Paratuberculose ou tem conhecimento do estatuto da doença na exploração de origem? Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> | |
| Época de partos: <i>Não definida</i> | |
| Tem como prática o uso de colostro externo à exploração para alimentar bezerros órfãos ou que a mãe não tenha colostro? Sim <input type="checkbox"/> Não <input checked="" type="checkbox"/> Se usa colostro externo, este foi testado para Paratuberculose ou tem conhecimento do estatuto da doença da exploração de origem? Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> O colostro é pasteurizado? Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> | |
| Maneio alimentar | |
| Os animais estão em pastagem todo o ano? Sim <input checked="" type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> | |
| Existem charcas de água acessíveis aos animais na pastagem? Sim <input checked="" type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> | |
| Existe fornecimento de alimento à mão? Sim <input checked="" type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Se existe, qual a altura do ano? <i>Set a fev</i> | |
| Tipo de alimento: Feno <input checked="" type="checkbox"/> Silagem <input type="checkbox"/> Fenosilagem <input type="checkbox"/> Farinha <input type="checkbox"/> Tacos <input checked="" type="checkbox"/> Outro: | |
| Distribuição de alimento simultaneamente para animais jovens e adultos: Sim <input checked="" type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> | |
| Utilização das sobras de adultos para alimentar bezerros: Sim <input checked="" type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> | |
| Armazenamento do alimento protegido da conspurcação por lamas e material fecal: Sim <input checked="" type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> | |
| Origem da água de abeberamento: Barragem <input checked="" type="checkbox"/> Lago/Charca <input checked="" type="checkbox"/> Água canalizada <input type="checkbox"/> | |
| A água utilizada para abeberamento dos animais é testada com regularidade? Sim <input checked="" type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> | |
| Profilaxia da exploração | |
| Vacinações aplicadas na exploração: <i>(mês 8 / MAP)</i> Clostridioses <input checked="" type="checkbox"/> BVD <input checked="" type="checkbox"/> IBR <input checked="" type="checkbox"/> Leptospirose <input type="checkbox"/> Doença respiratória bovina <input type="checkbox"/> Diarreias neonatais <input type="checkbox"/> Outra: | |
| Desparasitação: Anual <input type="checkbox"/> Semestral <input checked="" type="checkbox"/> Contra ectoparasitas (por exemplo, carraças) <input checked="" type="checkbox"/> Contra endoparasitas (ténias, lombrigas) <input checked="" type="checkbox"/> Inclui Fasciola <input type="checkbox"/> | |
| Outros planos de controlo/erradicação voluntários aplicados na exploração: <i>IBR, BVD (vac.)</i> | |

Tabela 21. Aplicação da sugestão de plano de controlo para a Paratuberculose: Perda de produtividade nos últimos 5 anos, História pregressa de Paratuberculose na exploração e Animais introduzidos

| Perdas de produtividade nos últimos 5 anos |
|--|
| Atrasos de retorno à ciclicidade <input type="checkbox"/> <i>Não há controlo reprodutivo</i> |
| Bezerros pequenos/mais leves à nascença <input type="checkbox"/> <i>NÃO</i> |
| Menor peso médio dos bezerros ao desmame <input type="checkbox"/> <i>NÃO</i> |
| Peso médio há 5 anos: <i>—</i> |
| Peso médio na última pesagem: <i>200kg</i> |
| Maior incidência de outras patologias (mamites, laminites) <input type="checkbox"/> <i>NÃO</i> |
| Refugo de animais em má condição corporal <input checked="" type="checkbox"/> |
| Mortes na exploração <input checked="" type="checkbox"/> |

Tabela 21. Aplicação da sugestão de plano de controlo para a Paratuberculose: Perda de produtividade nos últimos 5 anos, História progressa de Paratuberculose na exploração e Animais introduzidos (continuação)

| História progressa de Paratuberculose na exploração | | | |
|---|-------------------|---------------------------|----------------------------------|
| Já teve animais com quadro clínico compatível com Paratuberculose na exploração? Sim <input checked="" type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> | | | |
| Se sim, quantos animais? <u>2</u> | | | |
| Destino dos animais: Refugo <input checked="" type="checkbox"/> Faleceram <input type="checkbox"/> Permanecem na exploração <input type="checkbox"/> | | | |
| Idade do animal mais jovem que já teve quadro clínico compatível: | | | |
| Já houve casos de Paratuberculose confirmada na exploração? Sim <input checked="" type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> | | | |
| Ano do primeiro diagnóstico de Paratuberculose na exploração? <u>2022</u> | | | |
| Idade do primeiro caso de Paratuberculose: <u>2 a 6 Anos</u> | | | |
| Idade e proveniência dos animais positivos: <u>2 a 6 Anos, Própria exploração</u> | | | |
| Caracterização de casos clínicos anteriores | | | |
| Data do início dos sinais clínicos | Idade | Origem do animal | Descendência na exploração |
| <u>Agosto/ Setembro</u> | <u>2 a 6 Anos</u> | <u>Própria exploração</u> | <u>Sim (bezerros p/ engorda)</u> |
| Número de animais refugados devido a quadro clínico compatível: <u>2</u> | | | |
| Número de animais refugados por ELISA positivo: <u>2</u> | | | |
| Número de animais refugados por PCR/cultura fecal positiva: <u>—</u> | | | |
| Animais introduzidos | | | |
| Introdução de animais nos últimos 2 a 5 anos? Sim <input checked="" type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> | | | |
| Animal | Quantidade | Origem | |
| Vacas <input type="checkbox"/> | | | |
| Novilhas <input type="checkbox"/> | | | |
| Touro <input checked="" type="checkbox"/> | <u>1</u> | <u>externa</u> | |
| Outro | | | |

Tabela 22. Aplicação da sugestão de plano de controlo para a Paratuberculose: Cálculo da prevalência

| Baixa ($\leq 5\%$) | Moderada (6 a 19%) | Alta ($\geq 20\%$) |
|--|-----------------------------------|-------------------------------|
| PREVALÊNCIA DE PARATUBERCULOSE NA EXPLORAÇÃO: <u>2,3 %</u> | | |
| Baixo <input checked="" type="checkbox"/> | Moderado <input type="checkbox"/> | Alto <input type="checkbox"/> |

Tabela 23. Aplicação da sugestão de plano de controlo para a Paratuberculose: Avaliação de Risco – Parto

| Parto | | | |
|---|---|----------|----------------|
| A suscetibilidade à infeção é maior nos neonatos, logo a fase do Parto recebe uma pontuação superior às restantes. O bezerro infeta-se pela ingestão do agente causal que está presente nas fezes de adultos infetados, no leite e no colostro da progenitora infetada. | | | |
| Fator de risco | Critério de pontuação | Risco | Pontos |
| Utilização da área de partos para vários animais ao mesmo tempo | Áreas individuais | Baixo | 0-1 |
| | Coletivas com baixa densidade animal (curral ou pastagem) | Moderado | <u>(4-6) 5</u> |
| | Coletivas com elevada densidade animal | Alto | 8-10 |
| Higiene do local | Limpo e seco | Baixo | 0-1 |
| | Pouca acumulação de estrume | Moderado | <u>(4-6) 5</u> |
| | Muita acumulação de estrume | Alto | 8-10 |
| Higiene dos úberes e membros | Tosquiados, limpos e secos | Baixo | 0-1 |
| | Moderadamente sujo | Moderado | <u>(4-6) 4</u> |
| | Muito sujo | Alto | 8-10 |
| Presença de animais com Paratuberculose clínica, suspeitos ou teste positivo | Não | Baixo | <u>(0-1) 1</u> |
| | Apenas animais de baixo risco | Moderado | 4-6 |
| | Animais de alto e baixo risco | Alto | 8-10 |

*Use pontuações intermédias para situações não contempladas

Tabela 23. Aplicação da sugestão de plano de controlo para a Paratuberculose: Avaliação de Risco – Parto (continuação)

| Parto | Avaliação de Risco | | | | | | | | | | |
|--|---------------------------------------|----------------|----------|----|----|-------------|----|----|---------|----|----------------|
| | 0. | 1. Muito baixo | 2. Baixo | 3. | 4. | 5. Moderado | 6. | 7. | 8. Alto | 9. | 10. Muito alto |
| Utilização da área de partos para vários animais ao mesmo tempo | | | | | | X | | | | | |
| Higiene do local | | | | | | X | | | | | |
| Higiene dos úberes e membros | | | | | X | | | | | | |
| Presença de animais com Paratuberculose clínica, suspeitos ou teste positivo | | X | | | | | | | | | |
| Máximo de pontos: 40 | Pontuação total: $5 + 5 + 4 + 1 = 15$ | | | | | | | | | | |

Tabela 24. Aplicação da sugestão de plano de controlo para a Paratuberculose: Avaliação de Risco – Criação de bezerros

| Criação de bezerros | | | | | | | | | | | |
|---|---|----------------|------------------|----|----|-------------|----|----|---------|----|----------------|
| Os animais com menos de 6 meses são suscetíveis à infeção sendo a pontuação atribuída a esta fase ainda elevada. O bezerro infeta-se pela ingestão do agente causal que está presente nas fezes de adultos infetados, no leite e no colostro da progenitora infetada. | | | | | | | | | | | |
| Fator de risco | Critério de pontuação | Risco | Pontos | | | | | | | | |
| Bezerro e progenitora em espaço partilhado com outros bovinos possivelmente infetados | Não, apenas com animais repetidamente negativos | Baixo | 0-1 | | | | | | | | |
| | Sim, apenas com animais negativos a somente um teste e de baixo risco | Moderado | 4-6 | | | | | | | | |
| | Sim, com animais de estatuto desconhecido | Alto | 8-10 8 | | | | | | | | |
| Higiene do local | Limpo e seco | Baixo | 0-1 | | | | | | | | |
| | Pouca acumulação de estrume | Moderado | 4-6 4 | | | | | | | | |
| | Muita acumulação de estrume | Alto | 8-10 | | | | | | | | |
| Contaminação da água de abeberamento com fezes de adultos | Raramente | Baixo | 0-1 | | | | | | | | |
| | Ocasionalmente, em algumas fontes | Moderado | 4-6 5 | | | | | | | | |
| | Frequentemente e em várias fontes | Alto | 8-10 | | | | | | | | |
| Contaminação dos alimentos com fezes de adulto | Raramente | Baixo | 0-1 2 | | | | | | | | |
| | Ocasionalmente, em algumas fontes | Moderado | 4-6 | | | | | | | | |
| | Frequentemente e em várias fontes | Alto | 8-10 | | | | | | | | |
| Contacto com o curral de animais adultos doentes | Não | Baixo | 0-1 | | | | | | | | |
| | O curral é ao lado da zona de partos | Moderado | 4-6 4 | | | | | | | | |
| | O curral é a zona de partos | Alto | 8-10 | | | | | | | | |
| *Use pontuações intermédias para situações não contempladas | | | | | | | | | | | |
| Criação de bezerros | Avaliação de Risco | | | | | | | | | | |
| | 0. | 1. Muito baixo | 2. Baixo | 3. | 4. | 5. Moderado | 6. | 7. | 8. Alto | 9. | 10. Muito alto |
| Bezerro e progenitora em espaço partilhado com outros bovinos possivelmente infetados | | | | | | | | | X | | |
| Higiene do local | | | | | X | | | | | | |
| Contaminação da água de abeberamento com fezes de adultos | | | | | | X | | | | | |
| Contaminação dos alimentos com fezes de adulto | | | X | | | | | | | | |
| Contacto com o curral de animais adultos doentes | | | | | X | | | | | | |
| Máximo de pontos: 50 | Pontuação total: $8 + 5 + 4 + 4 + 2 = 23$ | | | | | | | | | | |

Tabela 25. Aplicação da sugestão de plano de controlo para a Paratuberculose: Avaliação de Risco – Bezerros pós-desmame

| Bezerros pós-desmame | | | |
|--|-----------------------------------|--------------------------------|----------------|
| Inclui machos e fêmeas destinados à reprodução com menos de 1 ano de idade. Estes animais ainda são considerados suscetíveis e infetam-se pela ingestão do agente causal que está presente nas fezes de adultos infetados. | | | |
| Fator de risco | Critério de pontuação | Risco | Pontos |
| Contacto com animais adultos e suas fezes | Não | Baixo | 0-1 <u>1</u> |
| | Ocasionalmente | Moderado | 3-4 |
| | Frequentemente | Alto | 6-7 |
| Contaminação dos alimentos com fezes de adultos | Não | Baixo | 0-1 <u>1</u> |
| | Ocasionalmente | Moderado | 3-4 |
| | Frequentemente | Alto | 6-7 |
| Contaminação da água de abeberamento com fezes de adultos | Não | Baixo | 0-1 <u>2</u> |
| | Ocasionalmente | Moderado | 3-4 |
| | Frequentemente | Alto | 6-7 |
| Pastoreio com animais adultos | Raramente | Baixo | 0-1 <u>1</u> |
| | Ocasionalmente, em algumas fontes | Moderado | 4-6 |
| | Frequentemente e em várias fontes | Alto | 6-7 |
| Distribuição de estrume em pastagem para alimentação dos animais | Não | Baixo | 0-1 <u>0</u> |
| | Ocasionalmente | Moderado | 3-4 |
| | Frequentemente | Alto | 6-7 |
| *Use pontuações intermédias para situações não contempladas | | | |
| Bezerros pós-desmame | | 0. | 1. Muito baixo |
| | | 2. Baixo | 3. |
| | | 4. Moderado | 5. |
| | | 6. Alto | 7. Muito alto |
| Contacto com animais adultos e suas fezes | | | X |
| Contaminação dos alimentos com fezes de adultos | | | X |
| Contaminação da água de abeberamento com fezes de adultos | | | X |
| Pastoreio com animais adultos | | | X |
| Distribuição de estrume em pastagem para alimentação dos animais | | X | |
| Máximo de pontos: 35 | | Pontuação total: 1+1+2+1+0 = 5 | |

Tabela 26. Aplicação da sugestão de plano de controlo para a Paratuberculose: Avaliação de Risco – Bovinos com mais de 1 ano de idade

| Bovinos com mais de 1 ano de idade | | | |
|--|-----------------------------------|----------|--------------|
| Inclui novilhas gestantes e touros com mais de 1 ano de idade. Nestes animais a suscetibilidade de infeção é menor, mas ainda superior à do animal adulto. Estes animais infetam-se pela ingestão do agente causal que está presente nas fezes de adultos infetados. | | | |
| Fator de risco | Critério de pontuação | Risco | Pontos* |
| Contacto com animais adultos e suas fezes | Não | Baixo | 0-1 |
| | Ocasionalmente | Moderado | 2-3 <u>2</u> |
| | Frequentemente | Alto | 4-5 |
| Contaminação dos alimentos com fezes de adultos | Não | Baixo | 0-1 |
| | Ocasionalmente | Moderado | 2-3 <u>2</u> |
| | Frequentemente | Alto | 4-5 |
| Contaminação da água de abeberamento com fezes de adultos | Não | Baixo | 0-1 |
| | Ocasionalmente | Moderado | 2-3 <u>2</u> |
| | Frequentemente | Alto | 4-5 |
| Pastoreio com animais adultos | Raramente | Baixo | 0-1 |
| | Ocasionalmente, em algumas fontes | Moderado | 2-3 <u>2</u> |
| | Frequentemente e em várias fontes | Alto | 4-5 |
| Distribuição de estrume em pastagem para alimentação dos animais | Não | Baixo | 0-1 <u>0</u> |
| | Ocasionalmente | Moderado | 2-3 |
| | Frequentemente | Alto | 4-5 |
| *Use pontuações intermédias para situações não contempladas | | | |

Tabela 26. Aplicação da sugestão de plano de controlo para a Paratuberculose: Avaliação de Risco – Bovinos com mais de 1 ano de idade (continuação)

| Bovinos com mais de 1 ano de idade | 0. | 1. Muito baixo | 2. Baixo | 3. Moderado | 4. Alto | 5. Muito alto |
|--|---|----------------|----------|-------------|---------|---------------|
| | Contacto com animais adultos e suas fezes | | | X | | |
| Contaminação dos alimentos com fezes de adultos | | | X | | | |
| Contaminação da água de abeberamento com fezes de adultos | | | X | | | |
| Pastoreio com animais adultos | | | X | | | |
| Distribuição de estrume em pastagem para alimentação dos animais | X | | | | | |
| Máximo de pontos: 25 | Pontuação total: 2+2+2+2+0=8 | | | | | |

Tabela 27. Aplicação da sugestão de plano de controlo para a Paratuberculose: Avaliação de Risco – Bovinos com mais de 2 anos de idade

| Bovinos com mais de 2 anos de idade | | | | | |
|--|----------------------------|----------------|----------|-------------|---------|
| Os animais com mais de 2 anos de idade são pouco suscetíveis à infeção, mas os animais adultos infetados podem eliminar uma grande quantidade de agente nas fezes para o ambiente contribuindo para uma elevada contaminação ambiental. A resistência do adulto à infeção pode ser ultrapassada pela exposição a um ambiente extremamente contaminado. Estes animais infetam-se pela ingestão do agente causal que está presente nas fezes de adultos infetados. | | | | | |
| Fator de risco | Critério de pontuação | Risco | Pontos | | |
| Contaminação fecal dos alimentos | Não | Baixo | 0-1 | | |
| | Ocasionalmente | Moderado | 2 2 | | |
| | Frequentemente | Alto | 3-4 | | |
| Contaminação fecal das águas | Não | Baixo | 0-1 | | |
| | Ocasionalmente | Moderado | 2 2 | | |
| | Frequentemente | Alto | 3-4 | | |
| Acesso a áreas de armazenamento/acumulação de estrumes | Não | Baixo | 0-1 0 | | |
| | Ocasionalmente | Moderado | 2 | | |
| | Frequentemente | Alto | 3-4 | | |
| Distribuição de estrume em pastagem para alimentação dos animais | Não | Baixo | 0-1 0 | | |
| | Ocasionalmente | Moderado | 2 | | |
| | Frequentemente | Alto | 3-4 | | |
| *Use pontuações intermédias para situações não contempladas | | | | | |
| Bovinos com mais de 2 anos de idade | | | | | |
| | 0. | 1. Muito baixo | 2. Baixo | 3. Moderado | 4. Alto |
| Contaminação fecal de alimentos | | | X | | |
| Contaminação fecal das águas | | | X | | |
| Acesso a áreas de armazenamento/acumulação de estrumes | X | | | | |
| Distribuição de estrume em pastagem para alimentação dos animais | X | | | | |
| Máximo de pontos: 16 | Pontuação total: 2+2+0+0=4 | | | | |

Tabela 28. Aplicação da sugestão de plano de controlo para a Paratuberculose: Avaliação de Risco – Animais introduzidos

| Animais introduzidos | | | | | |
|---|-------------------|------|-------|-------|-----|
| A introdução de animais com origem externa à exploração é a principal causa de introdução da doença na exploração. O risco de introdução de animais infetados depende das garantias fornecidas pela exploração de origem relativamente ao estatuto de Paratuberculose e do número de animais introduzidos (quanto maior o número, maior o risco). | | | | | |
| Origem dos animais | Número de animais | | | | |
| | 1-5 | 6-12 | 13-20 | 21-50 | >50 |
| Exploração negativa | 0 | 2 | 4 | 6 | 8 |
| Exploração de baixo risco | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
| Um único rebanho de estatuto desconhecido | 20 | 22 | 23 | 26 | 28 |
| Vários rebanhos com estatuto desconhecido | 30 | 34 | 36 | 38 | 40 |

Máximo de pontos: 60 (se >60, considerar 60)

PONTUAÇÃO TOTAL: 20

Tabela 29. Aplicação da sugestão de plano de controlo para a Paratuberculose: Avaliação de Risco – tabela resumo

| Tabela resumo da avaliação de risco | | | | |
|--|------------------|-------------------|--------|---------|
| Fase | Pontuação máxima | Pontuação da fase | %Fase# | %Total* |
| Partos | 40 | 15 | 37,5 | 20% |
| Criação de bezerros | 50 | 23 | 46% | 30,7% |
| Bezerros pós-desmame | 35 | 5 | 14,3% | 6,7% |
| Bovinos com mais de 1 ano | 25 | 8 | 32% | 10,7% |
| Bovinos com mais de 2 anos | 16 | 4 | 25% | 5,3% |
| Animais introduzidos | 60 | 20 | 33,3% | 26,7% |
| Total | 226 | 75 | 33,2% | |
| #Cálculo da percentagem do risco para cada fase: $\frac{\text{Pontuação da fase}}{\text{Pontuação máxima}} \times 100$ | | | | |
| *Cálculo da percentagem do risco total: $\frac{\text{Pontuação da fase}}{\text{Pontuação total}} \times 100$ | | | | |

Fase 3: Nesta fase apresenta-se uma sugestão de plano sanitário para mitigação dos fatores de risco. Nesta exploração apenas 4 animais acusaram positivo e 1 duvidoso, pela perspetiva do produtor e pela baixa prevalência calculada, o refugio imediato dos animais foi aplicado. A recomendação para a gestão de futuros animais positivos dependerá do número destes e do seu estado reprodutivo estando as medidas descritas no texto destinado aos bovinos com mais de 2 anos de idade.

Parto

A introdução de um parque de partos (PP), entre o parque das gestantes (PG) e parque das não gestantes (PNG), para onde são transferidas as fêmeas de acordo com algum critério estabelecido pelo produtor (por exemplo, meses de gestação) permitirá um maior controlo sobre a higiene e segurança do parto, fêmea e neonato.

Se possível interior e individual, sendo limpo de estrume e desinfetado após a saída do par progenitora-bezerro. Em alternativa, o parque poderá ser múltiplo (garantir áreas amplas) e/ou exterior (garantir zonas de proteção das intemperes, de modo que o solo e os animais permaneçam secos evitando lamas e conspurcação).

Em caso de parques múltiplos, a terra destes deve ser revirada após cada época de partos e permanecer, se possível, pelo menos um ano sem animais. O produtor deverá ter dois, idealmente três, grupos de parques para permitir a rotação entre eles e descanso intercalado (PG1, PP1, PNG1, PG2, PP2, PNG2, PG3, PP3, PNG3). Em alternativa, poderá apenas utilizar-se dois grupos de parques (1 e 2) que permanecem pelo menos três a seis meses em descanso. Estas medidas podem ser complicadas de aplicar, sendo necessário adaptá-las à realidade da exploração e disponibilidade do produtor. Quando a criação do PP não é considerada, o PG poderá funcionar como PP e todas as mesmas recomendações devem ser implementadas.

Outras recomendações incluem a limpeza do espaço (minimizar lamas e acumulação de estrume) e a manutenção da limpeza das vacas no período perinatal.

Após o parto os animais devem seguir para um PNG o mais rapidamente possível que esteve nas condições de sem população animal e de terra revirada no último ano. Se animais gestantes forem detetados como positivos, o produtor deverá aplicar as medidas recomendadas no texto “Bovinos com mais de 2 anos”.

Criação do bezerro

- Após o parto, colocar a cria e a progenitora num parque “limpo” de área ampla e adequada para a densidade animal (PNG);
- Manutenção da limpeza do úbere da progenitora;
- Existência de zonas de abrigo, de modo que o solo e os animais permaneçam secos evitando lamas e conspurcação;
- Todos os utensílios utilizados para a alimentação de bezerros (tetinas, baldes, tubos) devem ser cuidadosamente limpos e desinfetados antes e depois de cada utilização;
- Administração de colostro à mão: preferência pelo colostro artificial, seguido de colostro pasteurizado de vacas negativas ou oriundo de explorações de estatuto negativo para a PT;
- Higiene na recolha do colostro para evitar a sua contaminação com material fecal.

Se animais gestantes e/ou com bezerro detetados como positivos, o produtor deverá aplicar as medidas recomendadas no texto “Bovinos com mais de 2 anos”.

Bezerros pós-desmame

Nesta exploração com objetivo comercial de venda de bezerros para engorda, os animais desmamados saem da exploração pouco depois do desmame. No entanto, até à saída da exploração, as seguintes medidas devem ser consideradas:

- Colocação dos bezerros desmamados em parques onde a terra foi revirada (parque de bezerros desmamados – PB)
- Evitar o contacto direto ou indireto com animais adultos e respetivas fezes através da criação de currais separados;
- Não utilizar sobras de adultos para alimentar este grupo;
- Manutenção da limpeza e exclusividade de equipamentos (de alimentação, de limpeza, entre outros).

Bovinos com mais de 1 ano de idade

Estes animais são os animais de substituição. As medidas recomendadas são:

- Evitar o contacto direto ou indireto com animais adultos e respetivas fezes através da criação de currais separados;
- Após o desmame, estes animais são transferidos para parques “limpos” (parques de animais de substituição - PS);
- Manutenção da limpeza e exclusividade de equipamentos;
- Não utilizar sobras de alimento de animais adultos para alimentar estes animais.

Novilhas e novilhos positivos não devem ser usados para reposição. Devem ser separados da restante vacada e transferidos para o parque de refugio (PR); em alternativa podem ser criados isoladamente para venda posterior como animal de engorda. Se o animal já entrou em reprodução, deverá ser monitorizado.

Bovinos com mais de 2 ano de idade

Deverá ser realizada a testagem anual e refugio de animais positivos e respetiva descendência. No entanto, de acordo com o estado reprodutivo das fêmeas que se revelem positivas o produtor deverá realizar as seguintes alterações de manejo:

- Gestantes, sem bezerro: devem ser isoladas num parque próprio até ao parto (PG+) e posteriormente transferidas para um PP+: após o parto o par vaca-bezerro é transferido para o parque de desmame (PD) para positivos (PD+); após o desmame a fêmea deve ser refugada (transferida para o PR) e o bezerro transferido para o um parque de bezerros filhos de vacas positivas (PB+);
- Gestantes, com bezerro: o par é transferido para o PD+ e, após o desmame, a vaca segue para o PG+ e o bezerro desmamado é transferido para o PB+ e a fêmea passará a ser abordada como “gestante, sem bezerro”;
- Não gestantes, sem bezerro: refugio (PR);
- Não gestante, com bezerro: par transferido para o PD+, onde após este a fêmea é transferida para o PR e o bezerro para o PB+.

Animais introduzidos

O produtor deverá adquirir animais apenas de explorações com estatuto de PT negativo ou sem história recente de casos. Continuar a pedir testagem que inclua PT antes da compra do animal (ELISA), associado a PCR fecal principalmente em animais com menos de 3 anos; continuar a realizar a quarentena dos novos animais.

Maneio dos animais infetados e descendência

Ponderar refugo. Não guardar descendência de animais positivos para reposição.

Higiene da água e alimento e manejo de pastagens

- Elevar comedouros e bebedouros e evitar o uso simultâneo para adultos e jovens;
- Evitar a distribuição de alimento diretamente no solo e evitar fornecer mais forragem do que aquela que o gado consegue consumir num dia;
- Vedar o acesso a águas estagnada (lagos, poças, barragens) e áreas de água que permitem o animal defecar e posteriormente beber;
- Solicitar análises microbiológicas da água de abeberamento que incluam MAP;
- Evitar a partilha de pastagens entre novilhas e adultos;
- Não introduzir novilhas em pastagem onde esteve recentemente gado adulto;
- Área de pastagem adequada para o encabeçamento animal;
- Todas as pastagens e aquelas onde foram identificados animais positivos devem permanecer sem população animal, idealmente, pelo menos um ano e os solos revirados após a saída dos animais.

Na permanência de animais positivos na exploração, o produtor deverá determinar as parcelas de pastagem (parques) exclusivas para estes animais, como já referido.

Tipo de teste de diagnóstico e frequência e outras recomendações importantes

Todos os bovinos com mais de 2 anos devem ser testados através de ELISA em soro sanguíneo com frequência anual; recomendada a retestagem dos animais seronegativos com PCR fecal. O produtor poderá ponderar a realização de PCR fecal aos animais com menos de 2 anos.

Evitar o contacto com espécies silváticas reservatório e respetivas fezes através da implementação de cercas altas e/ou cercas duplas, da redução da abertura da rede e implementar um portão na exploração. Além dos parques já referidos, o produtor deverá ainda preparar dois currais para bezerros doentes, uma para positivos e outro para negativos, assim como dois outros currais para vacas doentes, seguindo a mesma divisão. Estes currais deverão ser limpos de estrume e desinfetados com regularidade.

3.4. Discussão

3.4.1. Estudo retrospectivo sobre a prevalência de Paratuberculose em efetivos de bovinos de carne do Alentejo

Durante o período estudado, foram testados 951 animais dos quais apenas 100 apresentaram positividade e dos 7 animais duvidosos todos pertencem a explorações com pelo menos um caso positivo. A proporção elevada de resultados negativos poderá ser justificada pelo carácter crónico e caquetizante da PT, sendo confundida com outras causas de caquexia, associadas ou não à diarreia (Savey et al. 2009), e mesmo com causas de diarreia crónica em adultos (Otter e Cranwell 2007). Neste contexto, situações como o parasitismo gastrointestinal, fasciolose, BVD, salmonelose, acidose, indigestões vagais, intoxicações, má nutrição e doenças tumorais (Otter e Cranwell 2007; Smith 2015; Esteves et al. 2021; Smith et al. 2021) podem ser interpretadas como um caso de PT clínica e culminar na decisão de testagem de um animal não infetado. Por outro lado, o longo período de incubação, a complexidade da fisiopatologia, a excreção fecal intermitente, as flutuações dos níveis de anticorpos (Savey et al. 2009) e a imperfeição dos testes de diagnóstico (Field et al. 2022) tornam esta doença de difícil diagnóstico contribuindo para o elevado número de negativos. O teste mais utilizado foi o ELISA indireto em soro sanguíneo, sendo que este teste apresenta uma Sen variável e globalmente imperfeita (Sen média de 87% nos casos clínicos e de 15% nos casos subclínicos (Radostits et al. 2002)). O valor de Sen utilizado de 48,5% (Diéguez et al. 2007) para correção dos valores de prevalência admite, em 100 animais verdadeiramente infetados, 51 falsos negativos. As respostas serológicas fracas devem-se às variações dos níveis de anticorpos, onde estes podem estar abaixo do limite detetável em certas fases da doença, são exemplos os animais não excretores, em fase subclínica ou em início da fase clínica (Good 2009; Savey et al. 2009) ou ainda em fase avançada de anergia (Savey et al. 2009). Estas situações podem resultar em falsos negativos. A imperfeição global da Sen do ELISA é responsável pela não segurança dos resultados, justificando que um animal com um único resultado seronegativo não possa ser considerado não infetado. Ao contrário da Sen, a Spe do ELISA é considerada elevada, variando entre 98 e 99% (Centro di Referenza Nazionale per la Paratuberculosis 2022) refletindo uma baixa proporção de falsos positivos. O valor de Spe usado de 98,9% (Diéguez et al. 2007) admite em 100 animais verdadeiramente infetados, um animal falso positivo. No entanto, estes acontecem por reação cruzada com outras micobactérias ou quando o ELISA é realizado nos 90 dias após a prova de IDTC (Varges et al. 2009). Os valores de prevalência aparente podem aparecer distorcidos se a Sen e a Spe do teste diagnóstico não forem consideradas (Reiczigel et al. 2010) e, devido à imperfeição do ELISA, foi calculada a prevalência verdadeira de modo a corrigir estes valores. A prevalência verdadeira calculada para cada uma das categorias de testagem (Aleatório, Não Definido, Quadro clínico suspeito e Vacada suspeita) foi superior aos valores

atribuídos para bovinos de carne (5%) (Lombard 2011). Como esperado, a categoria Quadro clínico suspeito foi aquela onde a prevalência verdadeira foi superior (41,1%) uma vez que estas testagens não foram aleatórias havendo já uma suspeita para o resultado positivo. No entanto, este valor para as categorias Aleatório (10,3%) e Vacada suspeita (12,5%) foram relativamente próximos. Esta proximidade sugere que a doença poderá estar presente de forma silenciosa nas explorações, pois na primeira categoria existe a testagem de indivíduos para venda/leilão, sem evidência de quadro clínico, enquanto na segunda são indivíduos de vacadas suspeitas onde foram registados casos recentes de PT. Todavia, no contexto da dissertação, consideraram-se positivas as explorações com pelo menos um animal positivo. Das 9 explorações com animais testados para motivos de venda/leilão, 6 apresentavam ao momento da testagem casos anteriores de PT desconhecendo-se o destino dos animais positivos e as decisões relativas ao manejo nestas explorações. Este dado sugere que muitos produtores desconhecem que a doença circula dentro da sua exploração, descobrindo-a apenas aquando de testagens casuais, e ainda que após a confirmação de um caso de PT muitas vezes as decisões perante o animal positivo e o manejo poderão estar a ser menosprezadas. A prevalência individual verdadeira de 20% foi superior ao valor estimado para os bovinos de carne noutras publicações (Tabela 30).

Tabela 30. Comparação entre as prevalências individuais aparente e verdadeira para PT calculadas e referidos na literatura

| | Prevalência aparente | Prevalência verdadeira |
|-----------|------------------------------|-------------------------------|
| Calculada | 10,6% | 20% |
| Bélgica | 0,52% (Boelaert et al. 2000) | 2% (Boelaert et al. 2000) |
| Galiza | 1,59% (Diéguez et al. 2007) | 1,03% (Diéguez et al. 2007) |
| Irlanda | - | 3,09% (Good 2009) |
| Finlândia | 1,2% (Boelaert et al. 2000) | - |
| Orkney | 3,7% (Beasley et al. 2011) | - |

Das explorações abordadas, 42% foram consideradas infetadas. Todavia, apesar de se ter considerado uma exploração como infetada aquando da presença de pelo menos um animal positivo, o facto de haver explorações apenas com um único animal testado (37%) não garante segurança nos resultados. A existência de apenas um animal testado ou apenas um único momento de testagem num efetivo sem história pregressa de PT torna o resultado ELISA difícil de interpretar. Se o animal for seropositivo sem quadro clínico compatível ou sem história de casos na exploração, apesar da Spe alta, poderá ser um falso positivo (por exemplo, uma reação cruzada com micobactérias ambientais). Nestes casos, com um único resultado positivo sem confirmação posterior por PCR fecal, torna-se complicado de aferir a verdadeira infeção e, numa visão mais conservadora, admitir a exploração como infetada. Por outro lado, a Sen imperfeita dos testes de diagnóstico faz com que um resultado negativo não garanta a não infeção, pois o animal poderá ainda estar no período de incubação onde a

resposta humoral ainda está abaixo dos limites detetáveis e uma confirmação por PCR fecal ou mesmo a repetição do ELISA poderá ser benéfica. A prova de IDTC realizada no contexto do programa de erradicação da TB, onde são inoculadas tuberculinas aviária e mamífera, pode ser uma ferramenta útil para estabelecer uma suspeita em efetivos que apresentam um elevado número de respostas positivas à tuberculina aviária. Esta prova tem como base a resposta imunitária celular (hipersensibilidade tipo IV) (Savey et al. 2009), característica das fases iniciais de PT (Coelho e Rodrigues 2007; World Organisation for Animal Health 2021), podendo servir como um método precoce para selecionar efetivos que poderão beneficiar de uma investigação mais profunda.

Os anos de 2019 e 2022 foram aqueles onde se verificaram maior número de animais testados devido à testagem de efetivos completos que contribuem para a entrada de um elevado número de animais num curto espaço de tempo. As prevalências aparentes nos efetivos testados variaram entre 2,3 e 15,5%. Destes, apenas o efetivo de menor valor é categorizado como de baixa prevalência. Os restantes apresentam valores muito perto ou dentro da classificação de prevalência moderada (entre 6% e 19%) (Centro di Referenza Nazionale per la Paratubercolosi 2022).

A generalidade dos casos positivos encontra-se concentrada no outono (n=63), enquanto a maioria dos casos suspeitos positivos se encontra distribuída na primavera (n=3). Este último facto, associado à chance superior de positividade dos casos suspeitos verificada na estação primaveril, vai ao encontro da literatura, que menciona uma maior frequência de casos clínicos no final do inverno e início da primavera (Coelho e Rodrigues 2007). A ocorrência de partos nesta altura do ano poderá ser um fator predisponente para o aparecimento de casos (Sweeney 2011; Koets et al. 2015) ou o DD com outras situações semelhantes a PT clínica que resultam na decisão de testagem (diarreias de origem alimentar por ingestão de erva verde típica da época, parasitismo gastrointestinal favorecido pela humidade primaveril). Nestas últimas situações o que acontece é que, apesar do quadro clínico não ter origem na infeção por MAP, o animal poderá estar concomitantemente infetado. A seca tem sido proposta como fator predisponente em algumas regiões de Espanha (Coelho e Rodrigues 2007) e se se considerar apenas os anos de seca, estes no distrito de Évora concentram a maioria dos casos positivos (57%) enquanto em Beja o valor aproxima-se dos 50% (48%). No entanto, ao contrário do esperado, foi verificada uma menor chance de positividade nos anos de seca em ambos os distritos quando comparado com os anos normais/chuvas fracas. O MAP tem uma elevada resistência ambiental (Spickler 2017), mas a sua longevidade por ser reduzida pela exposição à luz solar direta e secagem (Coelho e Rodrigues 2007) podendo estes fatores, de forma repetida, influenciar a dinâmica da disseminação do agente. A escassez alimentar associada à seca com consequente perda de condição corporal poderá levar a um DD de PT e respetiva testagem de animais não infetados.

Porém, de um modo geral, a limitação do acesso à água poderá funcionar como um impulsionador da concentração de animais que procuram as poucas fontes de água disponíveis favorecendo o desenvolvimento e propagação de doenças (Colegio Oficial de Veterinarios de Toledo 2023). O facto de haver maior proporção de animais testados positivos nos meses de verão (19,2%) e esta estação apresentar o segundo maior valor de proporção de suspeitos positivos (40%) poderá justificar-se pelos períodos de seca atuais, associado ao *stress* inerente, resultando no aparecimento de animais doentes e com conseqüente testagem do efetivo nas estações seguintes, nomeadamente no outono, contribuindo para o maior número de animais positivos nesta estação (n=63) e na categoria “Vacada suspeita” (n=40). O acesso aos registos do quadro clínico de todos os animais testados teria sido útil para determinar esta situação. No distrito de Évora, o número de anos de seca e de normais/chuvas foram semelhantes (7 e 8 anos, respetivamente), mas em Beja o número de anos de seca foi o dobro do número de anos normais/chuvas (10 e 5 anos, respetivamente). O número médio de casos clínicos positivos nos anos de seca em Évora foi superior ao número médio para os anos normais/chuvas indo de encontro à literatura e contra a influência verificada nos dados estudados. Em Beja a situação inverte-se, apesar das percentagens de casos positivos em ambos os tipos de ano serem próximas (48%, anos de seca; 52%, anos normais/chuvas) e existirem mais anos de seca. Neste distrito, a percentagem ligeiramente inferior e o menor número médio de casos nos anos de seca coincidem com a influência verificada. São dados contraditórios, havendo necessidade de mais estudos para determinar qual o papel da seca nesta doença.

Durante o período estudado, no distrito de Évora foram testadas explorações de 7 concelhos onde 6 apresentaram pelo menos um caso positivo sugerindo que a doença poderá estar disseminada pelos restantes territórios. As prevalências nos concelhos abordados variaram entre 7,3 e 42,6%, superiores aos valores atribuídos para bovinos de carne (5%) (Lombard 2011). Apesar do concelho de Redondo ser o concelho com maior prevalência (42,6%), foi no concelho de Alvito onde se verificaram mais casos positivos (n=44), provavelmente devido ao facto de ser o concelho com mais animais testados (testagens de efetivos completos). O mesmo é aplicado a Portel, concelho do distrito de Évora com mais casos positivos (n=20). Estes dados sugerem que a PT é uma doença subdiagnosticada nestas regiões do Alentejo. Todavia, não se pode determinar a indemnidade dos concelhos não abordados dos distritos de Évora e Beja devido à ausência de testagens. O facto da amostra não ser aleatória, ou seja, de existirem 603 animais com alguma predisposição para estarem infetados dos 951 testados, ou por serem animais com quadro clínico suspeito (n=34) ou por pertencerem a uma vacada suspeita (n=569), poderá sobrestimar as prevalências calculadas reforçando a necessidade de uma testagem dos efetivos de modo a determinar o verdadeiro cenário da doença nesta região.

A PT, devido ao seu longo período de incubação (2 a 7 anos) (Behr et al. 2020), é típica do gado mais velho onde o aparecimento do quadro clínico e a seroconversão só ocorrem tardiamente e os animais infetados podem não demonstrar uma resposta serológica detetável antes dos 3 a 5 anos de idade (Good 2009). Esta informação justifica a diferença significativa entre as idades dos animais positivos e não positivos e o aumento da chance de positividade com o avançar da idade principalmente nos animais com mais de 5 anos. As idades dos animais testados encontram-se entre os 4 meses e 16 anos, estando praticamente metade distribuída até aos 2 anos (n=55). A justificação poderá ser dada pela testagem aleatória de novilhos para venda/leilão frequentes nos bovinos de carne nestas idades. A média de idade foi de 4,1 anos, considerada já suspeita para a PT. A média de idade dos animais seropositivos (n=18) foi de 5,9 anos, onde a maioria destes apresenta mais de 5 anos e com idade mais frequente de 6 anos, mais uma vez indo de encontro às idades tardias descritas para a doença. No entanto, dos animais seropositivos, quatro tinham idade igual ou inferior a 3 anos. Apesar de ser uma idade onde já existe possibilidade de deteção de anticorpos, no contexto da literatura revista poderá ser considerada precoce. Animais seropositivos com idades inferiores a 3 anos poderão ser suspeitos de infeção pré-natal ou nos primeiros dias de vida. Outra hipótese é o animal se encontrar num ambiente com elevada contaminação ambiental e estar sujeito a uma alta pressão de infeção, pois o tempo de incubação é inversamente proporcional à dose de exposição (Lombard 2011). Destes quatro animais seropositivos, três pertencem à exploração com maior número de positivos e com o maior valor de prevalência aparente no efetivo (15,5%, Exploração 1) contribuindo para a credibilidade das suposições descritas. Os sinais clínicos/observações mais apresentados pelos animais testados foram diarreia crónica, a caquexia e a ausência de resposta ao tratamento anterior o que leva para o topo da lista de DD a PT, uma vez que a diarreia é o sinal mais típico desta doença incurável em bovinos (Coelho e Rodrigues 2007). Nos animais positivos a tendência manteve-se. A associação significativa entre o resultado e a ausência de resposta ao tratamento anterior, pelo em mau estado e mucosas pálidas é esperada pois são sinais clínicos/observações reportados na literatura para a PT. A diarreia crónica e caquexia, dois sinais clínicos bastante evidentes na PT, não demonstraram tal associação provavelmente devido ao facto de serem comuns a inúmeras outras doenças crónicas. A associação significativa entre o resultado e a presença de hálito com odor a acetona poderá ser justificada pela cetose derivada do balanço energético negativo, consequência da síndrome de mal absorção. Dos 34 animais com quadro clínico determinado, apenas 7 foram seropositivos. Apesar da Sen do ELISA aumentar nos casos clínicos, esta apresenta um valor de 87% (Radostits et al. 2002) havendo uma oportunidade considerável para falsos negativos. A Sen do ELISA depende da idade do animal, sendo superior em animais mais velhos (World Organisation for Animal Health 2021a) e não sendo aconselhado em animais com 15 a 18

meses de idade (Savey et al. 2009). A verificação da testagem ELISA de animais com idades de 2, 1 e até mesmo inferior a 1 ano poderá ser inadequada, exceto se suspeita de infecção *in útero* ou nos primeiros dias de vida pois o aparecimento dos sinais clínicos nestes casos pode ocorrer aos 12 a 18 meses de idade (Radostits et al. 2002). No geral, para animais com menos de 3 anos, o PCR fecal para deteção do agente será o mais adequado (Radostits et al. 2002). Todavia, as idades dos animais seropositivos variaram entre 2 e 13 e a existência de um animal com 2 anos seropositivo pode ser justificada por uma das situações já mencionadas uma vez que os bezerros nascidos de fêmeas seropositivas têm 6,6 vezes maior chance de também o serem (Fecteau 2018). Dos 27 animais com idade e quadro clínico determinado, 20 tinham idade superior a 2 anos, idade sugerida a partir da qual há aparecimento dos sinais clínicos (Radostits et al. 2002). Destes 27 animais apenas 6 foram seropositivos, onde a média de idade foi de 5,3 anos e a idade mais frequente de 6 anos igualmente compatíveis com o descrito para a PT. O número reduzido de animais positivos pode ser justificado pelo valor de Sen imperfeito do ELISA para casos clínicos já referido. A repetição da testagem ELISA ou a realização do PCR fecal poderia ter sido ponderada, principalmente nos animais de explorações onde a doença já tinha sido anteriormente detetada. Relativamente aos métodos diretos, durante o período estudado, existe um total de três testes PCR, dois em amostras fecais e um em amostra sanguínea. O PCR fecal para deteção do agente é o mais adequado em animais jovens (Radostits et al. 2002), sendo o método direto mais rápido e que deteta mais precocemente animais infetados (Savey et al. 2009). Estes dois PCR fecais representam animais com 9 meses sendo a opção adequada para esta faixa etária. No entanto, este método não se tornou tão generalizado como o ELISA provavelmente devido ao custo mais elevado e presença de inibidores (Juste et al. 2005), sendo muitas vezes reservado para animais de maior importância económica como os de raça pura. O PCR em sangue poderá ser um complemento de testagem por detetar animais infetados não detetados pelo ELISA (Juste et al. 2005). A presença de bacteriemia é um aspeto pouco estudado da PT (Swift et al. 2016), estando a infecção associada a um baixo nível desta (Swift et al. 2020). As micobactérias estão presentes no sangue antes do início dos sinais clínicos (Swift et al. 2016), sendo possível detetar o agente através de PCR (Münster et al. 2013). As técnicas de imunocoloração estão igualmente presentes, no entanto em número muito reduzido (n=6) sendo das análises mais antigas. Estas técnicas poderão ter vindo a ser menos solicitadas devido à possibilidade de reações cruzadas, ao tempo necessário para a obtenção de resultados e ao custo superior (Coelho e Rodrigues 2007; Spickler 2017), quando comparadas com outras opções.

Os resultados do inquérito sobre o plano voluntário de controlo para a PT foram positivos (Tabela 31), onde o interesse dos produtores inquiridos foi evidente. Os motivos apontados para a implementação do plano são correspondentes aos indicados por Whittington

et al. (2019), com a Saúde Animal a ser o motivo mais selecionado, seguido pelas perdas de produtividade. A facilidade de comércio é referida apenas em quinto lugar, enquanto os outros autores a colocam na terceira posição. Isto poderá justificar-se pela maioria dos produtores inquiridos não terem como principal objetivo a venda de reprodutores. Por outro lado, Whittington et al. (2019) coloca a Saúde Pública em quarto lugar para as motivações dos produtores. Os resultados apresentados colocam este motivo em terceiro lugar, indicando que os produtores entrevistados são preocupados com a incerteza do potencial zoonótico de MAP e com as possíveis consequências para o seu negócio. Este facto poderá revelar-se contraditório, pois apenas um produtor tinha conhecimento do plausível relacionamento de MAP com a DC, podendo as respostas ter sido influenciadas pelas informações dadas aquando da realização do inquérito. As considerações por parte dos produtores relativamente à Saúde Animal e saúde do consumidor podem ser elementos importantes para a participação nos programas de controlo de PT e certificação (Barkema et al. 2018). Tal como Zoche-Golob et al. (2021), os produtores questionados estabelecem a Segurança dos Alimentos como uma das motivações menos selecionadas. No entanto, mostra-se um resultado novamente contraditório porque a Saúde Pública foi um dos três motivos mais selecionados e esta estará relacionada com a Segurança dos Alimentos. Este resultado poderá ser explicado pela falta de informação disponível para os produtores relativamente à PT. Os incentivos financeiros foram o quarto motivo na publicação de Zoche-Golob et al. (2021), equivalente ao resultado obtido no inquérito. O financiamento pelas entidades governamentais é comum em muitos países com um programa de controlo para a PT e poderá ser um ponto-chave para a sustentabilidade do mesmo (Whittington et al. 2019).

Tabela 31. Comparação dos resultados do inquérito feito aos produtores relativamente à aplicação de um Plano de Controlo, Vigilância e Erradicação de Paratuberculose com os dados das publicações de Whittington et al. (2019) e Zoche-Golob et al. (2021)

| Motivo | Resultado do inquérito | Whittington et al., 2019 | Zoche-Golob et al., 2021 |
|--|------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Preservação da Saúde Animal | 100% | 100% | 73,8% |
| Aumentar a produtividade | 87,5% | 90% | 74,7% |
| Preservação da Saúde Pública | 62,5% | 36% | - |
| Incentivos financeiros | 62,5% | - | 58,2% |
| Facilitar a compra/venda de reprodutores | 50% | 68% | 60,9% |
| Ameaça à Segurança dos Alimentos | 37,5% | - | 25,8% |

3.4.1. Estudo de caso de uma exploração considerada infetada com Paratuberculose

A exploração pratica uma produção em regime extensivo, o que por si só é uma medida de mitigação da transmissão de MAP devido às amplas áreas de pastagem (Radostits et al. 2002; Behr et al. 2020), diferenças de manejo (Behr et al. 2020) e níveis de *stress* (Mcvey et al. 2013) e menor intensidade de produção. No entanto, a exploração apresenta algumas

falhas de biossegurança que podem aumentar o risco de introdução e disseminação da doença. A compra de animais em fase subclínica é a principal causa para a introdução da doença no efetivo (Lombard 2011) e, nesta exploração, a compra de machos para reprodução é um fator de risco. O produtor realiza a testagem dos novilhos apenas para detecção de anticorpos no soro sanguíneo (ELISA) e, apesar de ser o teste recomendado (Radostits et al. 2002), pode haver um falso sentimento de segurança relativamente ao verdadeiro estatuto de PT do animal. Devido ao longo período de incubação (Sweeney 1996), os animais infetados apresentam-se sem evidência de doença e os novilhos com menos de 3 anos podem não manifestar seropositividade (Smith et al. 2020). Nestes casos, a detecção fecal (PCR) poderá ser útil para confirmação (Radostits et al. 2002). O produtor poderia informar-se sobre a história de PT na exploração de origem e preferir explorações negativas (Kahn e Line 2010; Spickler 2017; Smith et al. 2021) e/ou com um plano de biossegurança semelhante ao seu (Radostits et al. 2002), situação que não se verifica atualmente. O facto de os touros permanecerem com as fêmeas durante todo o ano faz com que não exista uma época de partos definida e uma maior dificuldade no acompanhamento dos partos. Apesar de a vaca parida estar no seu próprio grupo, e existindo um intervalo entre partos entre 12 e 14 meses, esta será reintroduzida ao touro numa média de 4 meses após o parto. Nesta altura a vaca ainda está a criar o bezerro, pois o desmame só se realiza ao sexto mês de idade. Na confirmação de casos na exploração, o produtor deverá procurar determinar o estatuto de infeção dos animais pois, no regime extensivo de produção de bovinos de carne, os bezerros partilham espaços com outros bezerros e adultos de estatuto de infeção de PT desconhecido o que poderá ser um fator de risco, uma vez que os bezerros com menos de 6 meses permanecem suscetíveis (Lombard 2011). Os animais encontram-se permanentemente em pastagem, mas existe uma altura do ano em que o alimento é fornecido à mão (setembro a fevereiro). A distribuição do alimento no solo poderá revelar-se um problema devido à contaminação ambiental (Roussel 2011), pois os animais ao capturarem o alimento diretamente do solo podem igualmente ingerir partículas infetadas. Existe também o recurso a sobras de alimento de adultos para alimentar animais jovens, o que poderá funcionar como veículo de disseminação de MAP entre os dois grupos (Lombard 2011). O uso de lagos também já foi referido como fonte de infeção (Roussel et al. 2005) e a exploração utiliza barragens e pequenos lagos como fontes de água. Apesar de a água ser testada para parâmetros microbiológicos estes não incluem o MAP, logo esta não pode ser excluída como potencial fonte de infeção. O MAP já foi isolado em vários animais selvagens considerados reservatórios da doença e o contacto com fezes destes é uma realidade em vacadas em extensivo (Sweeney 1996; Daniels et al. 2001). A minimização do contato com a vida selvagem é vista como uma medida de diminuição do risco de transmissão de MAP (Spickler 2017) e a falta de um portão e a inexistência de uma cerca de abertura reduzida permitem a

entrada destes potenciais reservatórios. Não há uma prevenção do contacto direto (focinho com focinho) entre os animais de diferentes explorações, ou seja, não há vedações duplas que impeça um bovino de “cheirar” outro da exploração vizinha. Existindo uma hipótese de potencial via de transmissão por aerossóis (Lombard 2011) este ponto poderá ser visto como um fator de risco, não só para a PT, mas também para outras doenças com componente de *airborne disease* como a TB. As fezes são o principal material infetante e acabam por contaminar não só os parques e pastagens, mas também os equipamentos utilizados na alimentação dos animais como baldes, tetinas e alfaias (Lombard 2011; Sweeney 2011) sendo estes vistos como potenciais riscos de disseminação da doença dentro e entre explorações. Os veículos e a indumentária contaminados podem igualmente contribuir para a disseminação da PT: a inexistência de rodilúvio oferece oportunidade para a entrada do agente na exploração através dos veículos (por exemplo, camiões de transporte de animais ou alimento) que circulem entre várias explorações, transportando nas suas rodas material infetante; o uso da mesma indumentária entre várias explorações/grupos de animais poderá também funcionar como meio disseminador. Contudo, estes são pouco relevantes quando comparados com a entrada de animais em fase subclínica (Sweeney 1996). Considerando a resistência ambiental do agente, o manejo das pastagens no regime extensivo torna-se significativo para mitigar a exposição dos animais ao MAP (Whittington et al. 2019). A micobactéria pode permanecer infetante pelo menos um ano nas pastagens (Spickler 2017) alojando-se nas camadas superficiais do solo (Field et al. 2022). O produtor, apesar de praticar rotação de pastagens, não pratica o descanso ideal de 12 meses nem revolve o solo das mesmas. Apesar destas medidas serem importantes no controlo de MAP podem ser complicadas de aplicar, sendo preciso adaptá-las à realidade da exploração e disponibilidade do produtor.

As fêmeas bovinas apresentadas à consulta, ambas com idade acima dos 5 anos (6 anos) compatível com o aparecimento dos sinais clínicos (entre os 2 e 6 anos) (Radostits et al. 2002), apresentaram uma história progressiva e um exame físico sugestivos de PT, como perda de peso gradual (Fecteau 2018), diarreia crónica intermitente (Coelho e Rodrigues 2007; Spickler 2017), edema submandibular (Sweeney 2011) e pelo em mau estado (Behr et al. 2020). Uma das características da PT é o animal manter um comportamento normal e alerta (Spickler 2017), assim como o seu apetite e sinais vitais (Sweeney 2011; Spickler 2017; Fecteau 2018) o que foi igualmente verificado. A presença de palidez poderá dever-se à anemia (Garcia e Shalloo 2015) por doença crónica. O hálito cetónico poderá relacionar-se com uma cetose resultante do balanço energético negativo oriundo da síndrome de má absorção. A entrada na fase clínica poderá ser precipitada por situações de *stress*, como o parto (Sweeney 2011) podendo aplicar-se a este caso pois ambas pertencem ao grupo das fêmeas “paridas”. Devido à diarreia e perda de peso os principais DD foram o parasitismo

gastrointestinal, hemoparasitoses e PT. A hemoparasitose foi adicionada à lista de DD devido à palidez das mucosas, à perda de peso e ao mau aspeto geral do animal. No entanto, esta doença normalmente é acompanhada de febres elevadas, anorexia (Scott et al. 2011) e fezes secas não se enquadrando no exame clínico presenciado. Em clínica ambulatória de bovinos existe um acesso limitado a técnicas rápidas auxiliares de diagnóstico, havendo muitas vezes a necessidade de recolha de amostras para posterior envio para laboratório atrasando assim a decisão clínica. Tendo isto em conta, muitas vezes o tratamento aplicado após o exame clínico do animal é escolhido de modo a abranger os principais DD e a melhorar o bem-estar do animal. Num animal com quadro clínico compatível com PT (diarreia, perda peso e edema submandibular), o tratamento deverá incluir causas parasitárias, infecciosas, intoxicações e de origem alimentar. A opção pelo uso de antibiótico cobre a origem infecciosa e o uso de oxitetraciclina neste caso teria como base o DD de hemoparasitoses. O tratamento sugerido para esta doença é uso de antibióticos do grupo das tetraciclina (*Anaplasma*, *Theileria*), e, dependendo do protozoário detetado (*Babesia*, *Anaplasma*) no esfregaço sanguíneo, imidocarb (Cockcroft 2015). O uso de anti-inflamatórios é recomendado de modo proporcionar conforto ao animal. O recurso a suplementos vitamínicos é sugerido em animais com má condição corporal ou mau estado do pelo de modo a auxiliar a convalescença do animal. Em casos de diarreia e perda de peso a desparasitação com ivermectina também deve ser considerada devido ao parasitismo gastrointestinal estar no topo da lista de DD. A associação desta com clorsulon (ativo contra *Fasciola*) (Cockcroft 2015) poderia ter sido ponderada para descarte de fasciolose, uma vez que os animais têm acesso a zonas alagadas (barragem e poças) e não foram desparasitados com uma substância ativa contra este parasita. Uma vez que a literatura também inclui como DD intoxicações, acidoses e indigestões (Otter e Cranwell 2007; Smith 2015) o uso de substâncias regularizadoras da função gastrointestinal, estimulantes do metabolismo ou estimulantes da atividade hepático-digestiva poderiam ter sido outras opções a ponderar no tratamento. Sendo a PT uma doença incurável (Behr et al. 2020), os animais não apresentaram qualquer tipo de melhoria. Relativamente aos testes complementares de diagnóstico, o esfregaço sanguíneo e a coprologia possibilitam descartar a hemoparasitose e o parasitismo gastrointestinal, respetivamente. O esfregaço sanguíneo permite a avaliação dos eritrócitos, nomeadamente se existem inclusões compatíveis com hemoparasitas de bovinos (*Babesia*, *Anaplasma* e *Theileira*). O método de Willis permite averiguar, de forma grosseira, a presença de parasitas pela observação de uma elevada quantidade de ovos de nematodes e/ou oocistos de protozoários, como coccídeas, nas fezes. Como já referido, o único teste que revelou positividade foi o ELISA indireto para PT.

O produtor optou por separar e isolar os animais positivos e aplicar uma testagem ELISA aos restantes animais com mais de um ano. Dos 171 animais testados, verificaram-se 4 positivos e 1 duvidoso. A prevalência aparente foi de 2,3%, considerada baixa ($\leq 5\%$) (Centro

di Referenza Nazionale per la Paratuberculosis 2022). A escolha do ELISA para testagem do efetivo foi a adequada de acordo com a literatura, sendo o teste mais rápido (Radostits et al. 2002), mais barato e prático para testagens em grandes quantidades (Smith et al. 2020). No entanto, o uso do ELISA poderá dar uma falsa sensação de segurança ao produtor, pois devido à imperfeição de Sen (Radostits et al. 2002) apenas um teste negativo não garante a inexistência de infecção (Field et al. 2022). Apesar da situação, a prevalência verdadeira corrigida para os valores de Sen e Spe foi de 2,6%, muito próximo do valor aparente. Terá de se considerar o efeito *iceberg*, pois a maioria dos animais infetados está em fase subclínica sendo disseminadores silenciosos da doença (Spickler 2017). Por cada animal com doença avançada, existem 15 a 25 animais infetados (Fecteau 2018). Se em consulta foram apresentados dois animais com quadro clínico compatível com PT e posteriormente confirmados, seria de esperar que 30 a 50 outros animais da exploração estivessem infetados. Havendo 171 animais e, considerando o valor inferior, neste efetivo era possível que existissem 30 animais infetados e 141 não infetados. Se admitirmos os valores de Sen (48,5%) e Spe (98,9%) utilizados por Diéguez et al. (2007) para o teste ELISA no soro sanguíneo seria de esperar 17 animais seropositivos entre os quais 15 são verdadeiramente doentes e 2 falsos positivos (Tabela 32). Através destes cálculos, metade dos animais infetados seriam falsos negativos (n=15) e a diferença, mais uma vez, poderá justificar-se pela fraca Sen do ELISA e pela ausência de resposta humoral detetável nos casos subclínicos onde a Sen cai para 17% (Radostits et al. 2002). Esta situação faz com que os animais em fase subclínica e potencialmente infecciosos permaneçam na exploração, disseminando silenciosamente a doença. Uma testagem por PCR fecal dos animais seronegativos poderia ser útil para redução do número de animais excretadores, principalmente numa exploração de baixa seroprevalência. A Sen do ELISA aumenta em efetivos de prevalências superiores, sendo por isso provável que nos efetivos de baixa prevalência o valor se deva ao refugo já aplicado aos animais em fase avançada da doença ou à existência de animais em fase subclínica (Good 2009).

Tabela 32. Número de animais infetados de acordo com o número de animais com PT clínica segundo Fecteau (2018) e respetiva classificação como verdadeiros positivos (VP), falsos positivos (FP), verdadeiros negativos (VN) e falsos negativos (FN) pelos valores de Sen (48,5%) e Spe (98,9%) atribuídos por Diéguez et al. (2007)

| | | Estado de Paratuberculose | | Total |
|-----------------|----------|---------------------------|----------|-------|
| | | Presente | Ausente | |
| Resultado ELISA | Positivo | 15 (VP) | 2 (FP) | 17 |
| | Negativo | 15 (FN) | 139 (VN) | 154 |
| Total | | 30 | 141 | 171 |

A testagem serológica em animais com mais de um ano poderá ter sido inadequada, pois animais infetados com menos de 2 anos é pouco provável que já tenham seroconvertido

e podem não demonstrar uma resposta serológica detetável antes dos 3 a 5 anos de idade (Good 2009). As exceções serão os casos de infeção pré-natal, infeção nos primeiros dias de vida ou exposição a ambientes extremamente contaminados.

De modo a quebrar a cadeia de transmissão, reduzir o número de animais excretores e conseqüentemente a probabilidade de contaminação ambiental, a recomendação foi o refugo dos animais positivos e duvidosos assim como da sua descendência. A testagem e refugo de positivos num efetivo infetado é essencial num programa de controlo, não só porque permite o cálculo da prevalência da infeção como também mitiga as perdas económicas associadas à PT e disseminação dentro do efetivo (Barkema et al. 2018). A decisão do produtor foi de encontro à recomendação médico-veterinária, todavia, apenas a aplicação desta estratégia sem alterações de manejo não é suficiente para controlar a longo prazo a doença na exploração (Whittington et al. 2019; Smith et al. 2020).

4. Conclusão

Os resultados sugerem um cenário de subdiagnóstico de PT, demonstrado pela prevalência individual verdadeira calculada (20%), superior aos valores atribuídos noutros países e regiões e pelos valores de prevalência aparente de três dos quatro efetivos testados estarem bastante perto ou dentro da categoria de prevalência moderada. No entanto, a prevalência individual poderá estar sobrevalorizada pois a maioria dos animais testados pertencem a vacadas onde circula o agente. Das explorações incluídas, 42% foram consideradas infetadas e 6 dos 7 concelhos abordados no distrito de Évora, a doença está presente em 6 com prevalências superiores às apontadas para os bovinos de carne. No entanto, os restantes concelhos não podem ser considerados indemnes porque não existem dados de testagem para o afirmar. A estação primaveril está associada à positividade de casos suspeitos, porém os anos de seca, ao contrário do esperado, revelaram uma diminuição na chance de positividade, havendo a necessidade de mais estudos para averiguar esta relação. Apesar do ELISA ser o teste mais utilizado, as suas imperfeições de Sen e Spe tornam-no insuficiente para alcançar o controlo. Idealmente, os animais seronegativos suspeitos deveriam ser retestados com recurso a PCR fecal. Os produtores mostraram-se interessados num programa voluntário de controlo de PT e apresentou-se um exemplo de um proprietário sensibilizado que optou pela testagem do efetivo. No entanto, no nosso país não existe um protocolo de controlo publicado pelas entidades oficiais para a PT e a sugestão apresentada oferece uma base para o efeito.

Durante a elaboração desta dissertação vários desafios foram encontrados, como os dados incompletos sobre os animais testados (ausência de indicação de sinais clínicos, idade, motivo de testagem), a falta de registos dos pesos de desmame e índices de reprodução da exploração do estudo de caso, que teria sido interessante de abordar de modo a verificar o impacto possível da doença nestes parâmetros. O conhecimento limitado por parte dos produtores sobre a PT dificultou a realização do inquérito, mostrando a necessidade de campanhas de educação com destino aos mesmos. A existência de apenas um animal testado ou um único momento de testagem num efetivo sem história pregressa de PT torna o resultado ELISA difícil de interpretar e, numa visão mais conservadora, de admitir a exploração como infetada. Espera-se que brevemente sejam propostos novos métodos de diagnóstico precoce e um avanço na tecnologia vacinal, de modo a permitir o uso da vacina nos bovinos de carne. Nestes, as medidas de controlo são desafiantes de aplicar podendo funcionar como fator desmotivador para a participação num plano de controlo e a vacinação nos efetivos de carne poderá ser uma ferramenta crucial no controlo da doença. Num contexto de melhoramento da produtividade, Saúde e Bem-Estar Animal e da ideologia *One Health* revela-se importante que as entidades oficiais avancem com um plano oficial de controlo voluntário para a PT à semelhança de outras doenças como o IBR e BVD.

5. Referências bibliográficas

- Animal and Plant Health Inspection Service. 2010. Uniform Program Standards for the Voluntary Bovine Johne's Disease Control Program. Washington DC. [acedido a 25 de Setembro de 2023] em https://johnes.org/wp-content/uploads/2018/10/USDA_Program_Standards_Sept-2010.pdf.
- Animal Health Ireland. 2021. Johne's Disease Herdowner Flowchart. Johne's disease leaflet series. 7:1–21. [acedido a 25 de Setembro de 2023] em <https://animalhealthireland.ie/assets/uploads/2021/08/JD-Herdowners-Flow-Chart-2021.pdf>.
- Arsenault RJ, Maattanen P, Daigle J, Potter A, Griebel P, Napper S. 2014. From mouth to macrophage: Mechanisms of innate immune subversion by *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*. *Veterinary Research*. 45(1). doi:10.1186/1297-9716-45-54.
- Barkema HW, Orsel K, Nielsen SS, Koets AP, Rutten VPMG, Bannantine JP, Keefe GP, Kelton DF, Wells SJ, Whittington RJ, et al. 2018. Knowledge gaps that hamper prevention and control of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection. *Transboundary and Emerging Diseases*. 65:125–148. doi:10.1111/tbed.12723.
- Beasley L, Truylers IGR, Mellor DJ, Norquay R, Duthie S, Ellis KA. 2011. Prevalence of Johne's disease among cattle in Orkney. *Veterinary Record*. 169(2):50. doi:10.1136/vr.d891.
- Behr MA, Stevenson K, Kapur V. 2020. *Paratuberculosis Organism, Disease, Control*. 2nd ed. Behr MA, Stevenson K, Kapur V, editors. Wallingford: CAB International.
- Bharath MN, Gupta S, Vashistha G, Ahmad S, Singh SV. 2023. Bioprospective Role of *Ocimum sanctum* and *Solanum xanthocarpum* against Emerging Pathogen: *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis*: A Review. *Molecules*. 28(8):3490. doi:10.3390/molecules28083490.
- Boelaert F, Walravens K, Biront P, Vermeersch JP, Berkvens D, Godfroid J. 2000. Prevalence of paratuberculosis (Johne's disease) in the Belgian cattle population. *Veterinary Microbiology*. 77(3–4):269–281. doi:10.1016/s0378-1135(00)00312-6.
- Buergelt CD, Donovan GA, Williams JE. 2004. Identification of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* by Polymerase Chain Reaction in Blood and Semen of a Bull with Clinical Paratuberculosis. *The International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*. 2(2):130–134.
- Cattle Health Certification Standards. 2021. New Rules for Cattle Health Schemes on Johne's Disease. [acedido a 25 de Setembro de 2023] em <https://checs.co.uk/wp-content/uploads/2021/11/CHECS-Technical-document-Johnes-disease-rule-change-released-220621-date-01-11-2021.pdf>.
- Centro di Referenza Nazionale per la Paratuberculosis. 2022. Manuale per il controllo della Paratuberculosis negli allevamenti di bovini da carne (linea vacca-vitello). [acedido a 25 de Setembro de 2023] em https://www.izsler.it/cdrparatuberculosis/wp-content/uploads/sites/11/2023/06/NEL-06_Allegato-1_B_MANUALE_bovini_carne_Rev_2.pdf.
- Cheng Z, Liu M, Wang P, Liu P, Chen M, Zhang J, Liu S, Wang F. 2020. Characteristics and Epidemiological Investigation of Paratuberculosis in Dairy Cattle in Tai'an, China. *BioMed Research International*. 2020. doi:10.1155/2020/3896754.
- Coad M, Clifford DJ, Vordermeier HM, Whelan AO. 2013. The consequences of vaccination with the Johne's disease vaccine, Gudair, on diagnosis of bovine tuberculosis. *Veterinary Record*. 172(10). doi:10.1136/vr.101201.
- Cockcroft PD. 2015. *Bovine medicine*. 3rd ed. Chichester: Wiley-Blackwell.

- Coelho ACC, Rodrigues J de A. 2007. Paratuberculose: aspectos etiológicos, epidemiológicos, clínicos e de diagnóstico. Vila Real: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.
- Colegio Oficial de Veterinarios de Toledo. 2023. Los veterinarios de Toledo advierten que la sequía también es un problema de salud pública. [accedido a 14 de Novembro de 2023] em <https://www.colveto.com/web/los-veterinarios-de-toledo-advierten-que-la-sequia-tambien-es-un-problema-de-salud-publica/>.
- Collins MT. 2011a. Diagnosis of Paratuberculosis. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*. 27(3):581–591. doi:10.1016/j.cvfa.2011.07.013.
- Collins MT. 2011b. Food Safety Concerns Regarding Paratuberculosis. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*. 27(3):631–636. doi:10.1016/j.cvfa.2011.07.009.
- Collins MT. Johnes's Information Center: Histo- (microscopic) pathology. [accedido a 1 de Fevereiro de 2024] em <https://johnes.org/image-gallery/histo-microscopic-pathology/>.
- Committee for medical products for Veterinary use. 2007. Committee for medical products for veterinary use: Monesin (Cattle, including dairy cows). Londres. <http://www.emea.europa.eu>.
- Committee for Veterinary Medical Products. 2022. Advice on the designation of antimicrobials or groups of antimicrobials reserved for treatment of certain infections in humans - revision. Amesterdão. www.ema.europa.eu/contact.
- Cousins D V., Condrón RJ, Eamens GJ, Whittington RJ, Lisle de GW. 2002. Paratuberculosis (Johnes's Disease). Australia and New Zealand Standard Diagnostic Procedure.:1–21. [accedido a 30 de Maio de 2023] em [https://www.agriculture.gov.au/sites/default/files/sitecollectiondocuments/animal/ah/ANZSDP-Paratuberculosis-Johnes-disease\[superseded\].pdf](https://www.agriculture.gov.au/sites/default/files/sitecollectiondocuments/animal/ah/ANZSDP-Paratuberculosis-Johnes-disease[superseded].pdf).
- Daniels MJ, Ball N, Hutchings MR, Greig A. 2001. The Grazing Response of Cattle to Pasture Contaminated with Rabbit Faeces and the Implications for the Transmission of Paratuberculosis. *Veterinary Journal*. 161(3):306–313. doi:10.1053/tvjl.2000.0550.
- Department for Environment Food and Rural Affairs. 2004. Guidance on control of Johnes's disease in dairy herds. [accedido a 11 de Dezembro de 2023] em www.food.gov.uk/science/sciencetopics/microbiology/mapinmilk.
- Diéguez FJ, Arnaiz I, Sanjuán ML, Vilar MJ, López M, Yus E. 2007. Prevalence of serum antibodies to *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in cattle in Galicia (northwest Spain). *Preventive Veterinary Medicine*. 82(3–4):321–6. doi:10.1016/j.prevetmed.2007.08.006.
- Elzo MA, Rae DO, Lanhart SE, Hembry FG, Wasdin JG, Driver JD. 2009. Association between cow reproduction and calf growth traits and ELISA scores for paratuberculosis in a multibreed herd of beef cattle. *Tropical Animal Health and Production*. 41(6):851–858. doi:10.1007/s11250-008-9262-y.
- Esteves A, Vieira-pinto M, Quintas H, Orge L, Gama A, Alves A, Seixas F, Pires I, Pinto M de L, Mendonça AP, et al. 2021. Scrapie at abattoir: Monitoring, control, and differential diagnosis of wasting conditions during meat inspection. *Animals*. 11(11). doi:10.3390/ani11113028.
- Fanelli A, Buonavoglia D, Pleite CMC, Tizzani P. 2020. Paratuberculosis at European scale: An overview from 2010 to 2017. *Veterinaria Italiana*. 56(1):13–21. doi:10.12834/VetIt.1829.9692.3.

- Fanelli A, Galgano M, Sposato A, Buonavoglia D. 2022. Assessment of Paratuberculosis international official reporting in Europe using the information supplied to the WOA by National Veterinary Services. *Veterinaria Italiana*. 58(2). doi:10.12834/VetIt.2625.16709.3.
- Fecteau ME. 2018. Paratuberculosis in Cattle. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*. 34(1):209–222. doi:10.1016/j.cvfa.2017.10.011.
- Fecteau ME, Whitlock RH. 2011. Treatment and Chemoprophylaxis for Paratuberculosis. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*. 27(3):547–557. doi:10.1016/j.cvfa.2011.07.002.
- Field NL, McAloon CG, Gavey L, Mee JF. 2022. Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis infection in cattle – a review in the context of seasonal pasture-based dairy herds. *Irish Veterinary Journal*. 75(1). doi:10.1186/s13620-022-00217-6.
- Garcia AB, Shalloo L. 2015. Invited review: The economic impact and control of paratuberculosis in cattle. *Journal of Dairy Science*. 98(8):5019–5039. doi:10.3168/jds.2014-9241.
- Geraghty T, Graham DA, Mullowney P, More SJ. 2014. A review of bovine Johne's disease control activities in 6 endemically infected countries. *Preventive Veterinary Medicine*. 116(1–2):1–11. doi:10.1016/j.prevetmed.2014.06.003.
- Good M. 2009. Prevalence and distribution of paratuberculosis (Johne's disease) in cattle herds in Ireland. *Irish Veterinary Journal*. 62(9):597–606.
- Gupta S, Singh SV, Singh M, Chaubey KK, Karthik K, Bhatia AK, Kumar N, Dhama K. 2019. Vaccine approaches for the “therapeutic management” of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis infection in domestic livestock. *The Veterinary Quarterly*. 39(1):143–152. doi:10.1080/01652176.2019.1667042.
- Jaber KK, Abdullah FA, Othman RM. 2018. Diagnostic application os ELISA and IS900 PCR using buffy coat as a source sample for the detection of Mycobacterium avium subspecies Paratuberculosis in subclinical cases of bovine paratuberculosis. *Basrah Journal of Veterinary Research*. 17(3):186–200. doi:10.23975/bjvetr.2018.172977. https://bjvr.uobasrah.edu.iq/article_172977.html.
- Johne's Disease Research Consortium, DairyNZ. 2015. Johne's Disease: Management for New Zealand dairy herds. [acedido a 2023 Set 25] em <https://www.dairynz.co.nz/media/gyibqzbzc/animal-johnes-disease-management.pdf>.
- Jornal Oficial da União Europeia. 2018. Regulamento de execução (UE) 2018/ 1882 da Comissão de 3 de dezembro de 2018 relativo à aplicação de determinadas regras de prevenção e controlo de doenças a categorias de doenças listadas e que estabelece uma lista de espécies e grupos de espécies que apresentam um risco considerável de propagação dessas doenças listadas. Bruxelas.
- Juste RA, Garrido JM, Geijo M, Elguezabal N, Aduriz G, Atxaerandio R, Sevilla I. 2005. Comparison of blood polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection in cattle and sheep. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 17(4):354–359. doi:https://doi.org/10.1177/104063870501700409.
- Kahn CM, Line S. 2010. *The Merck Veterinary Manual*. 10th ed. Whitehouse Station NJ, Merck&Co., editors.
- Koets AP, Eda S, Sreevatsan S. 2015. The within host dynamics of Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis infection in cattle: Where time and place matter Modeling Johne's

- disease: From the inside out Dr Ad Koets and Prof Yrjo Grohn. *Veterinary Research*. 46(61). doi:10.1186/s13567-015-0185-0.
- Kruip TAM, Muskens J, van Roermund HJW, Bakker D, Stockhofe-Zurwieden N. 2003. Lack of association of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with oocytes and embryos from moderate shedders of the pathogen. *Theriogenology*. 59(7):1651–1660. doi:10.1016/s0093-691x(02)01208-6.
- Leão C, Botelho A, Martins E, Aguiar C, Rebelo I, Nunes T, Bexiga R. 2017. Presence of *Mycobacterium avium* subs. *paratuberculosis* DNA in milk used to feed calves in Portugal. *Journal of Dairy Research*. 84(2):124–127. doi:10.1017/S0022029917000164.
- Lombard JE. 2011. Epidemiology and Economics of Paratuberculosis. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*. 27(3):525–535. doi:10.1016/j.cvfa.2011.07.012.
- Ly A, Dhand NK, Sergeant ESG, Marsh I, Plain KM. 2019. Determining an optimal pool size for testing beef herds for Johne's disease in Australia. *PLoS One*. 14(11). doi:10.1371/journal.pone.0225524.
- MacDonald-Phillips KA, McKenna SLB, Shaw DH, Keefe GP, VanLeeuwen J, Artemiou E, Adams CL. 2022. Communication skills training and assessment of food animal production medicine veterinarians: A component of a voluntary Johne's disease control program. *Journal of Dairy Science*. 105(3):2487–2498. doi:10.3168/jds.2021-20677.
- Manning EJB, Augenstein M, Collins MT, Nelson KM. 2003. Johne's Disease: The Recipient Risk. *Bovine Practitioner*. 37(1):20–22. <http://www.johnes.org/handouts>.
- Matos AC, Figueira L, Martins MH, Loureiro F, Pinto ML, Matos M, Coelho AC. 2014. Survey of *mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in road-killed wild carnivores in Portugal. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 45(4):775–781. doi:10.1638/2014-0010.1.
- Mcvey DS, Kennedy M, Chengappa MM. 2013. *Veterinary Microbiology*. Oxford: John Wiley & Sons, Inc.
- Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação. 1989. Portaria 859/89, de 3 de Outubro. Lisboa: Diário da República no228 - Série I.
- Mintz MJ, Lukin DJ. 2023. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) and Crohn's disease: The debate continues. *Translational Gastroenterology and Hepatology*. 8. doi:10.21037/tgh-23-16.
- Münster P, Völkel I, Wemheuer W, Schwarz D, Döring S, Czerny C-P. 2013. A longitudinal study to characterize the distribution patterns of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in semen, blood and faeces of a naturally infected bull by IS 900 semi-nested and quantitative real-time PCR. *Transboundary and emerging diseases*. 60(2):175–87. doi:10.1111/j.1865-1682.2012.01336.x.
- New York State Cattle Health Assurance Program. 2019. Principles of Johne's Prevention and Control. [acedido a 27 de Setembro de 2023] em <https://www.vet.cornell.edu/animal-health-diagnostic-center/programs/nyschap/modules-documents/Johnes-Principles>.
- Nielsen S, Jepsen Ø, Aagaard K. 2006. Control programme for paratuberculosis in Denmark. In: *Proceedings of the First Paratuberculosis Forum*. p. 23–29. <https://www.researchgate.net/publication/280941923>.
- Nielsen SS. 2007. Danish control programme for bovine paratuberculosis. *Cattle Practice*. 15:161–168. <https://www.researchgate.net/publication/285693529>.

- Otter A, Cranwell M. 2007. Differential diagnosis of diarrhoea in adult cattle. In Practice. 29(1):9–19. doi:10.1136/inpract.29.1.9.
- Patton EA. 2011. Paratuberculosis Vaccination. Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice. 27(3):573–580. doi:10.1016/j.cvfa.2011.07.004.
- Perry GH, Vivanco H, Holmes I, Gwozdz JM, Bourne J. 2006. No evidence of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in in vitro produced cryopreserved embryos derived from subclinically infected cows. Theriogenology. 66(5):1267–1273. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.02.052.
- Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. 2002. Paratuberculose (Enfermidade de Johne). In: Guanabara Koogan, editor. Clínica Veterinária: Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos. 9a. p. 827–839.
- Rangel SJ, Paré J, Doré E, Arango JC, Côté G, Buczinski S, Labrecque O, Fairbrother JH, Roy JP, Wellemans V, et al. 2015. Article A systematic review of risk factors associated with the introduction of Mycobacterium avium spp. paratuberculosis (MAP) into dairy herds. The Canadian Veterinary Journal. 56: 168-177. [acedido a 9 de Junho de 2023] em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25694667/>.
- Reiczigel J, Földi J, Ózsvári L. 2010. Exact confidence limits for prevalence of a disease with an imperfect diagnostic test. Epidemiology and Infection. 138(11):1674–1678. doi:10.1017/S0950268810000385.
- Rohde RF, Shulaw WP. 1990. Isolation of Mycobacterium paratuberculosis from the uterine flush fluids of cows with clinical paratuberculosis. Journal of the American Veterinary Medical Association. 197(11).
- Rosseels V, Huygen K. 2008. Vaccination against paratuberculosis. Expert Review of Vaccines. 7(6):817–832. doi:10.1586/14760584.7.6.817.
- Roussel AJ. 2011. Control of Paratuberculosis in Beef Cattle. Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice. 27(3):593–598. doi:10.1016/j.cvfa.2011.07.005.
- Roussel AJ, Libal MC, Whitlock RL, Hairgrove TB, Barling KS, Thompson JA. 2005. Prevalence of and risk factors for paratuberculosis in purebred beef cattle. Journal of the American Veterinary Medical Association. 226(5):773–778.
- Savey M, Cerf O, Cortot A, Dufour B, Garin-Bastuji B, Guillotin J, Hugot J-P, Laroucau-Huet K, Laval A, Marchal G, et al. 2009. Paratuberculose des Ruminants. Nancy: Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments. www.afssa.fr.
- Scott PR, Penny CD, Macrae AI. 2011. Cattle medicine. 1st ed. London: Manson Publishing Ltd.
- Serrano M, Elguezabal N, Sevilla IA, Geijo M V., Molina E, Arrazuria R, Urkitza A, Jones GJ, Vordermeier M, Garrido JM, et al. 2017. Tuberculosis detection in paratuberculosis vaccinated calves: New alternatives against interference. PLoS One. 12(1). doi:10.1371/journal.pone.0169735.
- Seva J, Sanes JM, Mas A, Ramis G, Sánchez J, Párraga-Ros E. 2022. Prevalence of Mycobacterium avium Subsp. paratuberculosis in Feral Pigeons (Columba livia) Associated with Difficulties Controlling Paratuberculosis in a Bovine Herd (Fighting Bull Breed). Animals. 12(23). doi:10.3390/ani12233314.
- Sigurardóttir ÓG, Valheim M, Press CML. 2004. Establishment of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection in the intestine of ruminants. Advanced Drug Delivery Reviews. 56(6):819–834. doi:10.1016/j.addr.2003.10.032.
- Smith BP, Pusterla N, Van Metre DC. 2020. Large Animal Internal Medicine. 6th ed. Elsevier.

- Smith G. 2015. Antimicrobial Decision Making for Enteric Diseases of Cattle. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*. 31(1):47–60. doi:10.1016/j.cvfa.2014.11.004.
- Spickler AR. 2017. Paratuberculosis Johne's Disease. [acedido a 29 de Março de 2023]. Em <https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pt/paratuberculosis-PT.pdf>.
- Stabel JR, Bradner L, Robbe-Austerman S, Beitz DC. 2014. Clinical disease and stage of lactation influence shedding of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis into milk and colostrum of naturally infected dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 97(10):6296–6304. doi:10.3168/jds.2014-8204.
- Streeter RN, Hoffsis GF, Bech-Nielsen S, Shulaw WP, Rings DM. 1995. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows. *Am J Vet Res*. 56(10). [acedido a 4 de Abril de 2023] em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8928949/>.
- Sweeney RW. 1996. Transmission of paratuberculosis. *Veterinary Clinics of North America - Food animal practice*. 12(2):305–312. doi:10.1016/S0749-0720(15)30408-4.
- Sweeney RW. 2011. Pathogenesis of Paratuberculosis. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*. 27(3):537–546. doi:10.1016/J.CVFA.2011.07.001.
- Sweeney RW, Whitlock RH, Rosenberger AE. 1992. *Mycobacterium paratuberculosis* isolated from fetuses of infected cows not manifesting signs of the disease. *American Journal of Veterinary Research*. 53(4). [acedido em 2023 Abr 4]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1586015/>.
- Swift BMC, Huxley JN, Plain KM, Begg DJ, de Silva K, Purdie AC, Whittington RJ, Rees CED. 2016. Evaluation of the limitations and methods to improve rapid phage-based detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in the blood of experimentally infected cattle. *BMC Veterinary Research*. 12(1). doi:10.1186/s12917-016-0728-2.
- Swift BMC, Meade N, Barron ES, Bennett M, Perehenic T, Hughes V, Stevenson K, Rees CED. 2020. The development and use of Actiphage® to detect viable mycobacteria from bovine tuberculosis and Johne's disease-infected animals. *Microbial Biotechnology*. 13(3):738–746. doi:10.1111/1751-7915.13518.
- Thomsen VT, Nielsen SS, 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(1–2):316–322. doi:10.1016/j.vetimm.2011.11.021.
- Truyers I, Jennings A. 2016. Management and control of Johne's disease in beef suckler herds. *In Practice*. 38(7):347–354. doi:10.1136/inp.i3394.
- United States Animal Health Association. 2002. How to do risk assessments and management plans for Johne's Disease. [acedido a 27 de Setembro de 2023] em https://agriculture.mo.gov/animals/pdf/how_to_dairy_and_beef.pdf.
- Vargas R, Marassi CD, Oelemann W, Lilenbaum W. 2009. Interference of intradermal tuberculin tests on the serodiagnosis of paratuberculosis in cattle. *Research in Veterinary Science*. 86(3):371–372. doi:10.1016/j.rvsc.2008.08.006.
- Velázquez-Morales JV, Santillán-Flores MA, Gallegos-Sánchez J, Cuca-García JM, Navarro-Maldonado M del C, Rojas-Martínez RI, Cortez-Romero C. 2019. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in reproductive tissue and semen of naturally infected rams. *Animal Reproduction*. 16(4):930–937. doi:10.21451/1984-3143-AR2018-0147.

- Waddell L, Rajić A, Stärk K, McEwen SA. 2016. *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* detection in animals, food, water and other sources or vehicles of human exposure: A scoping review of the existing evidence. *Preventive Veterinary Medicine*. 132:32–48. doi:10.1016/j.prevetmed.2016.08.003.
- Waddell LA, Rajic A, Stärk KDC, McEwen SA. 2015. The zoonotic potential of *Mycobacterium avium* ssp. *Paratuberculosis*: A systematic review and meta-analyses of the evidence. *Epidemiology and Infection*. 143(15):3135–3157. doi:10.1017/S095026881500076X.
- Weber MF, Verhoeff J, van Schaik G, van Maanen C. 2009. Evaluation of Ziehl–Neelsen stained faecal smear and ELISA as tools for surveillance of clinical paratuberculosis in cattle in the Netherlands. *Preventive Veterinary Medicine*. 92(3):256–266. doi:10.1016/j.prevetmed.2009.08.017.
- Whittington R, Donat K, Weber MF, Kelton D, Nielsen SS, Eisenberg S, Arrigoni N, Juste R, Sáez JL, Dhand N, et al. 2019. Control of paratuberculosis: Who, why and how. A review of 48 countries. *BMC Veterinary Research*. 15(1). doi:10.1186/s12917-019-1943-4.
- Whittington RJ, Marshall DJ, Nicholls PJ, Marsh IB, Reddacliff LA. 2004. Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(5):2989–3004. doi:10.1128/AEM.70.5.2989-3004.2004.
- Whittington RJ, Windsor PA. 2009. In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: A critical review and meta-analysis. *Veterinary Journal*. 179(1):60–69. doi:10.1016/j.tvjl.2007.08.023.
- Willey JM, Sherwood L, Woolverton CJ. 2014. *Prescott's microbiology*. 9th ed. New York: The McGraw-Hill Companies.
- World Organisation for Animal Health. 2021a. Paratuberculosis (Johne's Disease). In: *The Terrestrial Animal Health Code*.
- World Organisation for Animal Health. 2021b. Paratuberculosis. Listed Disease. [acedido a 14 de Dezembro de 2023] em <https://www.woah.org/en/disease/paratuberculosis/>.
- World Organisation For Animal Health. 2022. Mammalian Tuberculosis (infection with *Mycobacterium tuberculosis* Complex). In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. 20th ed.
- Yamamoto T, Murai K, Hayama Y, Kobayashi S, Nagata R, Kawaji S, Osaki M, Sakakibara S, Tsutsui T. 2018. Evaluation of fecal shedding and antibody response in dairy cattle infected with paratuberculosis using national surveillance data in Japan. *Preventive Veterinary Medicine*. 149:38–46. doi:10.1016/j.prevetmed.2017.10.009.
- Zoche-Golob V, Pützschel R, Einax E, Donat K. 2021. Identification of different attitudes towards paratuberculosis control using cluster analysis applied on data from an anonymous survey among German cattle farmers. *Irish Veterinary Journal*. 74(1). doi:10.1186/s13620-021-00204-3.

Anexos

Anexo 1. Pedidos de testagem para a PT entre os anos de 2008 e 2022 na área de atuação do HVME (distritos de Évora e Beja)

| Distrito | Concelho | Exploração | Data | Nº animais | Nº testes | Teste | Amostra | Pos. | Neg. | Duv. | Tipo de testagem | Notas |
|----------|-----------------------|------------|------------|------------|------------------|-------------------------------|---------------------|------|------|------|------------------|--|
| Beja | Alvito | 1 | 02/10/2008 | 2 | 1 2 2 1 | CFAu ELISA IMNF IMNP | I; F S F I | 0 | 2 | 0 | ND | Animais testados com mais do que um método |
| Beja | Alvito | 1 | 03/10/2008 | 4 | 4 | ELISA | S | 0 | 4 | 0 | ND | |
| Beja | Alvito | 1 | 21/10/2008 | 1 | 1 | ELISA | S | 1 | 0 | 0 | ND | |
| Évora | Arraiolos | 2 | 21/10/2008 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Arraiolos | 3 | 06/02/2009 | 1 | 1 1 | IMNF CFAu | I | 0 | 1 | 0 | ND | Animal testado com mais do que um método |
| Beja | Alvito | 4 | 11/06/2010 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Beja | Alvito | 1 | 18/06/2010 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Beja | Alvito | 1 | 13/08/2010 | 2 | 2 | ELISA | S | 0 | 2 | 0 | ND | |
| Beja | Alvito | 4 | 28/09/2010 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Portel | 5 | 08/10/2010 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Arraiolos | 71 | 14/10/2010 | 6 | 6 | ELISA | S | 0 | 6 | 0 | ND | |
| Évora | Arraiolos | 6 | 12/11/2010 | 3 | 3 | ELISA | S | 2 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Évora | 7 | 27/05/2011 | 1 | 1 | ELISA | S | 1 | 0 | 0 | ND | |
| Évora | Reguengos de Monsaraz | 8 | 27/05/2011 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Évora | 9 | 21/06/2011 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Beja | Alvito | 1 | 15/07/2011 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Arraiolos | 10 | 22/07/2011 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Beja | Alvito | 1 | 09/09/2011 | 2 | 2 | ELISA | S | 0 | 2 | 0 | ND | |
| Évora | Arraiolos | 11 | 16/09/2011 | 2 | 2 | ELISA | S | 1 | 1 | 0 | ND | |
| Beja | Alvito | 1 | 17/02/2012 | 1 | 1 | ELISA | S | 1 | 0 | 0 | ND | |
| Évora | Arraiolos | 12 | 28/02/2012 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |

| | | | | | | | | | | | | |
|-------|-----------------------|----|------------|---|---|-------|---|---|---|---|-------------------------|------------|
| Évora | Arraiolos | 13 | 02/03/2012 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Montemor-o-Novo | 14 | 12/04/2012 | 2 | 2 | ELISA | S | 0 | 2 | 0 | ND | |
| Beja | Alvito | 1 | 10/10/2012 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Beja | Alvito | 1 | 29/01/2013 | 1 | 1 | ELISA | S | 1 | 0 | 0 | ND | |
| Évora | Évora | 15 | 22/02/2013 | 3 | 3 | ELISA | S | 0 | 3 | 0 | ND | |
| Beja | Alvito | 1 | 26/04/2013 | 1 | 1 | ELISA | S | 1 | 0 | 0 | ND | |
| Beja | Alvito | 1 | 07/05/2013 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Redondo | 16 | 31/05/2013 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Évora | 17 | 12/07/2013 | 1 | 1 | ELISA | S | 1 | 0 | 0 | ND | |
| Évora | Arraiolos | 13 | 19/07/2013 | 1 | 1 | ELISA | S | 1 | 0 | 0 | Quadro clínico suspeito | DC, C, SRT |
| Évora | Arraiolos | 11 | 20/08/2013 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Évora | 18 | 16/01/2014 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | Quadro clínico suspeito | DC, C |
| Évora | Évora | 17 | 08/08/2014 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | Quadro clínico suspeito | DC, C |
| Beja | Alvito | 1 | 08/10/2014 | 1 | 1 | ELISA | S | 1 | 0 | 0 | ND | |
| Évora | Reguengos de Monsaraz | 19 | 14/10/2014 | 2 | 2 | ELISA | S | 0 | 2 | 0 | ND | |
| Évora | Viana do Alentejo | 20 | 17/10/2014 | 1 | 1 | ELISA | S | 1 | 0 | 0 | ND | |
| Beja | Alvito | 1 | 07/11/2014 | 4 | 4 | ELISA | S | 3 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Évora | 21 | 31/12/2014 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Beja | Alvito | 1 | 20/01/2015 | 2 | 2 | ELISA | S | 1 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Redondo | 22 | 20/03/2015 | 2 | 2 | ELISA | S | 2 | 0 | 0 | ND | |
| Évora | Évora | 7 | 30/12/2016 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Beja | Alvito | 1 | 17/07/2015 | 1 | 1 | ELISA | S | 1 | 0 | 0 | ND | |
| Beja | Alvito | 1 | 23/07/2015 | 1 | 1 | ELISA | S | 1 | 0 | 0 | ND | |
| Beja | Alvito | 1 | 31/07/2015 | 1 | 1 | ELISA | S | 1 | 0 | 0 | ND | |
| Beja | Alvito | 1 | 27/08/2015 | 1 | 1 | ELISA | S | 1 | 0 | 0 | ND | |
| Évora | Évora | 7 | 15/01/2020 | 2 | 2 | PCR | F | 0 | 2 | 0 | ND | |

| | | | | | | | | | | | | |
|-------|-------------------|----|------------|----|----|-------|---|---|----|---|-----------------|---------------------------------------|
| Évora | Évora | 18 | 09/10/2015 | 1 | 1 | ELISA | S | 1 | 0 | 0 | ND | |
| Beja | Alvito | 1 | 19/10/2015 | 1 | 1 | ELISA | S | 1 | 0 | 0 | ND | |
| Beja | Alvito | 1 | 09/11/2015 | 1 | 1 | ELISA | S | 1 | 0 | 0 | ND | |
| Évora | Viana do Alentejo | 25 | 29/01/2016 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Beja | Alvito | 1 | 05/07/2016 | 1 | 1 | ELISA | S | 1 | 0 | 0 | ND | |
| Beja | Alvito | 1 | 12/08/2016 | 1 | 1 | ELISA | S | 1 | 0 | 0 | ND | |
| Évora | Évora | 7 | 20/01/2020 | 14 | 14 | ELISA | S | 0 | 14 | 0 | Aleatório | Testagem compra/venda/leilão |
| Beja | Alvito | 1 | 20/09/2016 | 54 | 54 | ELISA | S | 7 | 47 | 0 | Vacada suspeita | Vacada com casos de PT já confirmados |
| Beja | Alvito | 1 | 23/09/2016 | 60 | 60 | ELISA | S | 4 | 56 | 0 | Vacada suspeita | Vacada com casos de PT já confirmados |
| Beja | Alvito | 1 | 04/10/2016 | 15 | 15 | ELISA | S | 9 | 6 | 0 | Vacada suspeita | Vacada com casos de PT já confirmados |
| Beja | Beja | 26 | 05/10/2016 | 7 | 7 | ELISA | S | 0 | 7 | 0 | ND | |
| Beja | Alvito | 1 | 07/10/2016 | 4 | 4 | ELISA | S | 0 | 4 | 0 | ND | |
| Évora | Évora | 27 | 07/10/2016 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Évora | 21 | 18/10/2016 | 1 | 1 | ELISA | S | 1 | 0 | 0 | ND | |
| Évora | Évora | 7 | 01/09/2020 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | Aleatório | Testagem compra/venda/leilão |
| Évora | Évora | 28 | 08/11/2016 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Évora | 21 | 08/11/2016 | 16 | 16 | ELISA | S | 0 | 16 | 0 | ND | |
| Évora | Montemor-o-Novo | 29 | 11/11/2016 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Évora | 21 | 11/11/2016 | 2 | 2 | ELISA | S | 0 | 2 | 0 | ND | |
| Évora | Redondo | 16 | 18/11/2016 | 1 | 1 | ELISA | S | 1 | 0 | 0 | ND | |
| Évora | Évora | 30 | 30/12/2016 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Évora | 7 | 09/09/2020 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Arraiolos | 31 | 20/01/2017 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Évora | 7 | 10/09/2020 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | Aleatório | Testagem compra/venda/leilão |
| Beja | Alvito | 1 | 26/01/2017 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Évora | 7 | 07/10/2020 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | Aleatório | Testagem compra/venda/leilão |
| Beja | Alvito | 1 | 07/02/2017 | 2 | 2 | ELISA | S | 0 | 2 | 0 | ND | |

| | | | | | | | | | | | | |
|-------|-------------------|----|------------|----|----|-------|-------|---|----|---|-----------|----------------------------------|
| Évora | Arraiolos | 33 | 07/02/2017 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Arraiolos | 10 | 10/02/2017 | 1 | 1 | ELISA | S | 1 | 0 | 0 | ND | |
| Évora | Évora | 21 | 29/03/2017 | 1 | 1 | PCR | Sang. | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Beja | Alvito | 1 | 28/04/2017 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Beja | Alvito | 1 | 05/05/2017 | 9 | 9 | ELISA | S | 0 | 9 | 0 | ND | |
| Beja | Alvito | 1 | 25/05/2017 | 14 | 14 | ELISA | S | 0 | 14 | 0 | ND | |
| Beja | Alvito | 1 | 09/06/2017 | 30 | 30 | ELISA | S | 0 | 30 | 0 | ND | |
| Beja | Alvito | 1 | 15/09/2017 | 1 | 1 | ELISA | S | 1 | 0 | 0 | ND | |
| Évora | Évora | 18 | 19/10/2017 | 7 | 7 | ELISA | S | 0 | 7 | 0 | ND | |
| Évora | Arraiolos | 34 | 20/10/2017 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Portel | 35 | 26/10/2017 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Beja | Alvito | 1 | 22/12/2017 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Portel | 35 | 05/01/2018 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Redondo | 36 | 17/01/2018 | 2 | 2 | ELISA | S | 1 | 1 | 0 | ND | |
| Beja | Alvito | 1 | 13/02/2018 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Viana do Alentejo | 37 | 20/07/2018 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Évora | 7 | 15/10/2020 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Arraiolos | 38 | 24/08/2018 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | Quadro clínico suspeito DC, M |
| Évora | Montemor-o-Novo | 39 | 05/09/2018 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Évora | 7 | 25/01/2021 | 2 | 2 | ELISA | S | 0 | 2 | 0 | Aleatório | Testagem compra/venda/leilão |
| Évora | Arraiolos | 40 | 20/11/2018 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Portel | 41 | 22/11/2018 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Viana do Alentejo | 43 | 04/01/2019 | 4 | 4 | ELISA | S | 0 | 4 | 0 | Aleatório | Testagem compra/venda/leilão |
| Beja | Alvito | 1 | 15/10/2020 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 0 | 1 | ND | |
| Évora | Viana do Alentejo | 37 | 16/01/2019 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Évora | 44 | 28/02/2019 | 5 | 5 | ELISA | S | 0 | 5 | 0 | ND | Quadro clínico suspeito DC, C |

| | | | | | | | | | | | | |
|-------|-----------------------|----|------------|---|---|-------|---|---|---|---|-------------------------|------------------------------|
| Beja | Alvito | 1 | 19/11/2020 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Évora | 45 | 28/03/2019 | 1 | 1 | ELISA | S | 1 | 0 | 0 | ND | |
| Évora | Viana do Alentejo | 46 | 17/04/2019 | 1 | 1 | ELISA | S | 1 | 0 | 0 | Quadro clínico suspeito | DC |
| Évora | Évora | 47 | 07/05/2019 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Viana do Alentejo | 25 | 16/05/2019 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Évora | 7 | 06/09/2021 | 1 | 1 | ELISA | S | 1 | 0 | 0 | ND | |
| Beja | Alvito | 1 | 05/11/2021 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Viana do Alentejo | 49 | 27/08/2019 | 5 | 5 | ELISA | S | 0 | 5 | 0 | ND | |
| Évora | Évora | 7 | 05/09/2022 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | Aleatório | Testagem compra/venda/leilão |
| Beja | Alvito | 1 | 03/05/2022 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Reguengos de Monsaraz | 8 | 31/10/2019 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | Quadro clínico suspeito | DC, SRT |
| Évora | Portel | 50 | 08/11/2019 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Montemor-o-Novo | 14 | 12/11/2019 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Redondo | 51 | 19/11/2019 | 1 | 1 | ELISA | S | 1 | 0 | 0 | ND | |
| Évora | Évora | 7 | 26/09/2022 | 8 | 8 | ELISA | S | 0 | 8 | 0 | Aleatório | Testagem compra/venda/leilão |
| Évora | Évora | 23 | 08/04/2015 | 2 | 2 | ELISA | S | 1 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Évora | 30 | 11/12/2019 | 2 | 2 | ELISA | S | 0 | 2 | 0 | ND | |
| Évora | Évora | 23 | 09/09/2016 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Arraiolos | 53 | 17/12/2019 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Évora | 23 | 18/10/2016 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | Aleatório | Testagem compra/venda/leilão |
| Évora | Évora | 24 | 03/09/2015 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Beja | Castro Verde | 54 | 20/01/2020 | 3 | 3 | ELISA | S | 0 | 3 | 0 | ND | |
| Évora | Évora | 9 | 21/01/2020 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | Quadro clínico suspeito | DC |
| Évora | Redondo | 55 | 28/01/2020 | 1 | 1 | ELISA | S | 1 | 0 | 0 | ND | |
| Évora | Évora | 24 | 27/07/2018 | 1 | 1 | ELISA | S | 1 | 0 | 0 | ND | |

| | | | | | | | | | | | | |
|-------|-------------------|----|------------|-----|-----|-------|---|----|-----|---|-------------------------|---------------------------------------|
| Évora | Arraiolos | 56 | 11/03/2020 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Redondo | 51 | 19/03/2020 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Évora | 24 | 12/11/2018 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Viana do Alentejo | 20 | 07/05/2020 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Évora | 24 | 10/09/2020 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Évora | 24 | 13/04/2022 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | Aleatório | Testagem compra/venda/leilão |
| Évora | Redondo | 58 | 22/07/2020 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Évora | 24 | 04/08/2022 | 2 | 2 | ELISA | S | 0 | 2 | 0 | ND | |
| Beja | Castro Verde | 54 | 12/08/2020 | 1 | 1 | ELISA | S | 1 | 0 | 0 | Quadro clínico suspeito | C |
| Évora | Montemor-o-Novo | 59 | 17/08/2020 | 1 | 1 | ELISA | S | 1 | 0 | 0 | ND | |
| Évora | Montemor-o-Novo | 32 | 24/01/2017 | 1 | 1 | ELISA | S | 1 | 0 | 0 | ND | |
| Évora | Montemor-o-Novo | 32 | 31/01/2017 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Montemor-o-Novo | 32 | 25/09/2020 | 6 | 6 | ELISA | S | 2 | 3 | 1 | Aleatório | Testagem compra/venda/leilão |
| Évora | Montemor-o-Novo | 32 | 01/10/2020 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Montemor-o-Novo | 32 | 08/01/2021 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Portel | 42 | 04/01/2019 | 1 | 1 | ELISA | S | 1 | 0 | 0 | ND | |
| Évora | Portel | 42 | 25/03/2019 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Montemor-o-Novo | 59 | 24/09/2020 | 6 | 6 | ELISA | S | 0 | 6 | 0 | ND | |
| Évora | Portel | 42 | 14/08/2019 | 1 | 1 | ELISA | S | 1 | 0 | 0 | ND | |
| Évora | Redondo | 60 | 01/10/2020 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Portel | 42 | 02/10/2019 | 252 | 252 | ELISA | S | 15 | 237 | 0 | Vacada suspeita | Vacada com casos de PT já confirmados |
| Évora | Montemor-o-Novo | 59 | 02/10/2020 | 6 | 6 | ELISA | S | 0 | 6 | 0 | Quadro clínico suspeito | C |
| Évora | Portel | 42 | 28/08/2020 | 1 | 1 | ELISA | S | 1 | 0 | 0 | Aleatório | Testagem compra/venda/leilão |
| Évora | Portel | 42 | 23/09/2020 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |

| | | | | | | | | | | | | |
|-------|-------------------|----|------------|---|---|-------|---|---|---|---|-------------------------|-----------------------------------|
| Évora | Portel | 42 | 23/09/2020 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Évora | 9 | 15/10/2020 | 1 | 1 | ELISA | S | 1 | 0 | 0 | ND | |
| Évora | Arraiolos | 56 | 27/10/2020 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | Quadro clínico suspeito | C |
| Évora | Arraiolos | 61 | 28/10/2020 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | Quadro clínico suspeito | C, F |
| Évora | Redondo | 62 | 30/10/2020 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Beja | Castro Verde | 54 | 05/11/2020 | 8 | 8 | ELISA | S | 0 | 8 | 0 | ND | |
| Évora | Évora | 9 | 13/11/2020 | 3 | 3 | ELISA | S | 0 | 3 | 0 | Quadro clínico suspeito | DC DC, ECTOP DC, ECTOP, MET |
| Évora | Portel | 42 | 19/02/2021 | 1 | 1 | ELISA | S | 1 | 0 | 0 | ND | |
| Évora | Évora | 9 | 26/11/2020 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | Quadro clínico suspeito | DC, C, VC |
| Évora | Montemor-o-Novo | 59 | 22/12/2020 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Arraiolos | 56 | 30/12/2020 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Portel | 42 | 04/03/2021 | 5 | 5 | ELISA | S | 1 | 4 | 0 | ND | |
| Évora | Viana do Alentejo | 43 | 25/01/2021 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | Aleatório | Testagem compra/venda/leilão |
| Évora | Portel | 42 | 13/05/2021 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Portel | 42 | 17/05/2021 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 0 | 1 | ND | |
| Évora | Portel | 42 | 22/09/2021 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 0 | 1 | ND | |
| Beja | Castro Verde | 54 | 11/03/2021 | 1 | 1 | ELISA | S | 1 | 0 | 0 | ND | |
| Évora | Arraiolos | 63 | 11/03/2021 | 2 | 2 | ELISA | S | 2 | 0 | 0 | Quadro clínico suspeito | DC, C, F |
| Évora | Évora | 27 | 31/03/2021 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Portel | 42 | 12/11/2021 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Évora | 48 | 13/06/2019 | 7 | 7 | ELISA | S | 0 | 7 | 0 | ND | |
| Évora | Montemor-o-Novo | 59 | 01/06/2021 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |

| | | | | | | | | | | | | |
|-------|-------------------|----|------------|----|----|-------|---|---|----|---|-------------------------|---------------------------------------|
| Évora | Évora | 18 | 28/06/2021 | 1 | 1 | ELISA | S | 1 | 0 | 0 | ND | |
| Évora | Évora | 48 | 04/09/2019 | 1 | 1 | ELISA | S | 1 | 0 | 0 | ND | |
| Évora | Évora | 52 | 29/11/2019 | 1 | 1 | ELISA | S | 1 | 0 | 0 | ND | |
| Évora | Viana do Alentejo | 43 | 04/10/2021 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Arraiolos | 57 | 25/03/2020 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Évora | 64 | 15/10/2021 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | Aleatório | Testagem compra/venda/leilão |
| Évora | Évora | 52 | 05/12/2019 | 17 | 17 | ELISA | S | 1 | 14 | 2 | Vacada suspeita | Vacada com casos de PT já confirmados |
| Évora | Évora | 52 | 13/12/2019 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Évora | 65 | 12/11/2021 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | Quadro clínico suspeito | DC, A |
| Évora | Montemor-o-Novo | 66 | 18/01/2022 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | Quadro clínico suspeito | C, DC, AMI |
| Évora | Arraiolos | 56 | 25/01/2022 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Évora | 67 | 16/02/2022 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Évora | 30 | 11/03/2022 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Viana do Alentejo | 46 | 05/04/2022 | 2 | 2 | ELISA | S | 0 | 2 | 0 | Quadro clínico suspeito | DC |
| Évora | Arraiolos | 57 | 03/07/2020 | 1 | 1 | ELISA | S | 1 | 0 | 0 | ND | |
| Évora | Évora | 68 | 20/04/2022 | 2 | 2 | ELISA | S | 1 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Arraiolos | 69 | 22/04/2022 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Évora | 52 | 28/01/2020 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Évora | 27 | 21/07/2022 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Arraiolos | 57 | 10/07/2020 | 2 | 2 | ELISA | S | 0 | 2 | 0 | Aleatório | Testagem compra/venda/leilão |
| Évora | Évora | 9 | 18/08/2022 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | Quadro clínico suspeito | DC, ESM |
| Évora | Arraiolos | 57 | 04/08/2020 | 2 | 2 | ELISA | S | 0 | 2 | 0 | Aleatório | Testagem compra/venda/leilão |
| Beja | Alvito | 70 | 14/09/2022 | 1 | 1 | ELISA | S | 1 | 0 | 0 | Quadro clínico suspeito | DC, SRT, C, ESM, MP, H |

| | | | | | | | | | | | | |
|-------|-----------|----|------------|-----|-----|-------|---|---|-----|---|-------------------------|---------------------------------------|
| Évora | Arraiolos | 56 | 26/09/2022 | 3 | 3 | ELISA | S | 0 | 3 | 0 | Aleatório | Testagem compra/venda/leilão |
| Évora | Arraiolos | 57 | 11/10/2021 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Évora | Arraiolos | 6 | 30/09/2022 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |
| Beja | Alvito | 70 | 30/09/2022 | 1 | 1 | ELISA | S | 1 | 0 | 0 | Quadro clínico suspeito | DC, SRT, C, ESM, MP, H |
| Beja | Alvito | 70 | 07/10/2022 | 171 | 171 | ELISA | S | 4 | 166 | 1 | Vacada suspeita | Vacada com casos de PT já confirmados |
| Évora | Arraiolos | 6 | 18/10/2022 | 3 | 3 | ELISA | S | 0 | 3 | 0 | ND | |
| Évora | Redondo | 58 | 19/10/2022 | 1 | 1 | ELISA | S | 0 | 1 | 0 | ND | |

Legenda:

CFAu=Coloração fluorescente (auramina); ELISA=ELISA indireito; IMNF=Imunofluorescência; IMNP=Imunoperoxidase; F=Fezes; I=Intestino; Sang.=Sangue; S=Soro sanguíneo

Pos.=Positivo; Neg.=Negativo; Duv.=Duvidoso

ND=Não definido

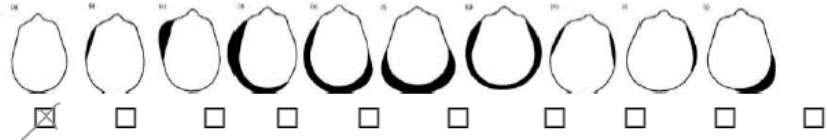
A=anorexia; AMI=aumento motilidade intestinal; C=caquexia; DC=diarreia crónica; Ectop=ectoparasitas; ESM=edema submandibular; F=febril; H=hálito cetónico; M=melena; Met=metrite; MP=mucosas pálidas; PB=pelo baço/mau estado; SRT=não responsivo ao tratamento; VC=vaca caída

Número total de testes pedidos: 956

Número total de animais testados: 951

Anexo 2. Ficha de exame clínico relativo ao caso clínico de PT em duas fêmeas bovinas aleitantes em regime extensivo apresentado

| Ficha de exame clínico |
|---|
| Identificação dos animais e anamnese |
| Número de animais positivos: 2 |
| Idade: Menos de 2 anos <input type="checkbox"/> Entre 2 a 5 anos <input type="checkbox"/> Mais de 5 anos <input checked="" type="checkbox"/> |
| Raça: Cruzado de Carne |
| Sexo: Macho <input type="checkbox"/> Fêmea <input checked="" type="checkbox"/> Se fêmeas: Gestantes <input type="checkbox"/> Não <input checked="" type="checkbox"/> Quanto tempo? Menos de 3 meses <input type="checkbox"/> 3 a 6 meses <input type="checkbox"/> Mais de 6 meses <input type="checkbox"/> |
| Relação de parentesco entre os animais doentes? Sim <input type="checkbox"/> Não <input checked="" type="checkbox"/> Se sim, qual? |
| Origem dos animais: Própria exploração <input checked="" type="checkbox"/> Comprados <input type="checkbox"/> Se comprados, há quanto tempo estão na exploração? |
| Existe divisão da vacada em grupos? Sim <input checked="" type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Se sim, qual o critério? Novilhas, Gestantes e Paridas Qual o grupo a que pertencem os animais em questão? Paridas |
| História clínica apresentada pelos animais/motivo da testagem: Animais fracos sem forma de progressão. Sinais clínicos: emagrecimento, edema submandibular, diarreia crônica de carácter intermitente, mau estado do pelo. Duração dos sinais: Mais de 1 mês. |
| Vacinações aplicadas na exploração: Clostridioses <input checked="" type="checkbox"/> BVD <input checked="" type="checkbox"/> IBR <input checked="" type="checkbox"/> Leptospirose <input type="checkbox"/> Complexo respiratório bovino <input type="checkbox"/> Diarreias neonatais <input type="checkbox"/> Outras: |
| Desparasitação: Ectoparasitas <input checked="" type="checkbox"/> Endoparasitas <input checked="" type="checkbox"/> Realizada nos últimos 6 meses? <input checked="" type="checkbox"/> Inclui substância ativa compra Fasciola? Sim <input type="checkbox"/> Não <input checked="" type="checkbox"/> <i>Nota: Semestral Substância ativa: ivermectina</i> |
| Exame físico |
| Condição corporal (1 a 5): 1 <input type="checkbox"/> 2 <input checked="" type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 <input type="checkbox"/> |
| Comportamento: Normal <input checked="" type="checkbox"/> Prostração <input type="checkbox"/> Isolamento <input type="checkbox"/> Excitação <input type="checkbox"/> Decúbito <input type="checkbox"/> |
| Estado do pelo: Normal <input type="checkbox"/> Eriçado <input type="checkbox"/> Alopecia <input type="checkbox"/> Baço <input checked="" type="checkbox"/> |
| Ingestão de água: Normal <input checked="" type="checkbox"/> Aumentada <input type="checkbox"/> Diminuída <input type="checkbox"/> |
| Apetite: Normal <input checked="" type="checkbox"/> Aumentado <input type="checkbox"/> Diminuído <input type="checkbox"/> |
| Repleção do rúmen: Normal <input checked="" type="checkbox"/> Vazio <input type="checkbox"/> Cheio <input type="checkbox"/> Timpanizado <input type="checkbox"/> |
| Ruminação: Observada <input checked="" type="checkbox"/> Não observada <input type="checkbox"/> |
| Salivação: Normal <input checked="" type="checkbox"/> Excessiva <input type="checkbox"/> |
| Fezes: Normais <input type="checkbox"/> Secas <input type="checkbox"/> Diarreia <input checked="" type="checkbox"/> Sangue <input type="checkbox"/> Muco <input type="checkbox"/> Ausentes <input type="checkbox"/> |
| Tenesmo retal: Sim <input type="checkbox"/> Não <input checked="" type="checkbox"/> |
| Claudicações: _____ |
| Edemas: Nenhum <input type="checkbox"/> Papo <input checked="" type="checkbox"/> Peito <input type="checkbox"/> Membros <input type="checkbox"/> Ventre <input type="checkbox"/> |
| Frequência respiratória: Animal 1 : 24 RPM ; Animal 2 : 28 RPM |
| Tipo de respiração: Normal <input checked="" type="checkbox"/> Dispneia <input type="checkbox"/> Ruídos <input type="checkbox"/> |
| Tosse: Sim <input type="checkbox"/> Ocasional <input type="checkbox"/> Frequente <input type="checkbox"/> Quando estimulado <input type="checkbox"/> Não <input checked="" type="checkbox"/> |

| |
|--|
| Tolerância ao exercício: Normal <input checked="" type="checkbox"/> Diminuída <input type="checkbox"/> |
| Corrimento nasal: Sim <input type="checkbox"/> Não <input checked="" type="checkbox"/> Tipo: |
| Bruxismo: Sim <input type="checkbox"/> Não <input checked="" type="checkbox"/> |
| Úbere: Normal <input checked="" type="checkbox"/> Edema <input type="checkbox"/> Lesões <input type="checkbox"/> Assimetrias <input type="checkbox"/> Quente <input type="checkbox"/> |
| Perfil abdominal:  |
| Temperatura retal: Animal 1: 38,2 °C ; Animal 2: 38,6 °C |
| Mucosa vaginal: Normal <input type="checkbox"/> Pálida <input checked="" type="checkbox"/> Ictérica <input type="checkbox"/> Congestionada <input type="checkbox"/> Úlceras <input type="checkbox"/> |
| Frequência cardíaca: Animal 1: 64 BPM ; Animal 2: 72 BPM |
| Tempo de repleção capilar: 22 segundos |
| Mucosa oral: Normal <input type="checkbox"/> Pálida <input checked="" type="checkbox"/> Ictérica <input type="checkbox"/> Congestionada <input type="checkbox"/> Úlceras <input type="checkbox"/> Cianótica <input type="checkbox"/> |
| Alterações na cavidade oral: Normal <input checked="" type="checkbox"/> Dentes <input type="checkbox"/> Gengiva <input type="checkbox"/> Lábios <input type="checkbox"/> Língua <input type="checkbox"/> Palato <input type="checkbox"/> Quais? |
| Halitose: Sim <input checked="" type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> |
| Auscultação pulmonar: Normal <input checked="" type="checkbox"/> Alterada <input type="checkbox"/> Como? |
| Contrações ruminiais: Normal <input checked="" type="checkbox"/> Diminuídas <input type="checkbox"/> Aumentadas <input type="checkbox"/> |
| Percussão abdominal esquerda: Normal <input checked="" type="checkbox"/> Timpânico <input type="checkbox"/> Maciço <input type="checkbox"/> Ping <input type="checkbox"/> |
| Percussão abdominal direita: Normal <input checked="" type="checkbox"/> Timpânico <input type="checkbox"/> Maciço <input type="checkbox"/> Ping <input type="checkbox"/> |
| Linfonodos: Normais <input checked="" type="checkbox"/> Aumentados <input type="checkbox"/> Quais? Pré-escapular <input type="checkbox"/> Pré-femoral <input type="checkbox"/> Submandibular <input type="checkbox"/> Retromamário <input type="checkbox"/> |
| Urina: Normal <input checked="" type="checkbox"/> Alterada <input type="checkbox"/> |
| Tenesmo urinário: Sim <input type="checkbox"/> Não <input checked="" type="checkbox"/> |
| Corrimento vulvar: Sim <input type="checkbox"/> Não <input checked="" type="checkbox"/> Aspeto, cheiro, volume: |
| Leite: Normal <input checked="" type="checkbox"/> Alterado <input type="checkbox"/> Aspeto do leite: Quartos afetados: |
| Pênis e prepúcio: Normal <input type="checkbox"/> Alterado <input type="checkbox"/> Descrição das alterações: Não se aplica |
| Escroto e testículos: Normal <input type="checkbox"/> Alterado <input type="checkbox"/> Descrição das alterações: Não se aplica |
| Visão: Normal <input checked="" type="checkbox"/> Alterada <input type="checkbox"/> |
| Reflexo de ameaça: Normal <input checked="" type="checkbox"/> Alterado <input type="checkbox"/> |
| Globo ocular: Normal <input checked="" type="checkbox"/> Corrimento <input type="checkbox"/> Ulceração <input type="checkbox"/> Pink eye <input type="checkbox"/> |
| Alterações nervosas: Ausente <input checked="" type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Quais? |
| Palpação retal: Útero: sem alterações Ovários: |

| |
|---|
| <p>Cérvix: Rim: Ceco: sem alterações Rúmen: Fezes: diarreia Outro:</p> |
| <p>Tratamentos anteriores Oxitetraciclina, Rimadyl, Suplemento vitamínico Desparasitação (Moxidectin)</p> |
| <p>Exames complementares Coprologia (flutuação), esfregaço sanguíneo ELISA para pesquisa de anticorpos para a Paratuberculose.</p> |

Anexo 3. Ficha para Caracterização da exploração e medidas de biossegurança relativo ao caso clínico de PT em duas fêmeas bovinas aleitantes em regime extensivo apresentado

| Caracterização da exploração |
|---|
| Área total: 390 ha |
| Divisão do terreno em parcelas? Sim <input checked="" type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Se sim, qual a área por parcela? 20 ha |
| Número total de animais: 200 (+ 12 meses) Machos: 5 Fêmeas: 195 |
| Idade média dos animais da exploração: 10 anos |
| Regime: Extensivo <input checked="" type="checkbox"/> Intensivo <input type="checkbox"/> Semi-extensivo <input type="checkbox"/> |
| Vacinações aplicadas na exploração: Clostridioses <input checked="" type="checkbox"/> BVD <input checked="" type="checkbox"/> IBR <input checked="" type="checkbox"/> Leptospirose <input type="checkbox"/> Complexo respiratório bovino <input type="checkbox"/> Diarreias neonatais <input type="checkbox"/> Outras: |
| Desparasitação: Ectoparasitas <input checked="" type="checkbox"/> Endoparasitas <input checked="" type="checkbox"/> Realizada nos últimos 6 meses? <input checked="" type="checkbox"/> Inclui substância ativa compra <i>Fasciola</i> ? Sim <input type="checkbox"/> Não <input checked="" type="checkbox"/> |
| Existe divisão da vacada em grupos? Sim <input checked="" type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Se sim, qual o critério? Novilhas, Gestantes, Paridas Área por grupo: 20 ha Número de animais por grupo: 70 |
| Origem das fêmeas de substituição: Própria exploração <input checked="" type="checkbox"/> Origem externa/compra <input type="checkbox"/> Se comprado, pede testagem para Paratuberculose ou tem conhecimento do estatuto da doença na exploração de origem? Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> |
| Prática de monta natural: Sim <input checked="" type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Se sim, qual a altura de entrada dos touros? Estão com as vacas o ano inteiro Qual a altura de saída? — Quantos touros? 5 Origem do touro: Própria exploração <input type="checkbox"/> Origem externa/compra <input checked="" type="checkbox"/> Se comprado, pede testagem para Paratuberculose ou tem conhecimento do estatuto da doença na exploração de origem? Sim <input checked="" type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> → testagem |
| Prática de inseminação artificial e/ou transferência de embriões? Sim <input type="checkbox"/> Não <input checked="" type="checkbox"/> |
| Época de partos: Não definida |
| Intervalo entre partos médio: 12 a 14 meses |
| Utilização de colostro externo à exploração para alimentar órfãos ou bezerros cuja mãe não tem leite: Sim <input type="checkbox"/> Não <input checked="" type="checkbox"/> Opção por uso de colostro artificial <input type="checkbox"/> Colostro usado é pasteurizado? Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> O colostro é testado para várias doenças, incluindo Paratuberculose? Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sabe se a exploração de origem do colostro não tem Paratuberculose? Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> |
| Área separada para animais doentes: Sim <input checked="" type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Área pequena com 5ha |
| Partilha da pastagem com outras vacadas: Sim <input type="checkbox"/> Não <input checked="" type="checkbox"/> |
| Maneio alimentar: Sempre em pastagem: Sim <input checked="" type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Fornecimento de alimento à mão: Sim <input checked="" type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Se sim, em que meses? Setembro a fevereiro |

| | |
|---|---|
| Tipo de alimento: Feno <input checked="" type="checkbox"/> Silagem <input type="checkbox"/> Fenosilagem <input type="checkbox"/> Ração <input type="checkbox"/> Tacos <input checked="" type="checkbox"/> | |
| Origem da água de abeberamento: Canalizada <input type="checkbox"/> Barragem <input checked="" type="checkbox"/> Charcas, poças <input checked="" type="checkbox"/> | |
| A água é testada? Sim <input checked="" type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> | |
| Idade dos bezerros ao desmame: 6 a 7 meses | |
| Peso médio dos bezerros ao desmame: 200 kg | |
| Notou quebras de peso médio ao desamem nos últimos anos? Sim <input type="checkbox"/> Não <input checked="" type="checkbox"/> | |
| Número de bezerros desmamados na última desmama: 170 | |
| Medidas de biossegurança verificadas (selecione o que se aplica) | |
| Presença de rodilúvio | |
| Desinfecção de baldes, tetinas e outros utensílios utilizados na alimentação de bezerros | |
| Prevenção do contacto direto entre os animais de explorações vizinhas | |
| Vedações que impeçam a entrada de animais selvagens (coelhos, veados, javalis, ginetas) | |
| Existência de vedações duplas | |
| Registo do movimento de animais, veículos, equipamentos e pessoal | X |
| Zonas de estacionamento longe das áreas onde estão os animais | X |
| Ordem de trabalhos na exploração: primeiro os mais novos e/ou saudáveis e só depois os mais velhos e/ou doente | X |
| Existência de portão que impeça a entrada de veículos e pessoas não autorizadas | |
| Limpeza e desinfecção dos equipamentos partilhados | |
| Limpeza dos currais com remoção de estrume | X |
| Limpeza das mangas | X |
| Indumentária exclusiva para a exploração | |
| Compra de animais apenas de explorações com programas de biossegurança semelhantes | |
| Quarentena de novos animais (30 dias) | X |
| Comedouros e bebedouros separados para os recém-chegados | X |
| Comedouros e bebedouros elevados | X |
| Comedouros e bebedouros limpos com regularidade | X |

Anexo 4. Inquérito destinado aos produtores relativamente à aplicação de um Plano de Controlo, Vigilância e Erradicação para a Paratuberculose

Sabia que o agente da Paratuberculose (*Mycobacterium avium* subespécie paratuberculosis) tem possível relação com a Doença de Crohn (doença inflamatória crónica do intestino) no Homem? Sim Não

Qual a sua opinião da aplicação de um Plano de Vigilância, Controlo e Erradicação para a Paratuberculose, à semelhança dos que existem para a Tuberculose ou Brucelose Bovina? Não tenho interesse A favor

Aplicaria um programa de controlo voluntário na sua exploração? (com testagem de animais, refugo de positivos e descendência, alterações de maneio, entre outros).

Sim

- Qual a sua motivação para aplicar esse programa voluntário?

Aumentar a produtividade

Facilitar a compra/venda de reprodutores

Preservação da Saúde Pública

Preservação da Saúde Animal

Ameaça à Segurança dos Alimentos

Incentivos financeiros

Outro: _____

Não

- Qual a sua motivação para não aplicar esse programa voluntário?

Porque não é obrigatório

Custos das análises

Pouca confiança nas análises

Dificuldade de alteração de maneio

Dificuldade no refugo de animais positivos

Não vejo a Paratuberculose como ameaça à Saúde Pública e/ou Segurança dos Alimentos

Outro: _____

Já teve animais positivos a Paratuberculose na exploração? Sim Não Não sei

Anexo 5. Análise estatística para determinar a associação entre a estação do ano e o resultado (Teste exato de Fisher) e a influência desta no resultado (regressão logística binária)

| Tabulação cruzada Estação do ano * Resultados (casos clínicos suspeitos) | | | | | |
|---|--|--|--|-----------------|--------------|
| | | | Resultados (casos clínicos suspeitos) | | Total |
| | | | Negativo | Positivo | |
| Estação do ano | Inverno | Contagem | 8 | 0 | 8 |
| | | Contagem Esperada | 6,4 | 1,6 | 8,0 |
| | | % em Estação do ano | 100,0% | 0,0% | 100,0% |
| | | % em Resultados (casos clínicos suspeitos) | 29,6% | 0,0% | 23,5% |
| | Outono | Contagem | 14 | 2 | 16 |
| | | Contagem Esperada | 12,7 | 3,3 | 16,0 |
| | | % em Estação do ano | 87,5% | 12,5% | 100,0% |
| | | % em Resultados (casos clínicos suspeitos) | 51,9% | 28,6% | 47,1% |
| | Primavera | Contagem | 2 | 3 | 5 |
| | | Contagem Esperada | 4,0 | 1,0 | 5,0 |
| | | % em Estação do ano | 40,0% | 60,0% | 100,0% |
| | | % em Resultados (casos clínicos suspeitos) | 7,4% | 42,9% | 14,7% |
| | Verão | Contagem | 3 | 2 | 5 |
| | | Contagem Esperada | 4,0 | 1,0 | 5,0 |
| | | % em Estação do ano | 60,0% | 40,0% | 100,0% |
| | | % em Resultados (casos clínicos suspeitos) | 11,1% | 28,6% | 14,7% |
| Total | Contagem | 27 | 7 | 34 | |
| | Contagem Esperada | 27,0 | 7,0 | 34,0 | |
| | % em Estação do ano | 79,4% | 20,6% | 100,0% | |
| | % em Resultados (casos clínicos suspeitos) | 100,0% | 100,0% | 100,0% | |

| Testes qui-quadrado e Teste exato de Fisher | | | | |
|--|--------------------|-----------|--|----------------------------|
| | Valor | df | Significância Assintótica (Bilateral) | Sig exata (2 lados) |
| Qui-quadrado de Pearson | 8,617 ^a | 3 | 0,035 | 0,029 |
| Razão de verossimilhança | 9,058 | 3 | 0,029 | 0,036 |
| Teste exato de Fisher | 7,586 | | | 0,030 |
| Nº de Casos Válidos | 34 | | | |

a. 6 células (75,0%) esperavam uma contagem menor que 5. A contagem mínima esperada é 1,03

| Regressão logística binária: Estações do ano | | | | | | |
|--|---------|-----------|-------|----|-------|--------|
| | B | S.E. | Wald | df | Sig. | Exp(B) |
| Outono (setembro, outubro, novembro) | | | 4,227 | 3 | 0,238 | |
| Inverno (dezembro, janeiro, fevereiro) | -19,257 | 14210,361 | 0 | 1 | 0,999 | 0 |
| Verão (junho, julho, agosto) | 1,540 | 1,185 | 1,689 | 1 | 0,194 | 4,667 |
| Primavera (março, abril, maio) | 2,351 | 1,185 | 3,936 | 1 | 0,047 | 10,500 |
| Constante | -1,946 | 0,756 | 6,626 | 1 | 0,010 | 0,143 |

Categoria de referência: Outono

Anexo 6. Análise estatística para determinar a associação entre o tipo de ano (seca ou normal/chuvas fracas) e o resultado (teste Qui-Quadrado) e a influência do tipo de ano no resultado (regressão logística binária) nos distritos de Beja e Évora

| Tabulação cruzada Tipo de ano (ÉVORA) * Resultado | | | | | |
|---|-------------------|-------------------|-----------|----------|--------|
| | | | Resultado | | Total |
| | | | Negativo | Positivo | |
| Tipo de ano (ÉVORA) | Normal/ Chuva | Contagem | 132 | 23 | 155 |
| | | Contagem Esperada | 139,1 | 15,9 | 155,0 |
| | | % em Tipo de ano | 85,2% | 14,8% | 100,0% |
| | | % em Resultado | 28,0% | 42,6% | 29,5% |
| | Seca | Contagem | 340 | 31 | 371 |
| | | Contagem Esperada | 332,9 | 38,1 | 371,0 |
| | | % em Tipo de ano | 91,6% | 8,4% | 100,0% |
| | | % em Resultado | 72,0% | 57,4% | 70,5% |
| Total | Contagem | 472 | 54 | 526 | |
| | Contagem Esperada | 472,0 | 54,0 | 526,0 | |
| | % em Tipo de ano | 89,7% | 10,3% | 100,0% | |
| | % em Resultado | 100,0% | 100,0% | 100,0% | |

| Testes qui-quadrado e Teste exato de Fisher - Évora | | | | | |
|---|--------------------|----|---------------------------------------|---------------------|--------------------|
| | Valor | df | Significância Assintótica (Bilateral) | Sig exata (2 lados) | Sig exata (1 lado) |
| Qui-quadrado de Pearson | 4,988 ^a | 1 | 0,026 | | |
| Correção de continuidade ^b | 4,309 | 1 | 0,038 | | |
| Razão de verossimilhança | 4,697 | 1 | 0,030 | | |
| Teste Exato de Fisher | | | | 0,039 | 0,021 |
| N de Casos Válidos | 526 | | | | |

a. 0 células (0,0%) esperavam uma contagem menor que 5. A contagem mínima esperada é 16,67.

b. Computado apenas para uma tabela 2x2

| Regressão logística binária: Tipo de ano - Évora | | | | | | |
|--|--------|-------|--------|----|--------|--------|
| | B | S.E. | Wald | df | Sig. | Exp(B) |
| Seca | -0,648 | 0,294 | 4,863 | 1 | 0,027 | 0,523 |
| Constante | -1,747 | 0,226 | 59,801 | 1 | <0,001 | 0,174 |

Categoria de referência: Anos normais/chuvas fracas

| Tabulação cruzada Tipo de ano (BEJA) * Resultado | | | | | |
|--|-------------------|-------------------|----------|--------|--------|
| | | Resultado | | Total | |
| | | Negativo | Positivo | | |
| Tipo de ano (BEJA) | Normal/ Chuva | Contagem | 130 | 24 | 154 |
| | | Contagem Esperada | 137,3 | 16,7 | 154,0 |
| | | % em Tipo de ano | 84,4% | 15,6% | 100,0% |
| | | % em Resultado | 34,3% | 52,2% | 36,2% |
| | Seca | Contagem | 249 | 22 | 271 |
| | | Contagem Esperada | 241,7 | 29,3 | 271,0 |
| | | % em Tipo de ano | 91,9% | 8,1% | 100,0% |
| | | % em Resultado | 65,7% | 47,8% | 63,8% |
| Total | Contagem | 379 | 46 | 425 | |
| | Contagem Esperada | 379,0 | 46,0 | 425,0 | |
| | % em Tipo de ano | 89,2% | 10,8% | 100,0% | |
| | % em Resultado | 100,0% | 100,0% | 100,0% | |

| Testes qui-quadrado e Teste exato de Fisher - BEJA | | | | | |
|--|--------------------|----|---------------------------------------|---------------------|--------------------|
| | Valor | df | Significância Assintótica (Bilateral) | Sig exata (2 lados) | Sig exata (1 lado) |
| Qui-quadrado de Pearson | 5,671 ^a | 1 | 0,017 | | |
| Correção de continuidade ^b | 4,924 | 1 | 0,026 | | |
| Razão de verossimilhança | 5,461 | 1 | 0,019 | | |
| Teste Exato de Fisher | | | | 0,022 | 0,014 |
| N de Casos Válidos | 425 | | | | |

a. 0 células (0,0%) esperavam uma contagem menor que 5. A contagem mínima esperada é 16,67.

b. Computado apenas para uma tabela 2x2

| Regressão logística binária: Tipo de ano - BEJA | | | | | | |
|---|--------|-------|--------|----|--------|--------|
| | B | S.E. | Wald | df | Sig. | Exp(B) |
| Seca | -0,737 | 0,314 | 5,495 | 1 | 0,019 | 0,479 |
| Constante | -1,689 | 0,222 | 57,828 | 1 | <0,001 | 0,185 |

Categoria de referência: Anos normais ou de chuvas fracas

Anexo 7. Animais testados com idades determinadas (n=112) e respetiva estatística descritiva

| Exploração | Código animal | Resultado | Data | Idade (anos) |
|-------------------|----------------------|------------------|-------------|---------------------|
| 10 | Animal 01 | Neg | 22/07/2011 | 0,33 |
| 18 | Animal 02 | Neg | 16/01/2014 | 3 |
| 17 | Animal 03 | Neg | 08/08/2014 | 13 |
| 1 | Animal 04 | Pos | 08/10/2014 | 3 |
| 20 | Animal 05 | Pos | 17/10/2014 | 7 |
| 1 | Animal 06 | Pos | 23/07/2015 | 3 |
| 1 | Animal 07 | Pos | 31/07/2015 | 13 |
| 1 | Animal 08 | Pos | 27/08/2015 | 2 |
| 1 | Animal 09 | Pos | 12/08/2016 | 4 |
| 24 | Animal 10 | Pos | 27/07/2018 | 4 |
| 42 | Animal 11 | Pos | 04/01/2019 | 10 |
| 42 | Animal 12 | Neg | 25/03/2019 | 16 |
| 46 | Animal 13 | Pos | 17/04/2019 | 3 |
| 8 | Animal 14 | Neg | 31/10/2019 | 14 |
| 50 | Animal 15 | Neg | 08/11/2019 | 13 |
| 14 | Animal 16 | Neg | 12/11/2019 | 6 |
| 52 | Animal 17 | Pos | 29/11/2019 | 9 |
| 52 | Animal 18 | Neg | 13/12/2019 | 5 |
| 53 | Animal 19 | Neg | 17/12/2019 | 1,5 |
| 7 | Animal 20 | Neg | 15/01/2020 | 0,75 |
| 7 | Animal 21 | Neg | 15/01/2020 | 0,75 |
| 7 | Animal 22 | Neg | 20/01/2020 | 1 |
| 7 | Animal 23 | Neg | 20/01/2020 | 1 |
| 7 | Animal 24 | Neg | 20/01/2020 | 1 |
| 7 | Animal 25 | Neg | 20/01/2020 | 1 |
| 7 | Animal 26 | Neg | 20/01/2020 | 2 |
| 7 | Animal 27 | Neg | 20/01/2020 | 2 |
| 7 | Animal 28 | Neg | 20/01/2020 | 2 |
| 9 | Animal 29 | Neg | 21/01/2020 | 13 |
| 52 | Animal 30 | Neg | 28/01/2020 | 1 |
| 55 | Animal 31 | Pos | 28/01/2020 | 5 |
| 20 | Animal 32 | Neg | 07/05/2020 | 6 |
| 57 | Animal 33 | Neg | 10/07/2020 | 2 |
| 57 | Animal 34 | Neg | 10/07/2020 | 2 |
| 57 | Animal 35 | Neg | 04/08/2020 | 2 |
| 57 | Animal 36 | Neg | 04/08/2020 | 2 |
| 54 | Animal 37 | Pos | 12/08/2020 | 5 |
| 7 | Animal 38 | Neg | 10/09/2020 | 2 |
| 24 | Animal 39 | Neg | 10/09/2020 | 3 |
| 42 | Animal 40 | Neg | 23/09/2020 | 2 |
| 42 | Animal 41 | Neg | 23/09/2020 | 4 |
| 59 | Animal 42 | Neg | 24/09/2020 | 3 |
| 59 | Animal 43 | Neg | 24/09/2020 | 3 |
| 59 | Animal 44 | Neg | 24/09/2020 | 3 |
| 59 | Animal 45 | Neg | 24/09/2020 | 3 |
| 59 | Animal 46 | Neg | 24/09/2020 | 3 |

| | | | | |
|----|-----------|-----|------------|----|
| 59 | Animal 47 | Neg | 24/09/2020 | 3 |
| 60 | Animal 48 | Neg | 30/09/2020 | 9 |
| 59 | Animal 49 | Neg | 02/10/2020 | 2 |
| 59 | Animal 50 | Neg | 02/10/2020 | 2 |
| 59 | Animal 51 | Neg | 02/10/2020 | 2 |
| 59 | Animal 52 | Neg | 02/10/2020 | 2 |
| 59 | Animal 53 | Neg | 02/10/2020 | 2 |
| 59 | Animal 54 | Neg | 02/10/2020 | 2 |
| 59 | Animal 55 | Neg | 02/10/2020 | 2 |
| 59 | Animal 56 | Neg | 02/10/2020 | 2 |
| 59 | Animal 57 | Neg | 02/10/2020 | 2 |
| 59 | Animal 58 | Neg | 02/10/2020 | 2 |
| 59 | Animal 59 | Neg | 02/10/2020 | 2 |
| 7 | Animal 60 | Neg | 15/10/2020 | 2 |
| 1 | Animal 61 | Duv | 15/10/2020 | 3 |
| 9 | Animal 62 | Pos | 15/10/2020 | 6 |
| 56 | Animal 63 | Neg | 27/10/2020 | 4 |
| 61 | Animal 64 | Neg | 28/10/2020 | 1 |
| 62 | Animal 65 | Neg | 30/10/2020 | 12 |
| 54 | Animal 66 | Neg | 05/11/2020 | 1 |
| 54 | Animal 67 | Neg | 05/11/2020 | 1 |
| 54 | Animal 68 | Neg | 05/11/2020 | 1 |
| 54 | Animal 69 | Neg | 05/11/2020 | 1 |
| 54 | Animal 70 | Neg | 05/11/2020 | 2 |
| 54 | Animal 71 | Neg | 05/11/2020 | 3 |
| 54 | Animal 72 | Neg | 05/11/2020 | 4 |
| 9 | Animal 73 | Neg | 13/11/2020 | 4 |
| 9 | Animal 74 | Neg | 13/11/2020 | 5 |
| 9 | Animal 75 | Neg | 13/11/2020 | 5 |
| 9 | Animal 76 | Neg | 26/11/2020 | 12 |
| 56 | Animal 77 | Neg | 30/12/2020 | 6 |
| 32 | Animal 78 | Neg | 08/01/2021 | 1 |
| 43 | Animal 79 | Neg | 25/01/2021 | 1 |
| 7 | Animal 80 | Neg | 25/01/2021 | 1 |
| 7 | Animal 81 | Neg | 25/01/2021 | 1 |
| 42 | Animal 82 | Neg | 04/03/2021 | 3 |
| 42 | Animal 83 | Neg | 04/03/2021 | 3 |
| 63 | Animal 84 | Pos | 11/03/2021 | 6 |
| 63 | Animal 85 | Pos | 11/03/2021 | 6 |
| 59 | Animal 86 | Neg | 01/06/2021 | 3 |
| 43 | Animal 87 | Neg | 04/10/2021 | 2 |
| 64 | Animal 88 | Neg | 15/10/2021 | 2 |
| 65 | Animal 89 | Neg | 12/11/2021 | 12 |
| 66 | Animal 90 | Neg | 18/01/2022 | 4 |
| 67 | Animal 91 | Neg | 16/02/2022 | 12 |
| 46 | Animal 92 | Neg | 05/04/2022 | 3 |
| 46 | Animal 93 | Neg | 05/04/2022 | 3 |
| 68 | Animal 94 | Pos | 20/04/2022 | 8 |

| | | | | |
|----|------------|-----|------------|----|
| 68 | Animal 95 | Neg | 20/04/2022 | 8 |
| 24 | Animal 96 | Neg | 04/08/2022 | 2 |
| 24 | Animal 97 | Neg | 04/08/2022 | 2 |
| 9 | Animal 98 | Neg | 18/08/2022 | 10 |
| 7 | Animal 99 | Neg | 05/09/2022 | 1 |
| 56 | Animal 100 | Neg | 26/09/2022 | 1 |
| 56 | Animal 101 | Neg | 26/09/2022 | 1 |
| 7 | Animal 102 | Neg | 26/09/2022 | 1 |
| 7 | Animal 103 | Neg | 26/09/2022 | 1 |
| 7 | Animal 104 | Neg | 26/09/2022 | 1 |
| 7 | Animal 105 | Neg | 26/09/2022 | 1 |
| 7 | Animal 106 | Neg | 26/09/2022 | 2 |
| 7 | Animal 107 | Neg | 26/09/2022 | 2 |
| 7 | Animal 108 | Neg | 26/09/2022 | 2 |
| 6 | Animal 109 | Neg | 18/10/2022 | 15 |
| 6 | Animal 110 | Neg | 18/10/2022 | 15 |
| 70 | Animal 111 | Pos | 14/09/2022 | 6 |
| 70 | Animal 112 | Pos | 30/09/2022 | 6 |

| | | Contagem: Idade (anos) | | | | | | | | | | | | | | | | Total | | |
|-----------|----------|------------------------|------|----|-----|----|----|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|-------|----|-----|
| | | 0,33 | 0,75 | 1 | 1,5 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 12 | 13 | 14 | | 15 | 16 |
| Resultado | Negativo | 1 | 2 | 21 | 1 | 29 | 14 | 5 | 3 | 3 | 0 | 1 | 1 | 1 | 4 | 3 | 1 | 2 | 1 | 93 |
| | Positivo | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 3 | 2 | 2 | 5 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 18 |
| | Duvidoso | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Total | | 1 | 2 | 21 | 1 | 30 | 18 | 7 | 5 | 8 | 1 | 2 | 2 | 2 | 4 | 4 | 1 | 2 | 1 | 112 |

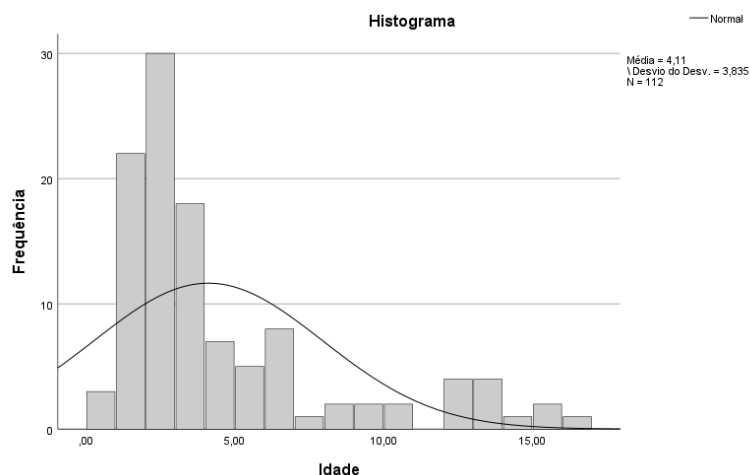
Legenda: Pos=Positivo; Neg=Negativo; Duv=Duvidoso

Nota: todos os animais foram testados através de ELISA indireto para detecção de anticorpos anti-MAP no soro sanguíneo exceto Animal 20 e Animal 21 (PCR fecal).

| Estatística descritiva: Idade dos animais testados | | | | | | |
|--|----------------|--------------------------|--|------------------|----------------------------|--------------------------------|
| | Idades (geral) | Idades positivos (geral) | Idades não positivos; inclui duvidosos (geral) | Idades suspeitos | Idades suspeitos positivos | Idades suspeitos não positivos |
| N | 112 | 18 | 96 | 27 | 6 | 21 |
| Média | 4,11 | 5,89 | 3,77 | 5,56 | 5,33 | 5,62 |
| Moda | 2 | 6 | 2 | 2 | 6 | 2 |
| Mediana | 3 | 6 | 2 | 4 | 6 | 4 |
| Desvio padrão | 3,83 | 2,78 | 3,92 | 4 | 1,21 | 4,52 |
| Mínimo | 0,33 | 2 | 0,33 | 1 | 3 | 1 |
| Máximo | 16 | 13 | 16 | 14 | 6 | 14 |
| Percentis | 25 | 2 | 3,75 | 1 | 2 | 2 |
| | 50 | 3 | 6 | 2 | 4 | 4 |
| | 75 | 5 | 7,25 | 4 | 6 | 11 |

Anexo 8. Análise estatística: Idade dos animais testados (n=112)

Teste de normalidade (histograma e Teste de Shapiro-Wilk) para as idades dos animais testados:



| Teste de Normalidade | | | |
|----------------------------|--------------|-----|-------|
| | Shapiro-Wilk | | |
| | Estatística | gl | Sig. |
| Idade dos animais testados | ,765 | 112 | <,001 |

A distribuição das idades dos animais testados suspeitos não segue uma distribuição normal ($p < 0,001$). Recorreu-se a testes não paramétricos (Mann-Whitney) para verificar a existência de diferença entre as idades dos animais positivos e não positivos.

Teste não-paramétrico (Mann-Whitney) para comparar as idades dos animais testados positivos e não positivos:

| Teste não paramétrico: Teste Mann-Whitney – Idade (anos) | | | |
|--|-----|-------------|------------------------|
| Resultado | N | Posto médio | Soma de Classificações |
| Não positivo | 94 | 51,42 | 4833,50 |
| Positivo | 18 | 83,03 | 1494,50 |
| Total | 112 | | |

| | Idade (anos) |
|-------------------------------------|--------------|
| U de Mann-Whitney | 368,500 |
| Wilcoxon W | 4833,500 |
| Z | -3,842 |
| Significância Sig. (2 extremidades) | <,001 |

Regressão logística binária para determinar a influência da idade e faixa etária no resultado de testagem:

| Regressão logística binária: Idade (anos) | | | | | | |
|--|----------|-------------|-------------|-----------|-------------|---------------|
| | B | S.E. | Wald | df | Sig. | Exp(B) |
| Idade | 0,121 | 0,058 | 4,234 | 1 | 0,038 | 1,129 |
| Constante | -2,225 | 0,407 | 29,547 | 1 | <0,001 | 0,108 |

| Regressão logística binária: Faixa etária | | | | | | |
|--|----------|-------------|-------------|-----------|-------------|---------------|
| | B | S.E. | Wald | df | Sig. | Exp(B) |
| ≤2 anos | | | 11,301 | 3 | 0,010 | |
|]2;3] anos | 2,380 | 1,191 | 3,992 | 1 | 0,046 | 10,800 |
|]3;5] anos | 3,296 | 1,180 | 7,795 | 1 | 0,005 | 27 |
| >5 anos | 3,458 | 1,085 | 10,159 | 1 | 0,001 | 31,765 |
| Constante | -3,989 | 1,009 | 15,623 | 1 | <0,001 | 0,019 |

Categoria de referência: idade ≤2 anos

Anexo 9. Quadro clínico dos animais testados e respetivas idades, quando possíveis de determinar (n=34)

| Exploração | Data | Nº animais | Positivo | Negativo | Duvidoso | Idade (anos) | Quadro clínico |
|------------|------------|------------|----------|----------|----------|--------------|------------------------|
| 13 | 19/07/2013 | 1 | 1 | 0 | 0 | | DC, C, SRT |
| 18 | 16/01/2014 | 1 | 0 | 1 | 0 | 3 | DC, C |
| 17 | 08/08/2014 | 1 | 0 | 1 | 0 | 13 | DC, C |
| 38 | 24/08/2018 | 1 | 0 | 1 | 0 | | DC, M |
| 44 | 28/02/2019 | 1 | 0 | 1 | 0 | | DC, C |
| 44 | 28/02/2019 | 1 | 0 | 1 | 0 | | DC, C |
| 44 | 28/02/2019 | 1 | 0 | 1 | 0 | | DC, C |
| 44 | 28/02/2019 | 1 | 0 | 1 | 0 | | DC, C |
| 46 | 17/04/2019 | 1 | 1 | 0 | 0 | 3 | DC |
| 8 | 31/10/2019 | 1 | 0 | 1 | 0 | 14 | DC, SRT |
| 9 | 21/01/2020 | 1 | 0 | 1 | 0 | 13 | DC |
| 54 | 12/08/2020 | 1 | 1 | 0 | 0 | 5 | C |
| 59 | 02/10/2020 | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 | C |
| 59 | 02/10/2020 | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 | C |
| 59 | 02/10/2020 | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 | C |
| 59 | 02/10/2020 | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 | C |
| 59 | 02/10/2020 | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 | C |
| 59 | 02/10/2020 | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 | C |
| 56 | 27/10/2020 | 1 | 0 | 1 | 0 | 4 | C |
| 61 | 28/10/2020 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | C, F |
| 9 | 13/11/2020 | 1 | 0 | 1 | 0 | 4 | DC |
| 9 | 13/11/2020 | 1 | 0 | 1 | 0 | 5 | DC, ECTOP |
| 9 | 13/11/2020 | 1 | 0 | 1 | 0 | 5 | DC, ECTOP, MET |
| 9 | 26/11/2020 | 1 | 0 | 1 | 0 | 12 | DC, C, VC |
| 63 | 11/03/2021 | 1 | 1 | 0 | 0 | 6 | DC, C, F |
| 63 | 11/03/2021 | 1 | 1 | 0 | 0 | 6 | DC, C, F |
| 65 | 12/11/2021 | 1 | 0 | 1 | 0 | 12 | DC, A |
| 66 | 18/01/2022 | 1 | 0 | 1 | 0 | 4 | C, DC, AMI |
| 46 | 05/04/2022 | 1 | 0 | 1 | 0 | 3 | DC |
| 46 | 05/04/2022 | 1 | 0 | 1 | 0 | 3 | DC |
| 9 | 18/08/2022 | 1 | 0 | 1 | 0 | 10 | DC, ESM |
| 70 | 14/09/2022 | 1 | 1 | 0 | 0 | 6 | DC, SRT, C, ESM, MP, H |
| 70 | 30/09/2022 | 1 | 1 | 0 | 0 | 6 | DC, SRT, C, ESM, MP, H |

Legenda:

DC=diarreia crónica; C=caquexia; SRT=sem reposta ao tratamento; M=melena; F=febril; Ectop=ectoparasitas; Met=metrite; VC=vaca caída; A=anorexia; ESM=edema submandibular; H=hálito cetónico; MP=mucosas pálidas; AMI=aumento motilidade intestinal; PB=pelo baço/mau estado.

Animais suspeitos: 34 (seropositivos 7; seronegativo 27)

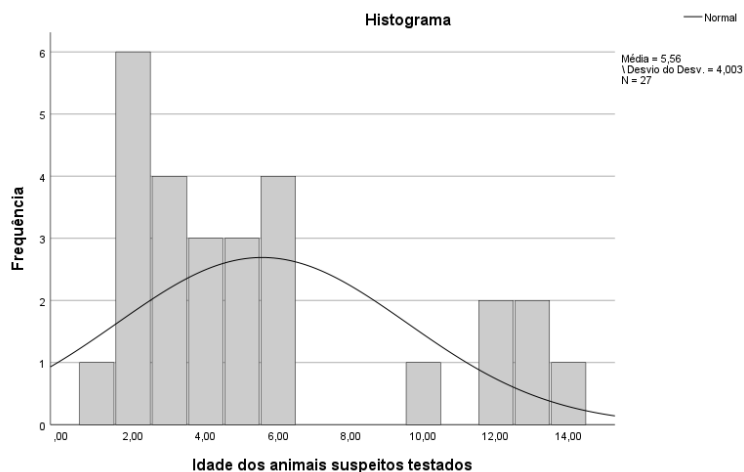
Animais com quadro clínico e idade descrita: 27 (seropositivos 6; seronegativos 21)

Anexo 10. Teste Qui-quadrado e Teste exato de Fisher para sinais clínicos/observações e resultado

| Sinal clínico/Observações | Teste Qui-quadrado | Teste exato de Fisher | Nota |
|----------------------------------|---------------------------|------------------------------|--|
| Diarreia crónica | 0,412 | 0,644 | 1 célula (25%) esperava uma contagem menor que 5 |
| Caquexia | 0,252 | 0,384 | 2 células (50%) esperavam uma contagem menor que 5 |
| Não responsivo ao tratamento | 0,004 | 0,021 | 2 células (50%) esperavam uma contagem menor que 5 |
| Melena | 0,605 | 1 | 2 células (50%) esperavam uma contagem menor que 5 |
| Febril | 0,039 | 0,101 | 2 células (50%) esperavam uma contagem menor que 5 |
| Ectoparasitas | 0,458 | 1 | 2 células (50%) esperavam uma contagem menor que 5 |
| Metrite | 0,605 | 1 | 2 células (50%) esperavam uma contagem menor que 5 |
| Vaca caída | 0,605 | 1 | 2 células (50%) esperavam uma contagem menor que 5 |
| Anorexia | 0,605 | 1 | 2 células (50%) esperavam uma contagem menor que 5 |
| Edema submandibular | 0,039 | 0,101 | 2 células (50%) esperavam uma contagem menor que 5 |
| Hálito cetónico | 0,004 | 0,037 | 2 células (50%) esperavam uma contagem menor que 5 |
| Mucosas pálidas | 0,004 | 0,037 | 2 células (50%) esperavam uma contagem menor que 5 |
| Aumento da motilidade intestinal | 0,605 | 1 | 2 células (50%) esperavam uma contagem menor que 5 |
| Pelo em mau estado | 0,004 | 0,037 | 2 células (50%) esperavam uma contagem menor que 5 |

Anexo 11. Teste de normalidade (histograma) e Teste não-paramétrico (Mann-Whitney) para as idades dos animais testados suspeitos (n=27)

Teste de normalidade (histograma e Teste de Shapiro-Wilk) para as idades dos animais suspeitos testados:



| Teste de Normalidade | | | |
|--------------------------------------|--------------|----|-------|
| | Shapiro-Wilk | | |
| | Estatística | gl | Sig. |
| Idade dos animais suspeitos testados | ,830 | 27 | <,001 |

A distribuição das idades dos animais testados suspeitos não segue uma distribuição normal ($p < 0,001$). Recorreu-se a testes não paramétricos (Mann-Whitney) para verificar as diferenças entre as distribuições entre os animais suspeitos positivos e não positivos.

Teste não-paramétrico (Mann-Whitney) para comparar as idades dos animais suspeitos positivos e não positivos:

| Teste não paramétrico: Teste Mann-Whitney | | | |
|---|----|-------------|------------------------|
| Idade dos animais suspeitos (anos) | | | |
| Resultado | N | Posto médio | Soma de Classificações |
| Negativo | 21 | 13,07 | 274,50 |
| Positivo | 6 | 17,27 | 103,50 |
| Total | 27 | | |

| | Idade dos animais suspeitos (anos) |
|-------------------------------------|------------------------------------|
| U de Mann-Whitney | 43,500 |
| Wilcoxon W | 274,500 |
| Z | -1,149 |
| Significância Sig. (2 extremidades) | 0,251 |

Anexo 12. Ficha para caracterização da exploração no âmbito do plano de controlo de PT. Adaptado do *Manuale per il controllo della Paratuberculosis negli allevamenti di bovini da carne (linea vacca-vitello)* publicado pelo Centro de Referência Italiano para a Paratuberculose.

| Caracterização da exploração | | |
|--|---|------------------------------------|
| Produtor: | Exploração: | Marca de exploração: |
| Regime de produção: Intensivo <input type="checkbox"/> Extensivo <input type="checkbox"/> Semi-extensivo <input type="checkbox"/> | | |
| Área total da exploração: | | |
| Divisão da área em parcelas? Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> | | |
| Número de animais com mais de 2 anos: | | |
| Vacas: | Novilhas: | Touros: Novilhos: |
| Número de animais com menos de 2 anos (incluindo bezerros): | | |
| Idade média dos animais da exploração: | | |
| Idade média de refugo dos animais: | | |
| Mortalidade dos animais adultos nos últimos 12 meses: | | |
| Divisão do gado em grupos? Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> | | |
| Se sim, qual o critério de divisão? | | |
| Área de terreno para cada grupo? | | Número médio de animais por grupo: |
| Outros animais presentes na exploração? Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Se sim quais? | | |
| Existe separação física entre estes animais e a vacada principal? Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> | | |
| Maneio reprodutivo e do neonato | | |
| Monta natural <input type="checkbox"/> | Inseminação artificial <input type="checkbox"/> | |
| Se usa monta natural, qual a altura de entrada dos touros? | | |
| Qual a altura de saída dos touros? | | |
| Origem dos machos reprodutores: Própria exploração <input type="checkbox"/> Origem externa/compra <input type="checkbox"/> | | |
| Se comprados, pede testagem para Paratuberculose ou tem conhecimento do estatuto da doença na exploração de origem? Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> | | |
| Origem das fêmeas de reposição: Própria exploração <input type="checkbox"/> Origem externa/compra <input type="checkbox"/> | | |
| Se compradas, pede testagem para Paratuberculose ou tem conhecimento do estatuto da doença na exploração de origem? Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> | | |
| Época de partos: | | |
| Tem como prática o uso de colostro externo à exploração para alimentar bezerros órfãos ou que a mãe não tenha colostro? Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> | | |
| Se usa colostro externo, este foi testado para Paratuberculose ou tem conhecimento do estatuto da doença da exploração de origem? Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> | | |
| O colostro é pasteurizado? Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> | | |
| Maneio alimentar | | |
| Os animais estão em pastagem todo o ano? Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> | | |
| Existem charcas de água acessíveis aos animais na pastagem? Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> | | |
| Existe fornecimento de alimento à mão? Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> | | |
| Se existe, qual a altura do ano? | | |
| Tipo de alimento: Feno <input type="checkbox"/> Silagem <input type="checkbox"/> Fenosilagem <input type="checkbox"/> Farinha <input type="checkbox"/> Tacos <input type="checkbox"/> Outro: | | |
| Distribuição de alimento simultaneamente para animais jovens e adultos: Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> | | |
| Utilização das sobras de adultos para alimentar bezerros: Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> | | |
| Armazenamento do alimento protegido da conspurcação por lamas e material fecal: Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> | | |
| Origem da água de abeberamento: Barragem <input type="checkbox"/> Lago/Charca <input type="checkbox"/> Água canalizada <input type="checkbox"/> | | |
| A água utilizada para abeberamento dos animais é testada com regularidade? Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> | | |
| Profilaxia da exploração | | |
| Vacinações aplicadas na exploração: | | |
| Clostridioses <input type="checkbox"/> BVD <input type="checkbox"/> IBR <input type="checkbox"/> Leptospirose <input type="checkbox"/> Doença respiratória bovina <input type="checkbox"/> | | |
| Diarreias neonatais <input type="checkbox"/> Outra: | | |
| Desparasitação: Anual <input type="checkbox"/> Semestral <input type="checkbox"/> | | |
| Contra ectoparasitas (por exemplo, carraças) <input type="checkbox"/> Contra endoparasitas (ténias, lombrigas) <input type="checkbox"/> | | |
| Inclui <i>Fasciola</i> <input type="checkbox"/> | | |
| Outros planos de controlo/erradicação voluntários aplicados na exploração: | | |

Anexo 13. Ficha de recolha de dados sobre a produtividade da exploração nos últimos 5 anos, história progressa de PT e animais introduzidos no âmbito do plano de controlo de PT. Adaptado do *Manuale per il controllo della Paratuberculosis negli allevamenti di bovini da carne (linea vacca-vitello)* publicado pelo Centro de Referência Italiano para a Paratuberculose.

| Perdas de produtividade nos últimos 5 anos | | | |
|--|------------|------------------|----------------------------|
| Atrasos de retorno à ciclicidade <input type="checkbox"/> | | | |
| Bezerros pequenos/mais leves à nascença <input type="checkbox"/> | | | |
| Menor peso médio dos bezerros ao desmame <input type="checkbox"/> | | | |
| Peso médio há 5 anos: _____ | | | |
| Peso médio na última pesagem: _____ | | | |
| Maior incidência de outras patologias (mamites, laminites) <input type="checkbox"/> | | | |
| Refugo de animais em má condição corporal <input type="checkbox"/> | | | |
| Mortes na exploração <input type="checkbox"/> | | | |
| História progressa de Paratuberculose na exploração | | | |
| Já teve animais com quadro clínico compatível com Paratuberculose na exploração? Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> | | | |
| Se sim, quantos animais? | | | |
| Destino dos animais: Refugo <input type="checkbox"/> Faleceram <input type="checkbox"/> Permanecem na exploração <input type="checkbox"/> | | | |
| Idade do animal mais jovem que já teve quadro clínico compatível: _____ | | | |
| Já houve casos de Paratuberculose confirmada na exploração? Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> | | | |
| Ano do primeiro diagnóstico de Paratuberculose na exploração? _____ | | | |
| Idade do primeiro caso de Paratuberculose: _____ | | | |
| Idade e proveniência dos animais positivos: _____ | | | |
| Caracterização de casos clínicos anteriores | | | |
| Data do início dos sinais clínicos | Idade | Origem do animal | Descendência na exploração |
| | | | |
| Número de animais refugados devido a quadro clínico compatível: _____ | | | |
| Número de animais refugados por ELISA positivo: _____ | | | |
| Número de animais refugados por PCR/cultura fecal positiva: _____ | | | |
| Animais introduzidos | | | |
| Introdução de animais nos últimos 2 a 5 anos? Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> | | | |
| Animal | Quantidade | Origem | |
| Vacas <input type="checkbox"/> | | | |
| Novilhas <input type="checkbox"/> | | | |
| Touro <input type="checkbox"/> | | | |
| Outro | | | |

Anexo 14. Avaliação de risco para a fase de Parto no âmbito do plano de controlo de PT.
Adaptado do *Manuale per il controllo della Paratuberculosis negli allevamenti di bovini da carne (linea vacca-vitello)* publicado pelo Centro de Referência Italiano para a Paratuberculose.

| Parto | | | | | | | | | | | |
|---|---|----------------|----------|----|----|-------------|----|----|---------|----|----------------|
| A suscetibilidade à infeção é maior nos neonatos, logo a fase do Parto recebe uma pontuação superior às restantes. O bezerro infeta-se pela ingestão do agente causal que está presente nas fezes de adultos infetados, no leite e no colostro da progenitora infetada. | | | | | | | | | | | |
| Fator de risco | Critério de pontuação | Risco | Pontos | | | | | | | | |
| Utilização da área de partos para vários animais ao mesmo tempo | Áreas individuais | Baixo | 0-1 | | | | | | | | |
| | Coletivas com baixa densidade animal (curral ou pastagem) | Moderado | 4-6 | | | | | | | | |
| | Coletivas com elevada densidade animal | Alto | 8-10 | | | | | | | | |
| Higiene do local | Limpo e seco | Baixo | 0-1 | | | | | | | | |
| | Pouca acumulação de estrume | Moderado | 4-6 | | | | | | | | |
| | Muita acumulação de estrume | Alto | 8-10 | | | | | | | | |
| Higiene dos úberes e membros | Tosquiados, limpos e secos | Baixo | 0-1 | | | | | | | | |
| | Moderadamente sujo | Moderado | 4-6 | | | | | | | | |
| | Muito sujo | Alto | 8-10 | | | | | | | | |
| Presença de animais com Paratuberculose clínica, suspeitos ou teste positivo | Não | Baixo | 0-1 | | | | | | | | |
| | Apenas animais de baixo risco | Moderado | 4-6 | | | | | | | | |
| | Animais de alto e baixo risco | Alto | 8-10 | | | | | | | | |
| *Use pontuações intermédias para situações não contempladas | | | | | | | | | | | |
| Parto | 0. | 1. Muito baixo | 2. Baixo | 3. | 4. | 5. Moderado | 6. | 7. | 8. Alto | 9. | 10. Muito alto |
| Utilização da área de partos para vários animais ao mesmo tempo | | | | | | | | | | | |
| Higiene do local | | | | | | | | | | | |
| Higiene dos úberes e membros | | | | | | | | | | | |
| Presença de animais com Paratuberculose clínica, suspeitos ou teste positivo | | | | | | | | | | | |
| Máximo de pontos: 40 | Pontuação total: | | | | | | | | | | |

Anexo 15. Avaliação de risco para a fase de Criação do bezerro no âmbito do plano de controlo de PT. Adaptado do *Manuale per il controllo della Paratuberculosis negli allevamenti di bovini da carne (linea vacca-vitello)* publicado pelo Centro de Referência Italiano para a Paratuberculose.

| Criação de bezerros | | | | | | | | | | | |
|---|---|----------------|----------|----|----|-------------|----|----|---------|----|----------------|
| Os animais com menos de 6 meses são suscetíveis à infeção sendo a pontuação atribuída a esta fase ainda elevada. O bezerro infeta-se pela ingestão do agente causal que está presente nas fezes de adultos infetados, no leite e no colostro da progenitora infetada. | | | | | | | | | | | |
| Fator de risco | Critério de pontuação | Risco | Pontos | | | | | | | | |
| Bezerro e progenitora em espaço partilhado com outros bovinos possivelmente infetados | Não, apenas com animais repetidamente negativos | Baixo | 0-1 | | | | | | | | |
| | Sim, apenas com animais negativos a somente um teste e de baixo risco | Moderado | 4-6 | | | | | | | | |
| | Sim, com animais de estatuto desconhecido | Alto | 8-10 | | | | | | | | |
| Higiene do local | Limpo e seco | Baixo | 0-1 | | | | | | | | |
| | Pouca acumulação de estrume | Moderado | 4-6 | | | | | | | | |
| | Muita acumulação de estrume | Alto | 8-10 | | | | | | | | |
| Contaminação da água de abeberamento com fezes de adultos | Raramente | Baixo | 0-1 | | | | | | | | |
| | Ocasionalmente, em algumas fontes | Moderado | 4-6 | | | | | | | | |
| | Frequentemente e em várias fontes | Alto | 8-10 | | | | | | | | |
| Contaminação dos alimentos com fezes de adulto | Raramente | Baixo | 0-1 | | | | | | | | |
| | Ocasionalmente, em algumas fontes | Moderado | 4-6 | | | | | | | | |
| | Frequentemente e em várias fontes | Alto | 8-10 | | | | | | | | |
| Contacto com o curral de animais adultos doentes | Não | Baixo | 0-1 | | | | | | | | |
| | O curral é ao lado da zona de partos | Moderado | 4-6 | | | | | | | | |
| | O curral é a zona de partos | Alto | 8-10 | | | | | | | | |
| *Use pontuações intermédias para situações não contempladas | | | | | | | | | | | |
| Criação de bezerros | 0. | 1. Muito baixo | 2. Baixo | 3. | 4. | 5. Moderado | 6. | 7. | 8. Alto | 9. | 10. Muito alto |
| Bezerro e progenitora em espaço partilhado com outros bovinos possivelmente infetados | | | | | | | | | | | |
| Higiene do local | | | | | | | | | | | |
| Contaminação da água de abeberamento com fezes de adultos | | | | | | | | | | | |
| Contaminação dos alimentos com fezes de adulto | | | | | | | | | | | |
| Contacto com o curral de animais adultos doentes | | | | | | | | | | | |
| Máximo de pontos: 50 | Pontuação total: | | | | | | | | | | |

Anexo 16. Avaliação de risco para a fase de Bezerro pós-desmame no âmbito do plano de controlo de PT. Adaptado do *Manuale per il controllo della Paratuberculosis negli allevamenti di bovini da carne (linea vacca-vitello)* publicado pelo Centro de Referência Italiano para a Paratuberculose.

| Bezerros pós-desmame | | | | | | | | |
|--|-----------------------------------|----------------|----------|----|-------------|----|---------|---------------|
| Inclui machos e fêmeas destinados à reprodução com menos de 1 ano de idade. Estes animais ainda são considerados suscetíveis e infetam-se pela ingestão do agente causal que está presente nas fezes de adultos infetados. | | | | | | | | |
| Fator de risco | Critério de pontuação | Risco | Pontos | | | | | |
| Contacto com animais adultos e suas fezes | Não | Baixo | 0-1 | | | | | |
| | Ocasionalmente | Moderado | 3-4 | | | | | |
| | Frequentemente | Alto | 6-7 | | | | | |
| Contaminação dos alimentos com fezes de adultos | Não | Baixo | 0-1 | | | | | |
| | Ocasionalmente | Moderado | 3-4 | | | | | |
| | Frequentemente | Alto | 6-7 | | | | | |
| Contaminação da água de abeberamento com fezes de adultos | Não | Baixo | 0-1 | | | | | |
| | Ocasionalmente | Moderado | 3-4 | | | | | |
| | Frequentemente | Alto | 6-7 | | | | | |
| Pastoreio com animais adultos | Raramente | Baixo | 0-1 | | | | | |
| | Ocasionalmente, em algumas fontes | Moderado | 3-4 | | | | | |
| | Frequentemente e em várias fontes | Alto | 6-7 | | | | | |
| Distribuição de estrume em pastagem para alimentação dos animais | Não | Baixo | 0-1 | | | | | |
| | Ocasionalmente | Moderado | 3-4 | | | | | |
| | Frequentemente | Alto | 6-7 | | | | | |
| *Use pontuações intermédias para situações não contempladas | | | | | | | | |
| Bezerros pós-desmame | 0. | 1. Muito baixo | 2. Baixo | 3. | 4. Moderado | 5. | 6. Alto | 7. Muito alto |
| Contacto com animais adultos e suas fezes | | | | | | | | |
| Contaminação dos alimentos com fezes de adultos | | | | | | | | |
| Contaminação da água de abeberamento com fezes de adultos | | | | | | | | |
| Pastoreio com animais adultos | | | | | | | | |
| Distribuição de estrume em pastagem para alimentação dos animais | | | | | | | | |
| Máximo de pontos: 35 | Pontuação total: | | | | | | | |

Anexo 17. Avaliação de risco para a fase de Bovinos com mais de um ano de idade no âmbito do plano de controlo de PT. Adaptado do *Manuale per il controllo della Paratuberculosis negli allevamenti di bovini da carne (linea vacca-vitello)* publicado pelo Centro de Referência Italiano para a Paratuberculose.

| Bovinos com mais de 1 ano de idade | | | | | | | |
|--|-----------------------------------|----------|----------------|----------|-------------|---------|---------------|
| Inclui novilhas gestantes e touros com mais de 1 ano de idade. Nestes animais a suscetibilidade de infeção é menor, mas ainda superior à do animal adulto. Estes animais infetam-se pela ingestão do agente causal que está presente nas fezes de adultos infetados. | | | | | | | |
| Fator de risco | Critério de pontuação | Risco | Pontos* | | | | |
| Contacto com animais adultos e suas fezes | Não | Baixo | 0-1 | | | | |
| | Ocasionalmente | Moderado | 2-3 | | | | |
| | Frequentemente | Alto | 4-5 | | | | |
| Contaminação dos alimentos com fezes de adultos | Não | Baixo | 0-1 | | | | |
| | Ocasionalmente | Moderado | 2-3 | | | | |
| | Frequentemente | Alto | 4-5 | | | | |
| Contaminação da água de abeberamento com fezes de adultos | Não | Baixo | 0-1 | | | | |
| | Ocasionalmente | Moderado | 2-3 | | | | |
| | Frequentemente | Alto | 4-5 | | | | |
| Pastoreio com animais adultos | Raramente | Baixo | 0-1 | | | | |
| | Ocasionalmente, em algumas fontes | Moderado | 2-3 | | | | |
| | Frequentemente e em várias fontes | Alto | 4-5 | | | | |
| Distribuição de estrume em pastagem para alimentação dos animais | Não | Baixo | 0-1 | | | | |
| | Ocasionalmente | Moderado | 2-3 | | | | |
| | Frequentemente | Alto | 4-5 | | | | |
| *Use pontuações intermédias para situações não contempladas | | | | | | | |
| Bovinos com mais de 1 ano de idade | | 0. | 1. Muito baixo | 2. Baixo | 3. Moderado | 4. Alto | 5. Muito alto |
| Contacto com animais adultos e suas fezes | | | | | | | |
| Contaminação dos alimentos com fezes de adultos | | | | | | | |
| Contaminação da água de abeberamento com fezes de adultos | | | | | | | |
| Pastoreio com animais adultos | | | | | | | |
| Distribuição de estrume em pastagem para alimentação dos animais | | | | | | | |
| Máximo de pontos: 25 | Pontuação total: | | | | | | |

Anexo 18. Avaliação de risco para a fase de Bovinos com mais de dois anos de idade no âmbito do plano de controlo de PT. Adaptado do *Manuale per il controllo della Paratuberculosis negli allevamenti di bovini da carne (linea vacca-vitello)* publicado pelo Centro de Referência Italiano para a Paratuberculose.

| Bovinos com mais de 2 anos de idade | | | | | | |
|--|-----------------------|------------------|----------------|----------|-------------|---------|
| Os animais com mais de 2 anos de idade são pouco suscetíveis à infeção, mas os animais adultos infetados podem eliminar uma grande quantidade de agente nas fezes para o ambiente contribuindo para uma elevada contaminação ambiental. A resistência do adulto à infeção pode ser ultrapassada pela exposição a um ambiente extremamente contaminado. Estes animais infetam-se pela ingestão do agente causal que está presente nas fezes de adultos infetados. | | | | | | |
| Fator de risco | Critério de pontuação | Risco | Pontos | | | |
| Contaminação fecal dos alimentos | Não | Baixo | 0-1 | | | |
| | Ocasionalmente | Moderado | 2 | | | |
| | Frequentemente | Alto | 3-4 | | | |
| Contaminação fecal das águas | Não | Baixo | 0-1 | | | |
| | Ocasionalmente | Moderado | 2 | | | |
| | Frequentemente | Alto | 3-4 | | | |
| Acesso a áreas de armazenamento/acumulação de estrumes | Não | Baixo | 0-1 | | | |
| | Ocasionalmente | Moderado | 2 | | | |
| | Frequentemente | Alto | 3-4 | | | |
| Distribuição de estrume em pastagem para alimentação dos animais | Não | Baixo | 0-1 | | | |
| | Ocasionalmente | Moderado | 2 | | | |
| | Frequentemente | Alto | 3-4 | | | |
| *Use pontuações intermédias para situações não contempladas | | | | | | |
| Bovinos com mais de 2 anos de idade | | 0. | 1. Muito baixo | 2. Baixo | 3. Moderado | 4. Alto |
| Contaminação fecal de alimentos | | | | | | |
| Contaminação fecal das águas | | | | | | |
| Acesso a áreas de armazenamento/acumulação de estrumes | | | | | | |
| Distribuição de estrume em pastagem para alimentação dos animais | | | | | | |
| Máximo de pontos: 16 | | Pontuação total: | | | | |

Anexo 19. Avaliação de risco para Animais introduzidos no âmbito do plano de controlo de PT. Adaptado do *Manuale per il controllo della Paratuberculosis negli allevamenti di bovini da carne (linea vacca-vitello)* publicado pelo Centro de Referência Italiano para a Paratuberculose.

| Animais introduzidos | | | | | |
|---|-------------------|------|-------|-------|-----|
| A compra de animais com origem externa à exploração é a principal causa de introdução da doença. O risco de introdução de animais infetados depende das garantias fornecidas pela exploração de origem relativamente ao estatuto de Paratuberculose e do número de animais introduzidos (quanto maior o número, maior o risco). | | | | | |
| Origem dos animais | Número de animais | | | | |
| | 1-5 | 6-12 | 13-20 | 21-50 | >50 |
| Exploração negativa | 0 | 2 | 4 | 6 | 8 |
| Exploração de baixo risco | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
| Um único efetivo de estatuto desconhecido | 20 | 22 | 23 | 26 | 28 |
| Vários efetivos com estatuto desconhecido | 30 | 34 | 36 | 38 | 40 |
| Máximo de pontos: 60 (se >60, considerar 60) | Pontuação total: | | | | |

**Anexo 20. Tabela resumo da Avaliação de Risco no âmbito do plano de controlo de PT.
Adaptado do *Manuale per il controllo della Paratuberculosis negli allevamenti di bovini da carne (linea vacca-vitello)* publicado pelo Centro de Referência Italiano para a Paratuberculose.**

| Tabela resumo da avaliação de risco | | | | |
|--|------------------|-------------------|--------|---------|
| Fase | Pontuação máxima | Pontuação da fase | %Fase# | %Total* |
| Partos | 40 | | | |
| Criação de bezerros | 50 | | | |
| Bezerros pós-desmame | 35 | | | |
| Bovinos com mais de 1 ano | 25 | | | |
| Bovinos com mais de 2 anos | 16 | | | |
| Animais introduzidos | 60 | | | |
| Total | 226 | | | |
| #Cálculo da percentagem do risco para cada fase: $\frac{\text{Pontuação da fase}}{\text{Pontuação máxima}} \times 100$ | | | | |
| *Cálculo da percentagem do risco total: $\frac{\text{Pontuação da fase}}{\text{Pontuação total}} \times 100$ | | | | |