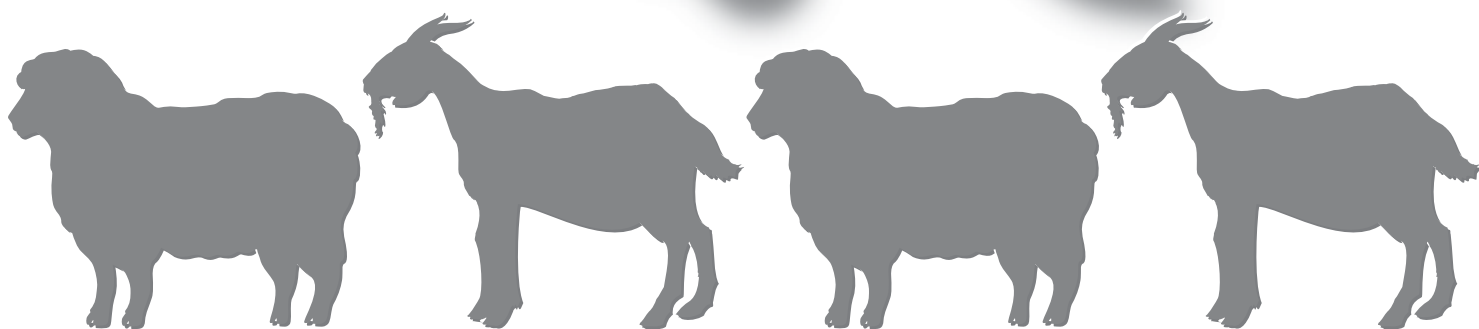




Guia sanitário para criadores de pequenos ruminantes



Coordenação
Álvaro Mendonça

Título: Guia sanitário para criadores de pequenos ruminantes
Editor: Álvaro Mendonça
Edição: Instituto Politécnico de Bragança · 2012
5300-253 Bragança · Portugal
Tel. (+351) 273 303 200 · Fax (+351) 273 325 405
<http://www.ipb.pt>
Design: Serviços de Imagem do Instituto Politécnico de Bragança
Tiragem: 2600 exemplares
Impressão: Escola Tipográfica – Bragança
Depósito legal: 350250/12
ISBN: 978-972-745-137-1
Versão digital: <http://hdl.handle.net/10198/7264>

Relatório do Projecto

OTSA (POCTEP) 0108-OTSA-2-E. Observatório Transfronteiriço de Sanidade Animal



PROGRAMA
COOPERACIÓN TRANSFRONTERIZA
ESPAÑA – PORTUGAL
COOPERAÇÃO TRANSFRONTEIRIÇA
2 0 0 7 – 2 0 1 3



União Europeia
FEDER

Investimos no seu futuro



INSTITUTO POLITÉCNICO
DE BRAGANÇA
Escola Superior Agrária



Centro de
Investigação
de Montanha



GOVERNO DE
PORTUGAL

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,
DO MAR, DO AMBIENTE
E DO ORDENAMENTO DO TERRITÓRIO

DGAV

Direção Geral
de Alimentação
e Veterinária



Junta de
Castilla y León



inrb

Instituto Nacional
de Recursos Biológicos, I. P.



UNIVERSIDADE
DE TRÁS-OS-MONTES
E ALTO DOURO
utad

Colaboração Científica

Prof. Doutor Álvaro Pegado Mendonça – ESA/IPB
Prof. Doutora Ana Cláudia Coelho – UTAD
Dra. Ana Paula Figueiras – DSVRN/DGAV
Dr. Duarte Diz Lopes – ESA/IPB - Clínica Veterinária Santiago
Prof. Doutor Filipe Silva – UTAD
Dr. Hélder Quintas – ESA/IPB - ACRIGA, Associação de Criadores de Gado
Prof. Doutora Isabel Pires – UTAD
Prof. Doutor Luís Cardoso – UTAD
Dra. Madalena Monteiro – LNIV/INRB
Prof. Doutor Miguel Saraiva Lima – FMV/UTL Lisboa
Prof. Doutor Nuno Alegria – UTAD
Dr. Raimundo Maurício – ESA/IPB
Prof. Doutor Ramiro Valentim – ESA/IPB
Prof. Doutora Yolanda Vaz – FMV/UTL Lisboa

Paratuberculose em pequenos ruminantes

Ana Cláudia Coelho¹ e Hélder Quintas²

1) Laboratório de Microbiologia Médica, Departamento de Ciências Veterinárias, CECAV, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD). 5001-801 Vila Real, Portugal

2) Sanidade Animal, Clínica de Grandes Animais. Departamento de Ciência Animal, Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança.
ACRIGA – Associação de Criadores de Gado.

Introdução

A paratuberculose, ou doença de Johne é uma doença infecciosa causada por *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* (Map). Afeta principalmente os ruminantes, originando uma enterite crónica granulomatosa e fatal. As probabilidades de cura do animal são escassas, o custo dos fármacos é elevado, superando na espécie ovina e caprina o valor do animal.

Etiologia

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (Map) é um bacilo pequeno de 1,0-2,0 mm de comprimento por 0,5 mm de largura. Quando corado pelo método de Gram, adquire uma cor azulada, sendo classificado como bacilo Gram positivo. Quando corado pelos métodos de Ziehl-Neelsen ou por Kinyoun, torna-se vermelho, sendo considerado álcool-ácido resistente. O agente etiológico pode ser encontrado em duas formas: constituído por uma parede celular, sendo necessária a coloração álcool-ácido resistente, ou perder a maior parte da sua parede celular e, existir como uma forma intracelular desprovida ou defectiva de parede celular (esferoplastos) (Chamberlin *et al.*, 2001). Todas as micobactérias são aeróbias ou microaerófilas, crescendo a temperaturas entre os 30 e 45°C. As principais características microbiológicas distintivas, continuam a ser a sua dependência em micobactina em meios com ovo e, a lentidão de crescimento (Aduriz *et al.*, 1995). A elevada resistência de Map fora do hospedeiro condiciona em grande medida a epidemiologia da doença, assim como, as estratégias de controlo.

Epidemiologia

A paratuberculose tem distribuição mundial. A doença tem sido especialmente estudada em vacas, ovelhas e cabras ainda que Map possa infetar outros ruminantes selvagens como veados. Recentemente, a ocorrência natural desta patologia foi descrita em espécies selvagens não ruminantes (Daniels *et al.*, 2003). A infeção ocorre nos animais de pouca idade, normalmente, nos primeiros 30 dias de vida, enquanto a doença clínica não se desenvolve até aos 3 a 5 anos de idade. Este limite etário não deve ser usado como critério de diagnóstico, visto que já se encontrou a infeção em animais com menos de 2 anos de idade (Radostits *et al.*, 2007). A infeção ocorre após o nascimento, através da ingestão oral de Map, a partir das fezes de animais infe-

tados, sendo a transmissão feco-oral a forma mais frequente (Juste e Aduriz, 1990; Stehman, 1996). Os animais portadores eliminam as micobactérias com as fezes, as quais podem contaminar os alimentos e a água que são posteriormente ingeridos por animais susceptíveis. No caso de animais recém-nascidos, o contágio produz-se ao mamar em úberes conspurcados com fezes (Juste e Aduriz, 1990). Já se efetuou o isolamento de Map de órgãos genitais, útero, leite e sémen de ruminantes (Sweeney, 1996). A paratuberculose é uma doença que causa perdas económicas significativas em todo o mundo (Losinger, 2006). Os efeitos adversos são devidos à redução da produção do leite e má condição corporal. No entanto, há também perdas associadas à diminuição da fertilidade e mamites (Collins, 1994; Hutchinson, 1996). O refugo precoce com as consequentes perdas de material genético e lucros potenciais futuros é uma parte importante, mas difícil de quantificar (Kudahl *et al.*, 2004).

Patogenia

A via de infeção natural é a oral e a localização primária é o tecido linfóide organizado do intestino delgado (placa de Peyer). Uma vez ingerido, o bacilo penetra imediatamente nas superfícies mucosas do tracto gastrintestinal, devido à sua captura pelas células M que recobre as cúpulas das placas de Peyer do íleo e do jejuno, sendo transportada em vacúolos até aos macrófagos de seguida fagocitado pelos macrófagos subepiteliais (Momotani *et al.*, 1988). Geralmente, a lesão granulomatosa começa por se desenvolver nas placas de Peyer do jejuno e da válvula ileocecal (Gilmour e Angus, 1988). A fase inicial da paratuberculose, com a presença de pequenos granulomas na zona interfolicular da placa de Peyer, pode durar desde umas semanas até vários anos (latência neste caso). A fase seguinte será a invasão de outras zonas da mucosa, livres de placas de Peyer, de forma multifocal, com pequenos granulomas. À medida que a doença progride, inicia-se uma resposta humoral devido à libertação dos bacilos a partir dos macrófagos mortos (European Commision, 2000).

Quadro clínico e lesional

A ocorrência de paratuberculose num efetivo de ruminantes assemelha-se a um “iceberg”. A doença observada no rebanho representa uma ínfima parte do número de animais infetados. Não existem sinais clínicos específicos dos ovinos. O que ocorre, principalmente, é uma perda crónica progressiva de peso corporal como resultado da má absorção e perda de músculo (Figura 1). Os pequenos ruminantes podem ser assintomáticos de 2 até 7 anos de idade (Navarre e Pugh, 2002). A doença manifesta-se, principalmente, através da emaciação, embora possa ocorrer perda de lã. A diarreia não é severa nem característica. Nos casos avançados as fezes tornam-se moles e deformadas. Os ovinos podem perder peso por 4 ou mais meses, serem parcialmente anorécticos e as suas fezes serem normais (Radostits *et al.*, 2007). A depressão e dispneia são evidentes nos caprinos, mas menos óbvias nas ovelhas (Radostits *et al.*, 2007). Os ovinos apresentam edema submandibular devido ao baixo nível em proteínas (Navarre e Pugh, 2002), e os globos oculares ficam encovados por desaparecimento da gordura retro-ocular. Os dentes podem estar quebradiços, e os animais apáticos, podendo chegar à ausência de estímulos

externos, até marcha cambaleante (devido à diminuição da massa muscular dos glúteos). Os estudos hematológicos podem revelar anemia normocrômica, hipoproteinemia, descida dos valores séricos de cálcio e magnésio (Kimberling, 1988). Tal como nos bovinos, pode ser observada uma melhoria dos sintomas durante a gestação (Brugère-Picoux, 1987). Outros sintomas notados são os problemas respiratórios com dispnéia e os abortos (Radostits *et al.*, 2007).



Figura 1 – Caprino e ovino com sintomatologia típica de paratuberculose

A paratuberculose caprina é uma afeção caquetizante dos adultos, de evolução progressiva, raramente acompanhada de sintomas digestivos. O seu diagnóstico clínico é praticamente impossível devido à falta de sinais clínicos característicos. As cabras afetadas têm entre 2 a 3 anos, ocorrendo raramente em animais mais novos. A perda de peso é progressiva, podendo estender-se por semanas e meses, conduzindo a uma emaciação dramática. O apetite, inicialmente, mantém-se normal mas, mais tarde diminui (Vialard, 2000). Com o decorrer do tempo aumenta a letargia e a depressão. O elo apresenta-se rugoso, sem fibra (Matthews, 1999). A diarreia apenas aparece nos estádios terminais sendo grave, tipo água de arroz (Garrido *et al.*, 1989; Lopez-Escar, 1990). A anemia desenvolve-se à medida que a doença progride. Aparecem sinais de hipoproteinemia, como o edema submandibular (Matthews, 1999). Há letargia e diminuição da produção de leite (Lopez-Escar, 1990) e aumento de aborto “não-infeccioso” em rebanhos de cabras infetadas (Garrido *et al.*, 1989).

Um aspeto importante no estudo anátomo-patológico da paratuberculose, especialmente nos pequenos ruminantes, é a falta de correlação existente entre a gravidade dos sintomas e a extensão e alcance das lesões macro e microscópicas (Barker *et al.*, 1993).

As alterações macroscópicas podem não ser visíveis a olho nu, estando frequentemente ausentes nos pequenos ruminantes. A lesão mais característica aparece na parte final do intestino delgado, válvula íleo-cecal, íleo e porções mais caudais do jejuno e ceco, consistindo num evidente espessamento da parede intestinal,

que se mostra edemaciada e aumentada até duas a três vezes a sua espessura, sendo frequente o aparecimento de pregas na mucosa, que não desaparecem quando se estira o intestino (Barker *et al.*, 1993; Pérez *et al.*, 2000). Estas pregas transversais conferem um aspeto cerebriforme à mucosa (Figura 2). Esta lesão que aparece na paratuberculose bovina, é infrequente e de menor intensidade na paratuberculose dos ovinos. As lesões macroscópicas intestinais variam de espessamento moderado em 36% dos casos, a enrugamento severo da mucosa em 48% dos casos (Carrigan e Seaman, 1990).

Os vasos linfáticos aferentes do mesentério podem aparecer dilatados e retorcidos, incluir pequenos nódulos de 1-4 mm e esbranquiçados, que podem evoluir até à caseificação ou, em determinadas ocasiões à calcificação. Nódulos similares ou manchas brancas podem observar-se sobre a superfície peritoneal do íleo, na superfície de corte da parede intestinal, ou nos gânglios mesentéricos e válvula íleo-cecal. Estes focos de necrose e caseificação nos linfonodos constituem uma característica que não ocorre em bovinos, sendo de apresentação frequente em ovinos. Os gânglios estão quase sempre aumentados e muito proeminentes (Gilmour e Angus, 1988).



Figura 2 – Aspeto macroscópico típico da válvula ileo-cecal em ovinos com paratuberculose.

Nos caprinos as lesões macroscópicas não são tão evidentes, sendo variáveis. À necrópsia o animal apresenta-se emaciado, sem gordura abdominal. Os linfonodos

encontram-se aumentados, nos estádios terminais com focos caseosos, hipertrofia ligeira da mucosa do íleo e do cólon proximal. Observam-se lesões granulomatosas no intestino, gânglios e por vezes no fígado. As lesões assemelham-se às produzidas pela tuberculose devido à caseificação e calcificação das lesões entéricas e dos gânglios linfáticos mesentéricos (Barker *et al.*, 1993).

Diagnóstico

Os sinais clínicos apresentados pelo animal são insuficientes para estabelecer um diagnóstico. A ausência de animais com sinais clínicos, não descarta a possibilidade de que a paratuberculose se encontre numa exploração, visto que é normal a ausência de sinais clínicos.

A paratuberculose deve diferenciar-se de outros processos crónicos e caqueizantes como parasitoses (ostertagiose, fasciolose, nematodirose, bunostomose, tuberculose (Jorge, 2000), carência em cobre (intoxicação por molibdénio), carência de cobalto (Radostits *et al.*, 2007), aporte de magnésio em excesso, (Brugère-Picoux, 1987), micotoxicode, abscessos hepáticos e outras doenças hepáticas do tipo crónico, abscessos internos (Kimberling, 1988). O isolamento de Map em meios seletivos de cultura é o método mais conclusivo de identificação. As dificuldades de cultura devem-se essencialmente à sua baixa taxa de crescimento, por um lado, porque qualquer outra espécie bacteriana de crescimento normal pode esgotar o meio de cultura antes que comece o crescimento de Map, por outro, porque os longos períodos de incubação exigem grande capacidade de armazenamento e acompanhamento ao longo do tempo, necessitando de grande quantidade de mão-de-obra especializada.

O isolamento de Map, tanto a partir de fezes como de tecidos animais, é a prova considerada de referência. Nos ovinos, as melhores amostras para diagnóstico são a válvula íleo-cecal e os linfonodos mesentéricos caudais e íleocecal. É ainda possível isolar Map do parênquima hepático, baço, rim, gânglios hepáticos, traqueobronquiais e supramamários, (Pavlík *et al.*, 2000). Map é capaz de crescer na maioria dos meios utilizados para o isolamento de micobactérias, desde que, nos mais comuns, se coloque micobactina. Os meios de cultura mais utilizados, habitualmente, são aqueles à base de ovo como o de Herrold (HEYM), ou o de Löwenstein-Jensen (Garrido, 2002). Mas, também se usam sintéticos como as diferentes variantes do meio de Middlebrook (Aduriz *et al.*, 1995). As colónias em Löwenstein-Jensen são difíceis de visualizar, necessitando de 40 semanas para o crescimento (Stehman e Shulaw, 1996). Uma variante de cultura que tem tido muito êxito em alguns laboratórios é a radiométrica, BACTEC 12B que se caracteriza pelo seu elevado grau de automatização para detetar o crescimento das micobactérias mediante a quantificação do $^{14}\text{CO}_2$, libertado durante a metabolização do ^{14}C presente em alguns nutrientes do meio líquido (meio Middlebrook 7H12) (European Commission, 2000).

A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) para a deteção da sequência de inserção IS900, específica de Map, tem proporcionado uma excelente ferramenta de identificação desta espécie. A técnica de PCR permite a deteção rápida e específica de Map em amostras clínicas, já que os resultados podem estar disponíveis em três dias, em comparação com os 6-8 meses de cultura. Mediante a técnica, é possível

detetar quantidades ínfimas de microrganismos, apesar da limitação que supõe a concentração das micobactérias a partir da amostra clínica e, da visualização do produto amplificado (Fang *et al.*, 2002).

Uma característica comum às infeções por micobactérias é o desenvolvimento de respostas imunitárias de natureza espectral. Assim, nos estádios iniciais da infeção, observa-se uma escassa ou nula resposta humoral, predominando a resposta do tipo celular. Por isso, nesta fase, as técnicas baseadas na deteção de anticorpos proporcionam resultados negativos, pois a carga antigénica é diminuta. Pelo contrário, as técnicas que detetam o segundo tipo de resposta produziram resultados positivos e, conforme progredisse, inverter-se-iam. Por último, nas fases finais da doença, pode instaurar-se o estado de anergia, pelo que os animais não seriam detetados por nenhuma das técnicas (Garrido *et al.*, 2000).

A intradermorreação (IDR) tem sido a técnica mais utilizada no diagnóstico da paratuberculose *in vivo*. Como antigénios utilizam-se extractos proteicos purificados obtidos a partir de *Map*, que são conhecidos como Johnina ou paratuberculina, ou de *M. avium*. O teste envolve a injeção de 0,2 ml de Johnina PPD (derivado proteico purificado) por via intradérmica. Como local de inoculação, recomenda-se as zonas das tábuas do pescoço, fazendo-se a mesma interpretação que na tuberculose, embora a leitura se faça às 48 horas. É considerada uma reação positiva, um aumento da espessura da pele de três ou mais milímetros (Garrido *et al.*, 2000). Dentro das técnicas imunológicas *in vitro* incluem-se as provas de transformação linfocitária, a inibição da migração leucocitária e a deteção da produção de interferão- γ (IFN- γ). As três utilizam, como antigénio, um derivado PPD e, são essencialmente uma réplica *in vitro* de alguns dos fenómenos que se produzem na prova intradérmica. Estas três técnicas têm como inconveniente manter vivos os linfócitos para sua estimulação, pelo que devem ser executadas num curto período após a colheita de amostras (Garrido *et al.*, 2000; Huda *et al.*, 2003).

O uso da serologia no diagnóstico da paratuberculose parece ter um valor limitado. As principais razões para este facto são a seroconversão ocorrer relativamente tarde no decurso da doença e, não haver uma correlação forte com o grau de excreção fecal. Por outro lado, a especificidade dos testes serológicos é afetada pelas reações cruzadas com outros agentes infecciosos (Nielsen *et al.*, 2001). Actualmente existem três técnicas capazes de determinar a presença de anticorpos no soro de animais infetados: a fixação de complemento (FC), a imunodifusão em gel de agar (AGID), e o ensaio imunoenzimático: “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay” (ELISA). Como não ocorre uma resposta humoral forte até às fases finais da doença, a sensibilidade destes testes é maior nos animais com lesões multibacilares (Iepromatosas) (Clarke *et al.*, 1996). Deve-se ter em atenção que um resultado positivo aos testes serológicos em animais que evidenciam sinais clínicos indica a presença de paratuberculose. Contudo, a doença não pode ser descartada se o animal apresentar um teste negativo. As ovelhas e as cabras parecem responder de maneira diferente na formação de anticorpos. As ovelhas tendem a desenvolver anticorpos nas fases tardias da doença, ao contrário dos caprinos, nos quais os anticorpos podem ser detetados muito mais cedo (Navarre e Pugh, 2002).

Controlo e prevenção

A paratuberculose não tem nenhum tratamento efetivo. Por isso, o controlo e a prevenção são imperativos. No entanto, prevenir a introdução da doença num efetivo é extremamente difícil (Navarre e Pugh, 2002). De todas as medidas efetuadas para o controlo, a vacinação associada ao manejo adequado é a que melhores resultados proporciona (Juste e Perez, 2011). Embora não conduza à sua total erradicação, produz uma redução significativa da incidência clínica, assim como, do número de animais excretadores e portadores de infeção intestinal detectável. Como inconveniente, devem-se assinalar a formação de um nódulo no local de inoculação que pode incomodar o animal, a possibilidade de se obter uma população serológica positiva e a sensibilização dos animais à tuberculina mamífera e aviária (Reddacliff *et al.*, 2006). De um modo geral, a vacina contra a paratuberculose administra-se de forma subcutânea na zona da axila dos ovinos ou no tecido laxo da zona peitoral nas outras espécies de ruminantes (Aduriz *et al.*, 2000). A vacinação não confere uma proteção absoluta, já que os animais podem desenvolver a doença e/ou eliminar as micobactérias com as fezes. Por outro lado, é preciso não esquecer os efeitos adversos da mesma, a formação de nódulos fibrocaseosos e a positividade dos animais a provas serológicas ou à IDR frente à paratuberculose ou tuberculose, visto que, a forte reação à tuberculose aviária nos animais vacinados à paratuberculose, poderia mascarar uma menor reação à PPD bovina (Aduriz *et al.*, 2000). A inoculação accidental da vacina no pessoal encarregado da sua administração, tem por, vezes registado a formação de um nódulo doloroso que pode necessitar de cirurgia para a sua resolução, embora, um tratamento local com corticoesteróides possa ser o suficiente para eliminar a inflamação em poucas semanas (Aduriz *et al.*, 2000). A paratuberculose é uma doença na qual o manejo é considerado como uma das ferramentas mais poderosas para o seu controlo. As medidas de controlo dependem do controlo da infeção feco-oral, transmissão, compra de animais para substituição em efetivos sem história de doença, manejo dos animais nascidos na exploração, de forma a minimizar o risco de transmissão da infeção nas gerações vindouras. Nas espécies criadas em pastos, o controlo da infeção é particularmente problemático. A medida de evitar o pastoreio é economicamente impraticável. O controlo da transmissão feco-oral depende de uma identificação precoce dos animais que excretam os microrganismos e manejo da densidade do rebanho, rotação das pastagens e fontes de água (Rossiter e Burhans, 1996).

O refugio de ovinos jovens pode ser uma forma de reduzir as perdas devidas à paratuberculose (Lugton, 2004). Os produtores que vendam animais vivos, embriões, ou sémen sem sinais da doença, escondendo, contudo, o estatuto epidemiológico do efetivo, colocam em risco outros. Quer os produtores, quer os médicos veterinários necessitam estar bem informados sobre a doença. Os médicos veterinários desempenham um papel primordial, assegurando que a sua informação é adequada para os produtores. A decisão dos produtores deve ser baseada no seu conhecimento e, mesmo aqueles que decidam nada fazer para solucionar o problema, devem estar conscientes das suas opções, assim como das consequências vindouras das suas decisões (Benedictus *et al.*, 2000).

Tratamento

Sendo a paratuberculose invariavelmente fatal, muitos compostos antimicrobianos têm sido avaliados como potenciais agentes terapêuticos. Como *Map* é um organismo intracelular, a maioria das drogas usadas, são incapazes de penetrar nos macrófagos (St. Jean, 1996). Actualmente, nenhum fármaco está aprovado e, nas raras circunstâncias em que se procede à terapia, são utilizados os agentes antimicrobianos padronizados. O tratamento é muito dispendioso e pouco eficaz, sendo somente usado para prolongar a vida a animais com fins de reprodução extremamente valiosos (Harris e Barletta, 2001). Os fármacos que têm sido usados no tratamento de casos clínicos incluem a isoniazida, a rifampicina, a clofazimida, o dapsona, aminoglicosídeos, o etambutol (St. Jean, 1996) e a monensina (Hendrick *et al.*, 2006). A administração de anti-histamínicos e a dessensibilização com johnina endovenosa pode ser efetuada no início do tratamento. O tratamento nos animais não elimina as infeções ou lesões, as probabilidades de cura do animal são escassas, o custo dos fármacos é elevado, superando na espécie ovina e caprina o valor do animal. Por outro lado, é necessário tratamento diário e os derivados cárneos e lácteos dos animais tratados não podem ser consumidos antes do fim do intervalo de segurança (St. Jean, 1996).

Referências

- Adúriz, J.J., Juste, R.A. & Cortabarría, N. (1995). Lack of mycobactin dependence of mycobacteria isolated on Middlebrook 7H11 from clinical cases of ovine paratuberculosis. *Vet Microbiol*, **45**: 211-217.
- Barker, I., Van Dreumel, A. & Palmer, N. (1993). The alimentary system. In: K. Jubb, P. Kennedy e N. Palmer (Eds.). *Pathology of domestic animals* (Vol. II, 4ª edição, pp. 1-318). San Diego: Academic Press, Inc..
- Benedictus, G., Verhoeff, J., Schukken, Y.H. & Hesselink, J.W. (2000). Dutch paratuberculosis programme history, principles and development. *Vet Microbiol*, **77**: 399-413.
- Brugère-Picoux, J. (1987). Le diagnostic de la paratuberculose chez les ruminants. *Rec Med Vet*, **163**: 539-546.
- Carrigan, M. & Seaman, J. (1990). The pathology of Johne's disease in sheep. *Aust Vet J*, **67**: 47-50.
- Chamberlin, W., Graham, D.Y., Hulten, K., El-Zimaity, H.M., Schwartz, M.R., Naser, S., Shafran, I. & El-Zaatari, F.A. (2001). Review article: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* as one cause of Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*, **15**: 337-346.
- Clarke, C.J., Patterson, I.A. P., Armstrong, K.E. & Low, J.C. (1996). Comparison of the absorbed ELISA and agar gel immunodiffusion test with clinicopathological findings in ovine clinical paratuberculosis. *Vet Rec*, **139**: 618-621.
- Collins, M.T. (1994). Clinical approach to control of bovine paratuberculosis. *J Am Vet Med Assoc*, **204**: 208-210.
- Daniels, M.J., Lees, J.D., Hutchings, M.R. & Greig, A. (2003). The ranging behaviour and habitat use of rabbits on farmland and their potential role in the epidemiology of paratuberculosis. *Vet J*, **165**: 248-257.

- European Commission SANCO/B3/R16 (2000). Possible links between Crohn's disease and paratuberculosis. Report of the Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare, 76 pág.
- Fang, Y., Wu, W.-F., Pepper, J., Larsen, J., Marras, S., Nelson, E., Epperson, W. & Christopher-Hennings, J. (2002). Comparison of real-time, quantitative PCR with molecular beacons to nested PCR and culture methods for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine fecal samples. *J Clin Microbiol*, **40**: 287-291.
- Garrido, F., Hooghuis, H. & Leon, L. (1989). Apuntes sobre paratuberculosis (pp. 47-54). Informes Técnicos nº28 – II Reunión sobre paratuberculosis en España. Derio.
- Garrido, J.M. (2002). Puesta a punto de técnicas PCR en heces y de ELISA para el diagnóstico de la paratuberculosis. Estudio de prevalencia en ganado bovino. Tese para a obtenção do grau de Doutor em Medicina Veterinária. Zaragoza: Universidade de Zaragoza, 256 pág.
- Gilmour, N.J.L. & Angus, K.W. (1988). Paratuberculosis. In W. B. Martin (Ed.) Enfermedades de la oveja (pp. 57-61). Zaragoza: Editorial Acribia.
- Harris, N.B. & Barletta, R.G. (2001). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. *Clin Microbiol Rev*, **14**: 489-512.
- Hendrick, S.H., Kelton, D.F., Leslie, K.E., Lissemore, K.D., Archambault, M., Bagg, R., Dick, P., & Duffield, T.F. (2006). Efficacy of monensin sodium for the reduction of fecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in infected dairy cattle. *Prev Vet Med*, **75**: 206-220.
- Huda, A., Lind, P., Christoffersen, A.B. & Jungersen, G. (2003). Analysis of repeated tests for interferon-gamma (IFN- γ) response and faecal excretion for diagnosis of subclinical paratuberculosis in Danish cattle. *Vet Immunol Immunopathol*, **94**: 95-103.
- Hutchinson, L.J. (1996). Economic impact of paratuberculosis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, **12**: 373-381.
- Jorge, M.C., Schettino, D.M., Torres, P. & Bernardelli, A. (2000). Primera descripción concomitante de tuberculosis y paratuberculosis en ovinos lecheros en Argentina. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, **19**: 800-809.
- Juste, R.A. & Aduriz, J.J. (1990). Aspectos epidemiológicos. *Ovis*, (7): 65-75.
- Juste R, Perez V (2011). Control of paratuberculosis in sheep and goats. *Vet. Clin. Food Anim*. 27, 127–138.
- Kimberling, C.V. (1988). Jensen and Swift's Diseases of Sheep (3ª edition, pp. 235-238). Philadelphia: Lea & Febiger.
- Kudahl, A., Nielsen, S.S. & Sorensen, J.T. (2004). Relationship between antibodies against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk and shape of lactation curves. *Prev Vet Med*, **62**: 119-134.
- Lopez-Escar, A. (1990). Aspectos en el campo sobre paratuberculosis y su vacunación (pp. 54-59). Informes Técnicos nº 34-III Reunión sobre Paratuberculosis en España. Derio.
- Losinger, W.C. (2006). Economic impacts of reduced milk production associated with epidemiological risk factors for Johne's disease on dairy operations in the USA. *J Dairy Res*, **73**: 33-43.

- Lugton, I.W. (2004). Cross-sectional study of risk factors for the clinical expression of ovine Johne's disease on New South Wales farms. *Aust Vet J*, **82**: 355-365.
- Matthews, J. (1999). Diseases of the goat (2^a edition, pp. 111-114). London: Blackwell Science.
- Momotani, E., Whipple, D.L., Thiermann, A.B. & Cheville, N.F. (1988). Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches in calves. *Vet Pathol*, **25**: 131-137.
- Nielsen, S.S., Houe, H.M., Thamsborg, S.M. & Bitsch, V. (2001). Comparison of two enzyme-linked immunosorbent assays for serologic diagnosis of paratuberculosis (Johne's disease) in cattle using different subspecies strains of *Mycobacterium avium*. *J Vet Diagn Invest*: **13**, 164-166.
- Navarre, C.B. & Pugh, D.G. (2002). Diseases of the gastrointestinal system. In: D. G. Pugh (Ed.) *Sheep and Goat Medicine* (pp. 69-105). Philadelphia: W. B. Saunders Company.
- Pavlík, I., Matlova, L., Bartl, J., Svastova, P., Dvorska, L. & Whitlock, R. (2000). Parallel faecal and organ *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* culture of different productivity types of cattle, *Vet Microbiol*, **77**: 309-324.
- Pérez, V., Corpa, J.M. & García, J.F. (2000). El cuadro clínico y lesional de la paratuberculosis bovina. *Bovis*, (**93**): 39-47.
- Radostits OM, Blood DC, Gay CC (2007). *Veterinary medicine: a textbook of the diseases of catlee, sheep, pigs, goats and horses*. 9th ed. Philadelphia: Bailliere Tindall, p.830-839
- Reddacliff, I., Eppleston, J., Windsor, P., Whittington, R. & Jones, S. (2006). Efficacy of a killed vaccine for the control of paratuberculosis in Australian sheep flocks. *Vet Microbiol*, **115**: 8887-8890.
- Rossiter, C.A. & Burhans, W.S. (1996). Farm-specific approach to paratuberculosis (Johne's disease) control. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, **12**: 383-415.
- St. Jean, G. (1996). Treatment of clinical paratuberculosis in cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, **12**: 417-430.
- Stehman, S.M. (1996). Paratuberculosis in small ruminants, deer, and South American camelids. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, **12**: 441-455.
- Stehman, S.M. & Shulaw, W.P. (1996). Paratuberculosis (Johne's disease) in sheep and goats – Recommendations for diagnosis and control. United States Animal Health Association Committee on Sheep and Goats.
- Sweeney, R.W. (1996). Transmission of paratuberculosis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, **12**: 305-312.
- Vialard, J. (2000). La paratuberculose caprine. *Point Vet*, **31**: 133-138.