

Teixeira, P. e Simões, J. A paratuberculose bovina em explorações leiteiras de pequena e média dimensão: que opções para o veterinário assistente? PUBVET, Londrina, V. 2, N. 43, Art#412, Out5, 2008.



PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia.

Disponível em: <<http://www.pubvet.com.br/texto.php?id=412>>.

A paratuberculose bovina em explorações leiteiras de pequena e média dimensão: que opções para o veterinário assistente?

Paulo Teixeira ⁽¹⁾ e João Simões ⁽²⁾

(1) Médico Veterinário em regime liberal. Arouca, Portugal.

(2) UTAD. Vila Real, Portugal.

Resumo

Muitas vezes o veterinário buiátrico depara-se com efectivos bovinos leiteiros de pequena e média dimensão onde existem indícios clínicos e epidemiológicos da presença de paratuberculose, como é o caso da realidade pecuária portuguesa. Estas explorações, geralmente com um encabeçamento inferior a 100 animais, exigem uma abordagem sanitária e técnico-económica específica. No presente artigo, foram descritos aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais a ter em consideração para a elaboração de uma decisão final, por parte do produtor, de modo a controlar ou erradicar a doença. O conteúdo deste trabalho recebeu uma menção honrosa atribuída pela Associação Portuguesa de Buiatria, em Abril de 2008, correspondente ao "Prémio de Buiatria Pfizer Saúde Animal", ao qual o primeiro autor se candidatou.

Introdução

A paratuberculose ou doença de John foi descrita pela primeira vez na Alemanha em 1895, por Johne e Fronthingham ⁸, erroneamente como sendo uma forma atípica de tuberculose numa vaca.

Esta enfermidade infecciosa, caracterizada por uma enterite crónica, tem como agente etiológico o *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) ¹² por vezes também, menos correctamente, designado por *Mycobacterium paratuberculosis*.

É uma doença contagiosa de distribuição mundial que atinge os mamíferos, com particular relevância nos pequenos e grandes ruminantes, equinos, suínos, lama, búfalo, camelo e coelhos selvagens. No entanto, existem indicações de que esta doença possa provavelmente atingir todos os animais de sangue quente. ^{15,20}

Em Portugal, na região de Entre Douro e Minho, encontra-se relatada uma prevalência aparente de bovinos seropositivos de 2,3% oriundos de 45,9% de 122 explorações leiteiras prospectadas e com uma variação entre 1 a 10 animais seroreactivos por exploração. ⁶

A elevada percentagem de explorações afectadas por esta doença associada ao ainda baixo encabeçamento existente na nossa região nortenha (a maioria das explorações tem menos de 100 animais), e aos custos de diferentes análises laboratoriais limitam em muito a abordagem clínica do assistente veterinário em situações suspeitas assim como a implementação de programas de saúde nessas explorações.

O presente trabalho teve como objectivo descrever os principais aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais a ter em consideração relativamente à paratuberculose bovina em explorações de pequena e média dimensão.

Enquadramento da paratuberculose nos efectivos bovinos

Em bovinos, de aptidão leiteira ou de carne, subsistem um conjunto de doenças infecciosas que têm merecido uma particular atenção por parte dos profissionais de veterinária e produtores. A infecção provocada pelo vírus da

Teixeira, P. e Simões, J. A paratuberculose bovina em explorações leiteiras de pequena e média dimensão: que opções para o veterinário assistente? PUBVET, Londrina, V. 2, N. 43, Art#412, Out5, 2008.

diarreia bovina (BVD), a leucose bovina, a paratuberculose e a neosporose, são quatro doenças infecciosas actualmente muito difundidas nas explorações bovinas.

Se as duas primeiras afecções são alvo da atenção médico veterinária, as duas últimas são, ainda, muitas vezes negligenciadas. Têm, no entanto, algumas características comuns: a infecção ocorre frequentemente ainda no útero ou enquanto jovens, o período de incubação é normalmente longo e o seu tratamento não é, actualmente, completamente eficaz.¹¹

Muitos dos animais infectados por qualquer uma destas afecções permanecem clinicamente normais durante toda a sua vida (Fig. 1), mas são portadores assintomáticos que excretam o agente infectante, contaminando o seu meio ambiente e os outros animais. Comummente, quando os sintomas se expressam, a evolução clínica culmina com a morte dos animais ou suas crias, ou no refugo precoce.¹¹



Fig. 1- Exploração de bovinos leiteiros da Região de Arouca, afectada pelo problema da paratuberculose (prospecção através do método Elisa), e onde a maioria dos animais se apresentavam aparente normais.

Nos últimos anos, tem sido dada uma importância cada vez maior à paratuberculose, coincidindo provavelmente, também com os avanços que se têm observado no controlo e erradicação das outras doenças infecto-

Teixeira, P. e Simões, J. A paratuberculose bovina em explorações leiteiras de pequena e média dimensão: que opções para o veterinário assistente? PUBVET, Londrina, V. 2, N. 43, Art#412, Out5, 2008.

contagiosas. No entanto, a paratuberculose provoca perdas directas e indirectas. Entre as mais significativas constam a redução da produção leiteira e aumenta o número de casos de mastites, perda de peso, crescimento retardado, perdas reprodutivas com aumento do intervalo entre partos, custos com tratamentos, refugo prematuro e mortalidade.^{9,14,15} Estima-se que nos EUA a paratuberculose seja responsável por perdas acima 200 milhões de dólares em explorações leiteiras.¹⁷

O Map – *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis*

O Map é um bacilo imóvel intracelular facultativo, não capsulado e que não esporula. Em técnicas laboratoriais de microscopia, pode ser identificado recorrendo à coloração de Ziehl-Neelsen, sendo portanto classificado como um microrganismo álcool-acido-resistente.²

A cultura deste bacilo em laboratório é difícil, longa e fastidiosa, nunca menor que doze semanas. O meio de cultura vulgarmente usado é o meio de Herrold.²

Uma das suas principais características é a sua enorme resistência: nos solos e nas matérias fecais pode resistir até 47 meses mantendo a sua viabilidade e capacidade reprodutiva.⁷

O Map é sensível a numerosos desinfectantes. Os mais usuais e recomendados são o formol a 5%, sulfato de cobre a 5 % e o cresol 10%. Os raios ultravioletas e o calor também destroem este microrganismo.³

A sua localização no aparelho digestivo é específica apresentando um tropismo particular para a mucosa intestinal e nódulos linfáticos mesentéricos. A patologia clínica é essencialmente provocada pela presença e multiplicação do MAP ou bacilo de John a nível da mucosa intestinal, resultando daí uma cascata de consequências que abaixo se descrevem.⁵ Raras vezes surge um caso de septicemia com localizações secundárias.

A infecção

O contágio entre animais faz-se principalmente por via horizontal directa, através do meio infectado e do contacto entre animais. As fezes dos animais infectados são o principal vector mecânico do Map e a contaminação feco-oral é a principal forma de contágio. ^{5,10}

Na maior parte das situações a infecção ocorre em animais jovens, através do colostro, leite materno ou matérias fecais. Nesta altura, o sistema imunitário dos animais é mais débil, estando sujeitos a um maior risco de infecção pela sua menor capacidade de resposta imunitária. ¹⁰

Quando a contaminação ocorre por via oral, os bacilos localizam-se inicialmente ao nível das amígdalas e das placas de Peyer do Ileo. Os bacilos, são captados pelas células M e posteriormente transportados até linfonodos pelos macrófagos. ¹⁸

A sua presença no intestino promove uma reacção imunitária excessiva ao nível da mucosa intestinal, provocada pela infiltração de milhões de células mononucleadas, originando as típicas "pregas" na mucosa intestinal, assemelhando-se a circunvalações cerebelares. Esta situação altera as normais trocas sanguíneas ao nível da mucosa e gânglios linfáticos, despoletando uma má absorção intestinal, tendo como consequência final a diarreia dos animais.

Existem animais portadores da doença que não exprimem sintomatologia, mas que excretam para o exterior o Map contagiando novos animais receptivos.

Podemos distinguir quatro tipos de animais relativamente ao estado sanitário provocado por Map. ¹⁶

- Animais não infectados;
- Animais infectados não sintomáticos e não excretores;
- Animais infectados assintomáticos e excretores de Map na matéria fecal;
- Animais infectados, excretores e com sintomatologia clínica.

A prevalência da infecção é maior nos efectivos bovinos leiteiros do que nos aleitantes/carne.

Alguns bovinos adultos podem ser infectados, mas as manifestações clínicas são ausentes ou de surgimento muito tardio. ⁵

Patologias concomitantes com a paratuberculose favorecem o agravar da sintomatologia clínica.

A forma clássica de paratuberculose bovina é caracterizada por ^{5,15}:

- Uma evolução crónica;
- Animais apresentam-se afrebris;
- Evolução da condição corporal para uma caquexia extrema (raramente vista noutras doenças);
- Uma diarreia intestinal intermitente ou contínua e não responsiva a tratamento.

A evolução da paratuberculose pode ser dividida em três fases ⁵:

- **Fase 1 - fase de incubação/descanso:** o animal pode estar magro; ter uma produção leiteira (no caso de vacas leiteiras) reduzida; o apetite do animal encontra-se normal; pode surgir diarreia intermitente, normalmente associada a fases de stresse e imunodepressão como é o caso do parto; esta fase pode ser longa e a excreção de bacilos intensa se demorar largos meses.
- **Fase 2 - fase de estado:** todos os sintomas que surgem de forma intermitente na fase 1 agravam-se; o animal apresenta uma diarreia intensa e contínua; a expulsão das fezes pode observar-se tipicamente em jacto e atingir até 1 a 2 metros de distância; a diarreia é abundante e sem nenhum odor particular; aparentemente o animal come bem ou melhor que os animais não afectados – esta voracidade é explicada pela polidipsia compensatória que se instala para compensar a fraca absorção intestinal; são perceptíveis borborismos intestinais, mesmo sem recorrer ao uso de estetoscópio; esta fase pode durar de 2 a 6 meses.

- **Fase 3 - fase terminal:** expressão máxima de todos os sintomas; a diarreia, que continua a ser o sintoma de maior relevo, esgota completamente o animal que deverá encontrar-se, por esta altura, numa caquexia extrema; o animal encontra-se anémico e a evolução é invariavelmente fatal.

Os sintomas

Os sintomas de paratuberculose surgem normalmente em animais com mais de dois anos.

A ocorrência de diarreia crónica em animais adultos é um dado importante no diagnóstico da doença. Alguns dos sinais sugestivos que nos orientam para um diagnóstico de paratuberculose em vacas leiteiras são: fêmeas com diarreia intermitente ou contínua que coincide com o pós-parto, emagrecimento progressivo, apetite normal ou até aumentado, edema submandibular e má qualidade do pêlo (Fig. 2).



Fig. 2- Vaca com diarreia crónica contínua superior a 3 meses, estado de magreza acentuada e pelagem em mau estado. O soro deste animal reagiu positivamente à pesquisa de anticorpos anti-MAP através do método Elisa.

Teixeira, P. e Simões, J. A paratuberculose bovina em explorações leiteiras de pequena e média dimensão: que opções para o veterinário assistente? PUBVET, Londrina, V. 2, N. 43, Art#412, Out5, 2008.

É a diarreia crónica não responsiva a múltiplas terapias que desperta atenção do produtor para os animais infectados. O emagrecimento progressivo surge como consequência desta diarreia profusa. A má absorção intestinal dos nutrientes, causa principal da diarreia, advém da enterite granulomatosa provocada pela doença.

Os factores de risco que promovem o despoletar da sintomatologia clínica em animais infectados são a produção intensiva, má nutrição, stresse relacionado com transporte, parto e lactação, e a imunodepressão provocada por outras doenças concomitantes.

Estima-se que, numa vacaria, por cada caso clínico diagnosticado existam 25 animais infectados assintomáticos, e destes somente 1/3 possa ser diagnosticado recorrendo a provas serológicas.¹

Animais infectados, mas assintomáticos, continuam a provocar perdas constantes na exploração. Estima-se que estes animais possam ter uma baixa na produção até 6%, podendo atingir os 16% no final da vida produtiva.¹

Entre os diagnósticos diferenciais de paratuberculose constam a salmonelose, parasitoses gastrointestinais e deficiência secundária de cobre devido ao aporte excessivo de molibdénio.¹⁵

As lesões mais evidentes à necrópsia localizam-se na parte final do intestino delgado, no início do intestino grosso e nos linfonodos mesentéricos, locais preferenciais para a localização do Map.

As provas complementares de diagnóstico

Existem várias técnicas de diagnóstico directas (identificação do agente ou partes) ou indirectas (através da reacção imunomediada humoral ou celular).

a) Diagnóstico directo

Teixeira, P. e Simões, J. A paratuberculose bovina em explorações leiteiras de pequena e média dimensão: que opções para o veterinário assistente? PUBVET, Londrina, V. 2, N. 43, Art#412, Out5, 2008.

Bacterioscopia: consiste em visualizar o Map, após a coloração de esfregaço recorrendo à técnica de Ziehl-Neelsen. É uma técnica que pode ser efectuada a partir das matérias fecais, mucosa ou gânglios mesentéricos;

Coprocultura: dentro de técnicas padronizadas, permite a identificação de colónias no meio de Herrold. Ao meio de cultura são adicionados antimicrobianos e factores de crescimento específicos para o Map; como o bacilo tem um crescimento lento e fastidioso, os resultados definitivos surgem somente ao fim de um mínimo de 16-18 semanas. A coprocultura é a técnica de eleição para diagnóstico de paratuberculose. No entanto, é necessário ter em consideração que a excreção intermitente do Map nas fezes dos animais infectados apenas permite identificar entre 25 a 50 % dos animais infectados.

13,20

PCR: consiste na pesquisa e detecção de um fragmento de ADN do Map, após uma etapa de amplificação, através da *Polimerase Chain Reaction*.

b) Diagnóstico indirecto:

Pesquisa da resposta imunitária celular (IDC): este teste, a ser efectuado no estado precoce da doença, consiste na injeção intradérmica de um extracto do Map (Johnina) no animal em causa e avaliação a reacção inflamatória: Pode, ainda, ser usado este princípio de reacção de hipersensibilidade retardada tipo IV para realizar um teste com os mesmos princípios básicos, mas, consistindo na injeção de tuberculina aviária e tuberculina bovina em dois lugares distintos do animal (intradermotuberculinização comparativa – IDC) e posterior comparação da intensidade da resposta inflamatória às duas tuberculinas: se existir uma reacção ampliada à tuberculina aviária quando comparada com a bovina, o animal pode estar infectado com Map; no entanto, esta prova carece de um grande grau de especificidade, pelo que não é muito utilizada como prova de diagnóstico de paratuberculose

Pesquisa de resposta imunitária humoral (pesquisa de anti-corpos anti-Map): a prova ELISA é das mais utilizadas para fazer o *screening* das explorações. Pode-se recorrer a amostras no leite ou no soro dos animais para a pesquisa

Teixeira, P. e Simões, J. A paratuberculose bovina em explorações leiteiras de pequena e média dimensão: que opções para o veterinário assistente? PUBVET, Londrina, V. 2, N. 43, Art#412, Out5, 2008.

de anticorpos Esta prova carece de algum grau de sensibilidade, pois nem todos os animais infectados com Map apresentam resultado positivo à prova. ¹⁹ A especificidade é considerada elevada aproximando-se dos 100%. Gomes e Col. (2005) ⁶ referem uma especificidade de 98,5% a 99,5% quando utilizada em amostras de leite.

Apesar de não apresentarem uma elevada sensibilidade na detecção de anticorpos, as técnicas serológicas têm como vantagens a rapidez de execução e o baixo custo quando comparadas à coprocultura. ⁴

Na tabela 1 encontra-se descrita a eficácia das diferentes técnicas laboratoriais.

Tabela 1: Comparação das diferentes técnicas de diagnóstico de paratuberculose.

	Cultura	PCR	Ziehl-Neelsen	IDC	Elisa
Animais infectados não excretadores	Ineficaz	Ineficaz	Ineficaz	+++	+/-
Animais excretadores assintomáticos	++/+++	++/+++	-/+	+/+++	++/+++
Animais com sintomatologia clínica	++++	++++	++++	-	++++
Especificidade	++++	++++	+/++	+/-	+++

Elaborada a partir dos dados do Rapport du group de travail relatif a la certification en la paratuberculose ¹⁹.

O controlo e a prevenção

Actualmente não existe tratamento eficaz para a paratuberculose clínica ou inaparente. De qualquer forma, a tentativa de tentar tratar um animal pode

favorecer a infecção de novos animais através da permanência deste na exploração.

Se em algumas situações possa ser recomendado o vazio sanitário das explorações, esta medida pode colocar em causa a viabilidade das explorações.

O isolamento e refugio dos animais infectados, as boas práticas de higiene e manejo terão de ser colocados como uma obrigatoriedade ao proprietário, como forma de tentar conter a disseminação da doença pela exploração.

A vacinação contra a paratuberculose encontra-se à disposição dos profissionais médico veterinários. No entanto, ela não evita novas infecções, somente diminui a expressão da sintomatologia clínica. Tem a grande desvantagem de poder provocar reacções cruzadas à prova de tuberculina, pelo que a grande maioria dos países opta, ou até mesmo não permite a vacinação contra a paratuberculose.⁷

Recomendamos como plano de acção mínimo num efectivo leiteiro, de pequena e média dimensão, onde são suspeitos animais infectados com paratuberculose e tendo em consideração a economia da exploração:

- 1- Isolamento de todos os animais com idade superior a 2 anos, afebris, que apresentem diarreia não responsiva a tratamento; e realização de prova de diagnóstico laboratorial fiável na detecção de Map;
- 2- Administração aos vitelos de um colostro de boa qualidade, de vacas saudáveis e com boas condições de higiene e manejo;
- 3- Desinfecção regular dos locais onde se encontraram estabelecidos os animais doentes e/ou em recuperação (enfermarias), bem como as maternidades;
- 4- Promoção de uma boa higiene na manjedoura;
- 5- Refugio dos animais infectados detectados.

A paratuberculose e a saúde pública

Actualmente existe a preocupação que o Map possa estar envolvido na doença de Crohn que afecta os seres humanos. No entanto, não existe uma

Teixeira, P. e Simões, J. A paratuberculose bovina em explorações leiteiras de pequena e média dimensão: que opções para o veterinário assistente? PUBVET, Londrina, V. 2, N. 43, Art#412, Out5, 2008.

concordância no meio científico sobre a veracidade desta hipótese e existe uma enorme discussão entre os que defendem a responsabilidade do Map na doença de Crohn e os que são contra esta hipótese. São necessários mais estudos de investigação para que alcance uma resposta final.

Conclusão

A paratuberculose bovina é uma afecção que causa graves perdas económicas nas explorações. Quando os índices produtivos não são atempadamente monitorizados, como ocorre em muitas das nossas pequenas e médias explorações leiteiras, as perdas tornam-se imperceptíveis para o produtor. A percentagem significativa de casos inaparentes e crónicos associada a um custo importante motivado principalmente por necessidade de diagnóstico laboratorial a todo o efectivo e refugo dos animais infectados limita ainda mais as decisões de produtores. O veterinário assistente assume uma responsabilidade acrescida na decisão da limitação dessas perdas instaurando um programa de controlo da doença com objectivo da sua erradicação senão a curto então a médio prazo.

Referências bibliográficas

1. Abalos, P., 2001. Actualidad en paratuberculosis. TECNO VET, 7(3). http://www.tecnovet.uchile.cl/CDA/tecnovet_articulo/0,1409,SCID%253D9583%2526I SID%253D467,00.html, acedido em Novembro de 2007.
2. Ayele, W.Y., Svastova, P., Roubal, P., Bartos, M., Pavlik, I., 2005. Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis cultured from locally and commercially pasteurized cow's milk in the Czech Republic. Applied and Environmental Microbiology, **71**, 1210-1214.
3. Bannantine, J.P., Baechler, E. Zhang Q., Li. L.L., Kapur, V., 2002. Genome scale comparison of Mycobacterium Avium subsp. paratuberculosis with Mycobacterium avium subsp. avium reveals potential diagnostic sequences. J. Clin. Microbiol., **40**, 1303-1310.
4. Collins, M.T., 1996. Diagnosis of paratuberculosis. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract., **12**, 357-371.
5. Douart, A., 2002. Quelques donnés scientifiques sur la paratuberculose. Rapport du group de travail relatif a la certification en la paratuberculose. [http://www.gds38.asso.fr/Web/gds.nsf/8cb279f7ace047aac1256c0f004cf0d5/75564e50dc0540c6c1256b37005d83ec/\\$FILE/ACERSA%20rapport%20paratuberculose.pdf](http://www.gds38.asso.fr/Web/gds.nsf/8cb279f7ace047aac1256c0f004cf0d5/75564e50dc0540c6c1256b37005d83ec/$FILE/ACERSA%20rapport%20paratuberculose.pdf), acedido em Outubro de 2007.
6. Gomes, C., Afonso, C., Madeira, H., Barbosa, A., Sousa, J., Pereira, A., Niza Ribeiro, J., 2005. Estudo de seroprevalência da paratuberculose entre no Entre Douro e Minho. Ver. Port. Ciên. Vet., **Supl. 129-130**, 5 (abstract).

Teixeira, P. e Simões, J. A paratuberculose bovina em explorações leiteiras de pequena e média dimensão: que opções para o veterinário assistente? PUBVET, Londrina, V. 2, N. 43, Art#412, Out5, 2008.

7. Huntley, J.F., Stabel, J.R. Paustian, M.L., Reinhardt, T.A., Bannantine, J.P., 2005. Expression library immunization confers protection against Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection. *Infect. Immun.*, **73**, 6877-6884.
8. Johne, H.A., Frothingham, L., 1895. Ein eigenthuemlicher Fall von Tuberculosis beim Rind. *Deutsche Zeitschrift Fur Tiermedizinische und Vergleichende Pathologie*, 21, 438-454 citado por *Microbiologia Clínica LABACVET 2007*. <http://www.ufrgs.br/labacvet/pdf/mycobacterium.pdf>, acedido em Dezembro de 2007.
9. Johnson-Ifearulundu, Y., Kaneene, J.B., 1999. Distribution and environmental risk factors for paratuberculosis in dairy cattle herds in Michigan. *Am. J. Vet. Res.*, **60**, 589-596.
10. Larsen, A.B., Merkal, R.S., Cutlip, R.C., 1975. Age of cattle as related to resistance to infection with Mycobacterium paratuberculosis. *Am. J. Vet. Res.*, **36**, 255-257.
11. Leeuwen, J.V., 2004. Impacts and Control of Insidious Infectious Diseases – Beat Them Before They Beat You and Your Clients. *Proceedings of 23rd World Buiatrics Congress*. July 11-16, 2004, Québec, Canada. <http://www.ivis.org/proceedings/wbc/wbc2004/toc.htm>, acedido em Novembro de 2007.
12. Marassi, C.D., Fonseca, L.S., Ristow, P., Ferreira, R., Lilenbaum, W., Oelemann, W.M.R., 2005. Improvement of an in-house elisa for bovine paratuberculosis serology in brazil. *Braz. J. Microbiol.*, **36**, 118-122.
13. Nielsen, S.S., Gronbaek C., 2002. Maximum-likelihood estimation of sensitivity and specificity of ELISAs and faecal culture for diagnosis of paratuberculosis. *Prev. Vet. Med.*, **53**, 191-204.
14. Ott, S.L., Wells, S.J., Wagner, B.A., 1999. Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. *Prev. Vet. Med.*, **40**, 179-192.
15. Radostis, O.M., Gay, C.C., Blodd, D.C., Hinchcliff, K.W., 2000. *Veterinary medicine*, nine edition, W.B. Saunders, London.
16. Schelcher, F., Espinasse, J., 1990. Pathogénie de la paratuberculose bovine dans Actualités 90 en buiatrie. *Société française de buiatrie Editeur*, 74-82.
17. Stabel, J.R., 2006. Paratuberculosis: an update. *Proceedings of 24th World Buiatrics Congress*. October 15-19, 2006, Nice, France. p. 1-8.
18. Sweeney, R. W., 1996. Transmission of paratuberculosis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, **12**, 305-312.
19. Vialard, J., Thorel, M.F., 2002. Diagnostic et despistage de la paratuberculose bovine, Rapport du group de travail relatif a la certification en la paratuberculose. [http://www.gds38.asso.fr/Web/gds.nsf/8cb279f7ace047aac1256c0f004cf0d5/75564e50dc0540c6c1256b37005d83ec/\\$FILE/ACERSA%20rapport%20paratuberculose.pdf](http://www.gds38.asso.fr/Web/gds.nsf/8cb279f7ace047aac1256c0f004cf0d5/75564e50dc0540c6c1256b37005d83ec/$FILE/ACERSA%20rapport%20paratuberculose.pdf), acedido em Outubro de 2007.
20. Whitlock, R.H., Wells, S.J., Sweeney R.W., Van Tiem, J., 2000. ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. *Vet. Microbiol.*, **77**, 387-398.