

INFECCIÓN POR *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* EN UN REBAÑO CRIOLLO LIMONERO

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* Infection in a Criollo Limonero Herd

Alfredo Sánchez-Villalobos¹, Naillet Arráiz-Rodríguez², Luis Becerra-Ramírez³, Nelba Faria⁴, Merilio Montero-Urdaneta^{1,5}, Ana Oviedo-Bustos⁶, Sunny A. Zambrano-Nava⁵, Julio Boscán-Ocando¹, Gladys Molero-Saras⁵ y Disney Pino-Ramírez¹

¹ Unidad de Investigaciones Clínicas, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia. E-mail: saucow33@cantv.net.

² Centro de Investigaciones Endocrino-Metabólicas "Dr. Félix Gómez", Sección de Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia. ³ Policlínica Veterinaria Universitaria, Sección de Grandes Animales, Universidad del Zulia.

⁴ Programa Regional de Control de Tuberculosis, Laboratorio de Tuberculosis, Hospital Universitario de Maracaibo.

⁵ Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. ⁶ Instituto Nacional de Salud Agrícola Integral, estado Zulia.

RESUMEN

El objetivo de este estudio consistió en definir, analizar y evaluar la situación de un rebaño Criollo Limonero elite en relación a la paratuberculosis bovina. La investigación se llevó a cabo utilizando las variables epidemiológicas y el análisis de muestras (leche y suero) mediante inmunoensayo enzimático (ELISA) comercial. Posteriormente, se tomaron como base estos resultados y utilizando otras herramientas diagnósticas como la exploración clínica, tinción directa, cultivos, identificación mediante ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y estudio histomorfológico, todas ellas dirigidas a confirmar el estado de la infección. Los resultados permiten aseverar la existencia de infección por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAsP) en tasas de positividad variable. La técnica de ELISA mostró alta capacidad en la identificación de animales subclínicamente afectados, lo que demuestra su potencial como prueba primaria de diagnóstico en el establecimiento de futuros programas de control. La técnica de amplificación por PCR reveló la presencia de genoma de subespecies de *Mycobacterium avium*, lo cual apoya fuertemente la presunción de infección en estos animales por MAsP, pese a la imposibilidad de lograr claras evidencias clínicas, clinicopatológicas, microbiológicas e histopatológicas que permitieran corroborar este dictamen. La estrecha correlación entre los resultados de ELISA y PCR, ratifica no sólo la confirmación diagnóstica, sino también validan los datos obtenidos a través de la prueba serológica.

Palabras clave: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, enfermedad de johne, criollo limonero, técnica de inmunoensayo enzimático, reacción en cadena de la polimerasa.

ABSTRACT

The purpose of this research was to define, analyze and evaluate the situation of an elite Criollo Limonero herd related to bovine paratuberculosis. The investigation was carried out using the epidemiological variables and samples analysis (milk and serum) through a commercial enzyme immunoassay (ELISA). The results of the above test were taken as a foundation to use other diagnostic tools, such as clinical examination, direct staining, bacterial culture, identification through polymerase chain reaction (PCR) and histopathologic studies, to find out the status of the disease. The results allowed asserting the infection by the presence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAsP) in positive variable rates. The ELISA technique showed high capacity in identification of the sub clinical affected animal, which proved its potential as a diagnostic primary test in the establishment of future control programs. The PCR amplification revealed *Mycobacterium avium* subspecies genome presence, which lead to predict these animals infection by MAsP, in spite of the impossibility to accomplish clear clinical, clinic pathologic, microbiologic and histopathologic evidences that allowed corroborating the diagnosis. The narrow relation between ELISA and PCR results ratified not only the diagnostic confirmation, but also they validated the data collected through the serological test.

Key words: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, Johne's disease, criollo limonero breed, enzyme immunoassay, polymerase chain reaction.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Johne o paratuberculosis es una enfermedad infecciosa crónica que afecta a rumiantes domésticos y

silvestres, aunque también ha sido descrita en conejos (*Oryctolagus cuniculus*) y algunos carnívoros, primates, incluso el hombre, donde parece jugar importante relación con un mal crónico autoinmune, la enfermedad de Crohn [6, 20, 24, 35, 36]. Es provocada por un bacilo, el *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MASP), una micobacteria que tiene como vía principal de transmisión la fecal/oral, pero también lo hace a través del útero y la leche de vacas (*Bos taurus-indicus*) infectadas [20, 36]. De curso fatal, provoca estados de caquexia y diarrea, tras una prolongada fase asintomática [11, 19, 20, 36]. También ha sido documentado un descenso en la producción láctea que va del 5 al 25% en los estadios tempranos, y acortamiento de la vida productiva media [4, 11, 27]. Su tratamiento resulta ineficaz y económicamente inviable [16, 19, 36].

Su ocurrencia es mundial con tasas de prevalencia que oscilan entre un 7% y un 55% en Europa [10]; 40% en los Estados Unidos de América, donde la tasa de positividad guarda una estrecha correlación con el tamaño del rebaño [11]. En Australia, las tasas de infección declarada fluctúan entre un 9 y un 22% [14, 23]. Latinoamérica no escapa a la problemática, aunque no dispone de caracterización epidemiológica, cifras oficiales, ni programas de control [9]. Sin embargo, algunas investigaciones basadas en la técnica de inmunoensayo enzimático (ELISA, por sus siglas en inglés) revelan tasas de positividad elevadas [9, 32]. En Argentina, 18,8% en fincas lecheras y 6,8% de hatos de carne [5]; en Río de Janeiro (Brasil) se revela 32,9% de rebaños positivos [31]; Chile carece de antecedentes oficiales, pero es posible sospechar que existe un elevado porcentaje de rebaños infectados, especialmente en los lecheros [32]. En Guanajuato, México, se encontró un 28,7% de explotaciones con animales positivos [9]. En los llanos de Monagas en Venezuela se reportó un 72,1% de rebaños infectados [1].

En varios países desarrollados se invierte mucho dinero y esfuerzo en la puesta en práctica de programas de control, certificación de rebaños y evaluación de los progresos [8, 23, 40, 41]. Estos proyectos se fundamentan en la detección de anticuerpos contra MASP mediante ELISA, la cual ha sido reconocida como la herramienta diagnóstica de mayor impacto en muchas regiones y esquemas del control contra la paratuberculosis [3, 8, 15, 25, 34, 40], ya que el diagnóstico directo a través del cultivo y aislamiento del germen no resulta un método confiable [6, 17, 32], por ser una bacteria nutricionalmente exigente y de crecimiento lento, requiriendo generalmente más de 12 semanas para obtener colonias visibles [32].

Dos son las dificultades principales que enfrenta el aislamiento del agente: la contaminación de los medios de cultivo por el largo período de incubación, especialmente con hongos, y la baja concentración del agente [17, 32]. En virtud que el estado silente o asintomático prevalece, y que la excreción del agente por las heces es intermitente y -se asume- en escaso número, la detección a través del cultivo bacteriológico se dificulta, lo cual pudiese explicar un resultado negativo. Al respecto, Soto y col. [32] indicaron que el cultivo fecal sólo detecta

animales infectados que excretan más de 100 ufc de MASP/g de heces y, concluye que, los animales infectados subclínicamente están por debajo de este nivel de excreción.

El propósito de este estudio se centró en definir, analizar y evaluar la situación de la enfermedad en un rebaño Criollo Limonero elite, tomando como base los resultados de un inmunoensayo enzimático (ELISA) comercial y el apoyo de otras herramientas diagnósticas (estudio epidemiológico, exploración clínica, tinción directa, cultivos, identificación mediante ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y estudio histomorfológico), dado que el estatus actual frente a la paratuberculosis se desconoce.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área geográfica: El ensayo se realizó en la Estación Local Carrasquero LARAL-INIA, ubicada en el Sector Playa Bonita del municipio Mara, estado Zulia, Venezuela. Esta región se describe agro-ecológicamente como bosque seco tropical [22].

Unidades experimentales: A objeto de lograr una visualización amplia del problema, se incluyó a la totalidad de hembras bovinas, toros y toretes destinados a actividades reproductivas con edad igual o superior a 36 meses. La investigación se llevó a cabo en dos etapas. En la primera se consideraron las variables epidemiológicas y el análisis de muestras (leche y suero) mediante un ELISA comercial. La segunda, incluyó la aplicación y estudio del resto de las herramientas diagnósticas, exclusivamente sobre los animales identificados como "positivos" al inmunoensayo.

Primera etapa: Encuesta epidemiológica: La encuesta epidemiológica [2] recogió aspectos generales y específicos relacionados con la toma de decisiones, manejo de pastos, forrajes y alimentación suplementaria, manejo animal, sanidad animal, datos referidos a zona agroecológica, estructura poblacional, carga animal, densidad animal, sistema de manejo de la explotación, fuentes de agua, drenaje y destino de la producción. Esta información se complementó con datos climáticos como temperatura, precipitación, humedad relativa, evaporación e insolación con la finalidad de evaluar la posible asociación de estos factores con la presencia de la enfermedad, buscando incluir todos los aspectos que definían el funcionamiento de la finca. Posteriormente, se recogieron de forma amplia los antecedentes (anamnesis) sobre la enfermedad [30].

Muestreo de sangre y leche: Al grupo de vacas en ordeño se les practicó un muestreo simultáneo de leche y sangre. El muestreo de leche incluyó 77 muestras individuales. Veinte (20) mL de leche de cada vaca se recolectó tras el ordeño completo de los cuartos de cada ubre, en envases estériles con tapa. Todas las muestras, previa identificación, se conservaron refrigeradas (LG, GM-T563QC, EUA) a 5°C hasta arribar al laboratorio, donde fueron centrifugadas (Clay Adams, Serofuge 2002, EUA) 10 minutos a 2.000 g para extraer la fase lipídica. Finalmente, se preservaron en congelación

(Whirlpool®, 7EV070FXRQ, EUA) a -20°C. La sangre (8 a 10 mL) se obtuvo por punción de la vena yugular, en tubos Vacutainer® sin anticoagulante. Estos se dejaron en reposo en una gradilla inclinada, bajo sombra, a temperatura ambiente, hasta la retracción del coágulo, y sometidas dos horas después a centrifugación a 1.500 g durante 10 minutos, separando de esa forma 207 sueros.

ELISA: Todas las muestras de leche y suero sanguíneo fueron probadas por duplicado en un kit comercial de ELISA para suero, plasma y leche (Institut Pourquier, POURQUIER® Elisa Paratuberculosis Antibody Screening, Francia), basado en el principio de proveer el antígeno del *M. paratuberculosis* revestido a pocillos de microplacas de poliestireno y eliminar las reacciones cruzadas de las muestras a ensayar diluyéndolas e incubándolas en un buffer dilutor que contiene un extracto de *M. phlei*.

Siguiendo las instrucciones del fabricante Institut Pourquier, se realizó la absorción de las muestras por *M. phlei*, diluyéndolas a una concentración de 1:20 para controles y sueros y 1:2 para las muestras de leche e incubándolas a temperatura del laboratorio (21°C) por 15 min. Luego se transfirieron a las microplacas de poliestireno de 96 pocillos revestidos del antígeno del *M. paratuberculosis*, a razón de 100 µL de controles, sueros y muestras de leche prediluidos en los pocillos correspondientes. Seguidamente fueron incubadas por 45 min. a temperatura del laboratorio (21°C) y se lavaron tres veces con solución de buffer. En el caso de leche, esta solución se dejó actuar por 2 minutos cada vez. Seguidamente, se agregó 100 µL de conjugado (diluido 1:100) por pozo, se incubaron por 30 minutos y lavaron, tal como se describió anteriormente y se adicionó 100 µL de solución revelado. Transcurridos 10 minutos, se detuvo la reacción adicionando 100 µL de solución de frenado [3, 12, 15, 25, 34, 37, 39]. La lectura se realizó a 450 nm en un espectrofotómetro Elx 800 (Bio-Tek Instruments®, EUA).

Los valores de densidad óptica de los controles y las muestras fueron promediados. La prueba se consideró válida cuando el valor promedio de densidad óptica (vpDO) del control de referencia positivo fue mayor de 0,35 y se acompañó de un cociente del vpDO control positivo entre el vpDO control negativo mayor o igual a 3. El resultado de las muestras fue expresado como porcentaje S/P, calculado por Gumber y col. [12] y Van Weering y col. [37]:

$$100 - \frac{((vpODm) - (vpODcn))}{(vpODcp) - (vpODcn)}$$

Donde *vp*= valor promedio; *OD*= densidad óptica; *m*= muestra; *cp*= control positivo y *cn*= control negativo.

Los puntos de corte se establecieron según lo recomendado por el fabricante: suero sanguíneo: muestras negativas <60% S/P; 60-70% S/P ambiguos; y, positivos >70% S/P. Para leche, las muestras negativas <30% S/P, 30-40% S/P ambi-

guos, y positivo >40% S/P. De acuerdo con la recomendación de la empresa productora del kit, debe considerarse "infectado" a todo animal que resulte con un porcentaje S/P por encima del punto de corte [12]. Ello se basa en la capacidad del ensayo de detectar inmunidad humoral, o sea, anticuerpos circulantes contra *MAsP* con una sensibilidad absoluta entre 40,8 a 66% y una especificidad de 99 a 99,8% en comparación con el cultivo de materia fecal [7, 38].

Segunda etapa: Una vez conocidos los resultados de la ELISA se procedió a la exploración clínica de los animales positivos, muestreo de heces, toma de biopsia rectal y aplicación de técnicas diagnósticas.

Evaluación clínica: Se realizó una evaluación clínica de rutina siguiendo los parámetros descritos por Pino [30]. Se hizo hincapié en determinar los signos vitales, la condición corporal y el estudio pormenorizado del aparato digestivo.

Toma de muestras: Las heces se alcanzaron directamente del recto de cada animal, mediante guante desechable de uso ginecológico que luego fue cerrado y mantenido a 4°C hasta su procesamiento. Inmediatamente, se recolectó nueva muestra de sangre venosa periférica mediante punción coccígea en tubo de ensayo con EDTA; y se efectuó un raspado de la mucosa rectal, siguiendo las pautas establecidas por Meléndez [21], el material se transportó en tubos estériles conteniendo agua destilada estéril y en viales contentivos de solución buffer estándar. Las biopsias rectales fueron colectadas con el auxilio de palpación rectal y la utilización de una pinza de 60 cm de longitud, previamente esterilizada, lo cual permitió el pellizcamiento de la mucosa; estas fueron conservadas en viales con solución buffer estándar y en solución de formalina al 10%.

Técnicas diagnósticas: 1. Baciloscopia y tinción directa de Ziehl-Nielsen: alícuotas de los raspados de mucosa y biopsia rectal fueron extendidos en portaobjetos para realizar la coloración de Ziehl Nielsen, que identifica la presencia cualitativa de bacilos ácido alcohol resistentes, no formadores de esporas inmóviles y no encapsulados, características del género *Mycobacterium* [17, 32]. La observación de 50 campos de cada frotis mediante microscopio de luz (Quimis, Q708S4, Brasil) a bajo aumento, permitió una perspectiva preliminar.

2. Hematología completa: las muestras de sangre de los animales problemas fueron sometidas a un estudio hematológico completo, que incluyó conteo de células blancas y diferencial.

3. Cultivo: Para el aislamiento de *MAsP* a partir de los raspados y biopsias rectales se utilizó el medio de Herrold con yema de huevo (sin micobactina, con micobactina, con micobactina - piruvato y con micobactina con agregado de antibióticos), en tubos de agar inclinado con tapa rosca [7, 32, 42]. Previo a la siembra, cada muestra fue descontaminada a través de la técnica de Petroff [17, 32]. Se realizó la visualización de los tubos a los 30; 60 y 120 días, esperando el crecimiento de colonias características [7, 17, 32, 33, 42]. Vistos los antecedentes respecto a las dificultades para el cultivo y aislamiento

to del agente, la misma no fue intentada a partir de las muestras de heces, dado el conocimiento previo que dicha técnica resulta prácticamente inviable para el diagnóstico de la enfermedad [17, 32].

4. Identificación del *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* mediante ensayo de PCR: Las muestras obtenidas de los animales (biopsia rectal, raspado de mucosa rectal y heces) se trasladaron en 1 mL de buffer fosfato salino (0,12 M NaCl, 0,01M Na₂HPO₄, 5 mM KH₂ PO₄ pH 7,5) al laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigaciones Endocrino-Metabólicas "Dr. Félix Gómez" de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia, para su procesamiento. Las muestras se refrigeraron a 4°C y fueron procesadas dentro de los tres primeros días.

Extracción y purificación de ADN genómico:

Para la extracción de ADN a partir de los tejidos (raspado de mucosa y biopsia) se siguió el procedimiento descrito por Bull y col. [6] con algunas modificaciones. Los tubos conteniendo el tejido se centrifugaron a 10.000 g por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 1 mL de buffer de lisis (10 mM Tris Hcl pH 8,0; 2 mM EDTA y 400 mM NaCl, 1% SDS y 100 g/mL de proteinasa K). Se incubó durante 6 horas. Se hizo extracción con fenol y luego con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Se recuperó la fase acuosa, (aproximadamente 800 µL), se agregó 160 µL de acetato de amonio 10 M y 2 Vol. de etanol 100% (frío) y se dejó precipitar el ADN a temperatura ambiente durante 1 hora. Se centrifugó a 10.000 g por 30 minutos y se hizo un lavado con etanol 70%. El ADN se resuspendió en 50 µL de buffer TE (10 mM Tris-HCl, pH 8, 1mM EDTA, pH 8). Se utilizó 5 µL de muestra para ensayos de amplificación.

Para la extracción de ADN a partir de las muestras de heces, se tomó aproximadamente 1 g de las excretas y se transfirió a un tubo de 15 mL, se agitó enérgicamente con vortex (Gemmy, modelo vm-300. Gemmy inc., EUA) en 10 mL de agua destilada estéril y se dejó sedimentar 1 hora. Se recuperó el sobrenadante en otro tubo y se centrifugó a 6.000 g por 10 minutos. El sedimento se resuspendió en 1 mL de buffer de lisis descrito antes, pero la concentración de proteinasa K utilizada fue de 50 µg/mL [6, 29, 43]. Se siguió el mismo procedimiento descrito antes para el procesamiento de tejidos, pero se hizo una extracción adicional con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) [6].

Ensayos de amplificación por PCR:

Para las reacciones de amplificación, se preparó la mezcla de reacción para un volumen final de 50 µL, consistiendo en 10 µL de buffer Go taq flexi DNA polimerasa (Promega), 1,5 mM MgCl₂, 200 µM cada desoxirribonucleótido (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 20 pmoles de cada oligonucleótido. Se utilizó 1,25 U de Go Taq flexi DNA polimerasa para cada reacción (Promega). Se utilizaron oligonucleótidos MacF (5'-CCCTGA-

GACAACACTCGGTC-3') y MacR (5'-ATTACACATTTTCGATGAACGC-3') dirigidos a regiones espaciadoras transcritas internas entre los genes 16S y 23S rRNA específicas de micobacterias del complejo *Mycobacterium avium-intracellulare*, descritas por Park y col. [29]. El tamaño esperado del producto de PCR es de 144 pb.

El programa de amplificación consistió en 8 minutos a 95°C y 30 ciclos de amplificación de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 60°C, 1 minuto a 72°C y un paso final de amplificación a 72°C por 8 minutos. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador (MJ Research PTC-100, EUA). Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa en cámaras horizontales (BIORAD). La concentración de agarosa utilizada fue de 2% y se utilizó buffer TBE para la corrida electroforética (Tris-Borato 89mM, EDTA 2mM pH 8,0). La corrida se llevó a cabo a 40 v/cm por 1-3 horas. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio, visualizados en transiluminador ultravioleta y fotografiados con sistema de fotodocumentación DigiDoc UVP. Como control positivo de amplificación se utilizó ADN extraído de colonias de *M. avium* identificadas fenotípicamente en el laboratorio de Referencia de Diagnóstico de Tuberculosis, con sede en el Servicio Autónomo del Hospital Universitario de Maracaibo. Como control negativo de amplificación se utilizó ADN genómico de *Escherichia coli* [6, 9, 29, 43].

5. Biopsia y estudio histopatológico: Una vez culminada la recolección de muestras se procedió a aplicar eutanasia al animal identificado con mayor porcentaje S/P y a efectuar la necropsia de campo respectiva [10], evaluando y tomando muestras de órganos y tejidos. Las lesiones fueron fotografiadas, recolectadas las muestras y fijadas en formalina al 10% para ser procesadas por técnicas rutinarias histopatológicas en un servicio de anatomía patológica privado, realizando coloraciones de Hematoxilina – Eosina (HE) y Fite-Faraco (FF) [10]. Las secciones histológicas de HE fueron estudiadas para constatar la presencia de elementos anatómicos relacionados con el estudio. Las secciones FF fueron examinadas para determinar la presencia o ausencia del *Mycobacterium* en las muestras provenientes de intestino delgado y grueso.

Análisis estadístico: Las informaciones procedentes de la investigación se organizaron, analizaron y presentaron mediante elementos de estadística descriptiva [2].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Primera etapa: estudio epidemiológico y antecedentes: los resultados de la encuesta epidemiológica y la anamnesis se detallan en la TABLA I. En las mismas no se revelan evidencias que puedan asociarse directamente con la prevalencia de paratuberculosis, tampoco se encontraron antecedentes del problema. Las condiciones ambientales y de manejo de la explotación parecen favorecer -en parte- la persistencia del agente infeccioso. Así, se conoce que el *Micobacterium* puede sobrevivir por meses en el agua, en el suelo y en las

TABLA I
RESULTADOS DEL ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO E INDAGACIÓN DE ANTECEDENTES/
EPIDEMIOLOGIC STUDY RESULTS AND RESEARCH BACKGROUND

Antecedentes	Evidencias inexistentes
Condiciones ambientales	Bosque seco tropical, con una pluviosidad 920 mm /año y humedad relativa del 76% (mínima 67 y máxima 91), temperatura 27,4°C (mínima 19,7 y máxima 35,2°C) con suelos inundables de origen aluvial.
Manejo de la explotación	La explotación ganadera hoy es de tipo semiextensiva, pero la cría y levante de reemplazos estuvo caracterizado -durante varias décadas- por un manejo intensivo, artificial y confinamiento. En las zonas cercanas al río, los potreros están bajo riego y sembrados con Pará (<i>Brachiaria mítica</i>), Alemán (<i>Echinochloa polystachya</i>) y Guinea (<i>Panicum maximum</i>) en asociaciones con leguminosas nativas; mientras que en las áreas sin riego, los potreros están constituidos por Guinea y es muy común el ramoneo de ciertos arbustos naturales.
Manejo de los animales	La alimentación de los animales se fundamenta en pastoreo diurno sobre potreros de pasto Alemán (<i>Echinochloa polystachya</i>). Por las noches son confinadas, como medida de protección contra el abigeato, con raciones de pasto fresco cortado más suplemento mineral. El ordeño se realiza sin la presencia del becerro y suplemento de dos kilos de alimento concentrado comercial. El plan sanitario incluye la aplicación de vacunas contra: brucelosis, leptospirosis, manhemiosis, clostridiosis, rabia, fiebre aftosa, rinotraqueitis infecciosa bovina y diarrea viral bovina. Se implementan, además, planes de control de ecto, endo y hemoparásitos. Dos veces al año se realizan pruebas diagnósticas para brucelosis y leptospirosis.

heces, persistiendo en los pastizales por largo tiempo sin multiplicarse, pero con posibilidad de ser infectivo hasta por un año [14, 20, 23, 36]. Por el contrario, se ha demostrado susceptible a la luz solar y al secado, al pH alcalino y a un alto contenido de calcio en el suelo [11, 16, 23], condiciones estas que pudiesen explicar la reducción de la sobrevivencia de micobacterias en el pasto.

También se ha comprobado que la prevalencia de casos y la severidad de los signos clínicos parecen tener relación estrecha con la acidez del suelo, revelándose mayor incidencia en rebaños levantados en ese tipo de suelos [4, 19, 36]. De esa forma, entre los factores de riesgo asociados a la enfermedad se describen [4, 11, 16, 19, 26]: cría intensiva, estabulación o semiestabulación con contaminación ambiental con orina y heces, suelos ácidos, mal nutrición energético proteica, infección con el virus de la diarrea viral bovina y estrés. Todos esos elementos parecen coexistir o formaron parte -en algunos episodios- del manejo rutinario de la finca.

De igual forma ha sido descrita susceptibilidad racial entre algunas ramas genealógicas europeas y se ha sugerido una aparente relación entre líneas consanguíneas, razas e incluso familias con la presencia de la enfermedad [20]. Al respecto, cabe destacar que tres de los cuatro animales infectados pertenecen a la familia "Joaquín Reina", que constituye la base genética del 23% del rebaño en estudio. Este resultado no es significativo desde el punto de vista estadístico, pero abre espacio hacia una duda razonable, que debe ser investigada en el futuro.

Ocurrencia en leche y suero sanguíneos: los datos concernientes al ELISA-i realizado sobre las muestras de leche y suero sanguíneo se reflejan en la TABLA II. Hubo cuatro

animales infectados (positivos), todas hembras. Dos de ellas en fase de producción láctea y otras dos secas. Las vacas identificadas a partir de muestras de leche, también resultaron positivas en suero sanguíneo. Los resultados numéricos comparativos leche/suero fueron siempre de mayor expresión en leche, especialmente entre los animales identificados como infectados, lo cual pudiese sugerir concentración primaria de anticuerpos en este tipo de secreción. Aspecto que ha sido propuesto por otros investigadores [13, 15, 18].

Otros autores han reportado una especificidad de este ELISA en muestras de leche individuales de 99,8% con un punto de corte de 20% S/P, claramente más bajo que el punto de corte definido por el fabricante y una sensibilidad relativa de 87% a un punto de corte de 20% S/P, 80% para el punto de corte de 30% S/P en muestras individuales de leche, y >90% en muestras de suero [37]. Estos valores han permitido considerar a esta técnica, como una de las pruebas con mayor seguridad en el diagnóstico de la enfermedad, siendo capaz de detectar, incluso, animales que presentan infección subclínica, lo cual ha sido confirmado por varios autores [3, 15, 25, 34, 39], y se ratifica en este estudio.

Segunda etapa:

Evaluación clínica: La TABLA III resume la información obtenida tras la exploración de los animales positivos a ELISA-i. No fue posible relacionar directamente los escasos síntomas encontrados en los animales problema con la posible presencia de paratuberculosis. Ello se debe a dos razones fundamentales: por un lado, los signos identificados responden a síndromes generales comunes a múltiples enfermedades, lo que impide interpretaciones certeras; y, por el otro, a la larga fase asintomática que caracteriza a la enfermedad.

TABLA II
RESULTADOS DE ELISA-i EN MUESTRAS DE LECHE
Y SUERO SANGUÍNEO/ ELISA-i RESULTS IN MILK SAMPLES
AND BLOOD SERUM

	Suero Sanguíneo		Leche	
	Negativos	Positivos	Negativos	Positivos
	204	3	74	3
Identificación				
Animales	8129, 114, 5114		237, 8129, 108	
Porcentaje				
Positividad	1,45%		5,19%	

Dado ese frecuente carácter subclínico [11, 20, 26], no es raro que la sospecha del desmejoramiento continuo de los animales se asocie a otros problemas sanitarios y se ignore la posible ocurrencia de paratuberculosis. A pesar de que la infección se adquiere dentro de los primeros meses de vida, a través de la leche y/o pastos contaminados, los signos clínicos se manifestarán 2 a 5 años más tarde [36], representados por una enteritis granulomatosa infecciosa específica. La enfermedad se exterioriza mediante diarreas persistentes o recurrentes, que no responden a los tratamientos. Todo ello apunta a sugerir, dado que estos síntomas no pudieron verificarse, que los animales en estudio, positivos a ELISA-i, se encontraban probablemente en fase silente.

Análisis clinicopatológico: En la TABLA IV se detallan los hallazgos hematológicos de las tres vacas investigadas. Destacan algunos indicios de anemia normocítica – normocrómica, en especial en las vacas identificadas con mayor por-

centaje S/P. Sin embargo, se trata de un síndrome general, relacionado con la enfermedad, pero insuficiente para sustentar una sospecha científica de paratuberculosis. La detección de neutrofilia se relaciona a procesos infecciosos de origen bacteriano, pero no necesariamente con MASP. El incremento de las proteínas totales en sangre se relacionó directamente con el estado de deshidratación de los animales, y no con la enfermedad clínica. Al respecto, varios investigadores [7, 38] refieren que los métodos clínico-patológicos no son de ayuda diagnóstica durante la fase silente de la enfermedad, y que sólo en aquellos animales con signos clínicos manifiestos por un tiempo prolongado, es posible establecer relación directa entre los analitos del laboratorio y la enfermedad.

Baciloscopia, tinción directa y cultivo: Los repetidos esfuerzos de visualización, cultivo y aislamiento de MASP a partir de las muestras biológicas recolectadas de los bovinos positivos a ELISA-i resultaron infructuosos. La mayoría de las pruebas resultaron contaminadas durante diferentes fases del proceso, y sólo una, correspondiente a alícuota de la biopsia rectal de uno de los animales finalizó el procedimiento, pero con un resultado incompatible con lo esperado.

Estudios anatomopatológicos: La TABLA V sintetiza por separado los hallazgos macro (FIGS. 1 y 2), y microscópicos (FIGS. 3 y 4). La conjugación de estas lesiones permitió emitir un diagnóstico histopatológico de enteritis y colitis crónica difusa moderada. Pero, esa misma caracterización resulta insuficiente para relacionarse en forma directa con paratuberculosis, al no observarse formación de granulomas, necrosis con caseificación y/o calcificación de nódulos y vasos linfáticos, ni células gigantes multinucleadas. Incluso la coloración

TABLA III
RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN CLÍNICA DE LAS VACAS POSITIVAS A ELISA-i /
CLINICAL EVALUATION RESULT OF POSITIVES COWS TO ELISA-i

Evaluación	Definiciones
Estado general y signos vitales	Baja condición corporal, pérdida progresiva de peso con apetito normal, pelo hirsuto, mucosas ligeramente pálidas, signos vitales normales sin demostración de episodios de fiebre. Deshidratación leve a moderada.
Digestivo	Heces blandas de color verde olivo. Sin otras lesiones aparentes.
Otros sistemas y aparatos	Fertilidad comprometida. Sin otras lesiones aparentes.

TABLA IV
HALLAZGOS HEMATOLÓGICOS DE LOS ANIMALES POSITIVOS A ELISA-i /
HEMATOLOGIC FINDINGS OF ANIMALS POSITIVES TO ELISA-i

	Vaca 8129	Vaca 114	Vaca 5114
Hematocrito (%)	25 ↓	29 ↓	32 ↔
Glóbulos blancos (mm ³)	6450 ↔	3450 ↓	7150 ↔
Proteínas totales (g/dl)	8,5 ↑	9,2 ↑	8,6 ↑
Diferencial blanco	Predominio de neutrofilos segmentados (47%)		Linfocitos (59%).
Observaciones	No se observaron Hemotrópicos		

Las fechas indican el estado de la medición respecto a los índices referenciales del laboratorio.

TABLA V
ESTUDIOS ANATOMO PATOLÓGICOS/ ANATOMO-PATHOLOGIC STUDIES

Evalución	Características
Macroscópicos	Emaciación, edema del tejido adiposo y atrofia de las masas musculares. Edema en la serosa intestinal y aumento de volumen, palidez, edematización y plegamiento (rugosidad) de la mucosa del íleon terminal y válvula ileocecal, con lesión mínima del ciego, colon proximal y nódulos linfáticos mesentéricos e ileocecales.
Microscópicos	A nivel de intestino delgado y grueso se corroboró un corion con abundante infiltración por linfocitos, macrófagos y escasos plasmocitos y eosinófilos, acompañado de hiperplasia de células mucosas; la submucosa y muscular propia contenían infiltración por linfocitos.



FIGURA 1. HALLAZGOS MACROSCÓPICOS EN INTESTINO DELGADO/ SMALL INTESTINE MACROSCOPIC FINDINGS. Nótese la formación de pliegues (rugosidad) en la mucosa /Look for the Fold formations on the mucosa.



FIGURA 2. HALLAZGOS MACROSCÓPICOS DE LA VÁLVULA ILEO CECAL/ ILEO CECAL VALVE INTESTINE MACROSCOPIC FINDINGS. Nótese el edema, inflamación y enrojecimiento / Look for the edema, inflammation, and reddish.

especial para observación de micobacterias, practicada dos veces, arrojó resultados negativos.

Ese nivel de evidencias se asocia a la escasa signología clínica, cuyas raíces pueden explicarse al entender que en la infección inicial, el bacilo se instaura en las células M de las placas de Peyer, por lo que la invasión de la mucosa intestinal resulta progresiva interesando primero a íleon terminal y válvula ileocecal, y luego a ciego, colon proximal y ganglios mesentéricos [20, 36]. Ocurre edematización, aumento de volumen y

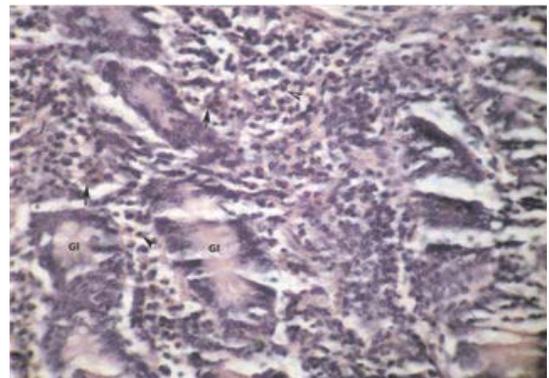


FIGURA 3. HALLAZGOS MICROSCÓPICOS EN INTESTINO DELGADO/ SMALL INTESTINE MICROSCOPIC FINDINGS. Nótese el corion con numerosos macrófagos (flechas) y linfocitos (cabezas de flecha). Glándulas (gl). Hematoxilina-eosina / Numerous macrophage (arrow) and lymphocyte (arrow head) on the corion. Glands (gl).

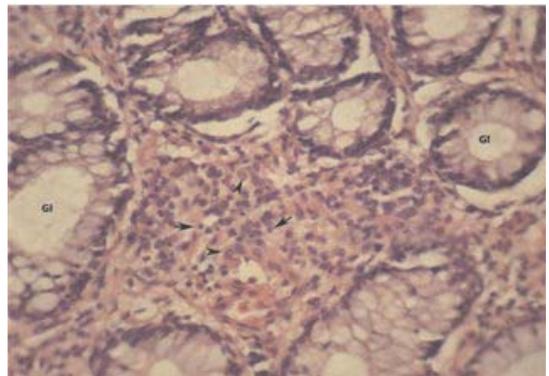
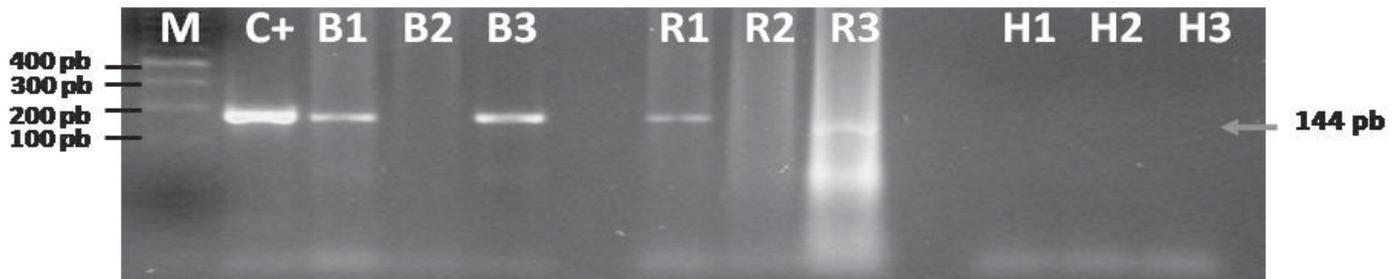


FIGURA 4. HALLAZGOS MICROSCÓPICOS DE INTESTINO GRUESO/ LARGE INTESTINE MICROSCOPIC FINDINGS. Nótese corion de la mucosa con abundante infiltración por macrófagos (cabezas de flecha) y linfocitos (flechas). Glándulas (Gl). Hematoxilina-eosina. / Large amount of infiltration by macrophage (arrow head) an lymphocyte (arrow). Glands (Gl).

palidez de la mucosa de yeyuno, íleon e incluso ciego, que terminan desarrollando hipertrofia difusa, que brinda la apariencia rugosa. Posteriormente, los ganglios mesentéricos e ileocecales aumentan de tamaño, y desarrollan pequeños focos de necrosis con caseificación e incluso calcificación [16, 26, 36].

Análisis del ADN: En el estudio se utilizaron técnicas de amplificación por PCR que han sido evaluadas y aplicadas



B: biopsias; R: raspados de mucosa; H: heces. 1: vaca 8129; 2: vaca 114; 3: vaca 5114. C+: control positivo; M: marcador de peso molecular. La flecha a la derecha indica el tamaño del producto de PCR esperado.

FIGURA 5. RESULTADOS DE AMPLIFICACIÓN (PCR) DE TRES TIPOS DE MUESTRAS DE LOS ANIMALES EVALUADOS/ AMPLIFICATION OF THREE SAMPLES TYPES OF EVALUATED ANIMALS RESULTS.

previamente [29]. En la FIG. 5 se muestra el análisis por PCR de las muestras de biopsia (B), raspado de mucosa (R) y heces (H) de los tres animales evaluados. Se observa un fragmento de 144 pares de bases en muestras obtenidas de dos de los animales evaluados (B1, B3, R1 y R3), que revelan la presencia de genoma de subespecies de *M. avium*, lo cual apoya fuertemente la presunción de infección de estos animales por MAsP.

La prueba de PCR permitió identificar la micobacteria a partir del ADN extraído de las muestras de biopsia y raspado rectal pertenecientes a dos de las tres (66,6%) vacas identificadas previamente como seropositivas a paratuberculosis. Sin embargo, dadas las limitantes propias del ensayo de amplificación, que se basó en la utilización de los oligonucleótidos dirigidos a regiones espaciadoras transcritas internas entre genes característicos del complejo *Mycobacterium avium-intracellulare*, no fue posible demostrar que el material genómico presente, correspondiese fehacientemente a MAsP. Por esa misma razón, no fue posible determinar los tipos de cepas presentes, lo que requiere de un ensayo PCR específico [9], cuyos iniciadores no estaban disponibles al momento del estudio.

Los datos del ensayo de PCR son suficientes para demostrar que los resultados del ELISA-i responden a la acción de micobacterias patógenas del complejo *avium-intracellulare* y no, a una respuesta inespecífica por la presencia de grupos ambientales, que según demostraron Osterstock y col. [28], son responsables de un gran número de reacciones falsas positivas, que conducen a alterar de forma considerable los índices de positividad de rebaños y áreas de estudio.

No se detectó el genoma del microorganismo en muestras de heces, lo cual podría ser explicado por escasa presencia de ADN blanco y/o condiciones subóptimas para la amplificación a partir de este tipo de muestras. Caso contrario al de diferentes investigaciones [9, 29, 43], donde las heces han sido con frecuencia la matriz de resultados fehacientes en el diagnóstico de la paratuberculosis. La insuficiencia de material

genómico se justificaría por la eliminación intermitente del agente a través de las heces; mientras que las condiciones de amplificación no óptimas responden a la ausencia de iniciadores específicos para MAsP.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los datos obtenidos permiten aseverar la existencia de infección por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en el ganado Criollo Limonero. La detección de anticuerpos mediante la técnica de inmunoensayo enzimático mostró capacidad en la identificación de animales afectados subclínicamente, lo que demuestra su potencial como prueba primaria de diagnóstico (paneo) en el establecimiento de futuros programas de control, aunque no fue posible establecer evaluaciones referenciales de validez, confiabilidad y verosimilitud; ni definir si la positividad reportada este influenciada por el manejo animal, las condiciones ambientales o la existencia de falsos negativos. La estrecha correlación entre los resultados de ELISA y PCR, ratifican no sólo la confirmación diagnóstica, sino también permiten validar la alta sensibilidad de la prueba serológica. Pese a no haber sido posible la demostración del agente etiológico mediante las otras herramientas utilizadas, los alcances ELISA-PCR permiten conclusiones firmes sobre el estado de la enfermedad en el ganado.

Investigaciones ulteriores serán necesarias para demostrar la validez y seguridad en el diagnóstico, dada la cronicidad que caracteriza a la enfermedad, y en atención a los tiempos o momentos ideales para la aplicación de cada técnica diagnóstica, lo que impone realizarlas en conjunto para comprender mejor su evolución, bajar costos y mejorar la eficiencia en su control. Asimismo, se demuestra la necesidad de establecer sistemas de vigilancia epidemiológica y programas de control de la enfermedad como única vía para garantizar la viabilidad, permanencia y desarrollo del ganado Criollo Limonero, haciendo énfasis en la reestructuración de los esquemas de crianza de reemplazos.

AGRADECIMIENTO

Especial agradecimiento al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES LUZ) por el apoyo financiero brindado. Al laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigaciones Endocrino-Metabólicas de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia; al laboratorio de Tuberculosis del Hospital Universitario de Maracaibo, y al servicio privado de histopatología "Dr. Jorge Soto Bracho". Al conjunto de empresas lácteas, gremios de ganaderos y profesionales, organismos gubernamentales e instituciones educativas que conforman el Sistema de Vigilancia Epidemiológica para brucelosis del municipio Machiques de Perijá, que hicieron factible estos resultados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALFARO, C.; ROLO, M.; CLAVIJO, A.; VALLE, A. Caracterización de la paratuberculosis bovina en ganado doble propósito de los llanos de Monagas, Venezuela. **Zoot. Trop.** 24(3): 321-332. 2006.
- [2] ARGIMON-PALLÁS, J.M.; JIMÉNEZ-VILLAS, J. Contextos de la investigación en ciencias de la salud. **Métodos de Investigación Clínica y Epidemiológica**. 3era Ed. Madrid. 1-404pp. 2004.
- [3] BARTELS, C.J.; VAN MAANEN, C.; VAN DER MEULEN, A.M.; DIJKSTRA, T.; WOUDA, W. Evaluation of three enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to *Neospora caninum* in bulk milk. **Vet. Parasitol.** 131 :235-246. 2005.
- [4] BEAUDEAU, F.; BELLIARD, M.; JOLY, A.; SEEGER, H. Reduction in milk yield associated with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis (Map) infection in dairy cows. **Vet. Res.** 38(4):625-34. 2007.
- [5] BECKER, B. E.; PEREZ, A. M.; SPATH, E.; PAOLICCHI, F.; MORSELLA, C. Distribución y factores de riesgo de paratuberculosis bovina en la Pampa Húmeda Argentina. **XII Simposio Internacional de la Asociación Mundial de Laboratorios de Diagnóstico Veterinario**. Montevideo 14 al 16, Noviembre. Resumen. 117pp. 2005.
- [6] BULL, T.J.; MCMINN, E.J.; SIDI-BOUMEDINE, K.; SKULL, A.; DURKIN, D.; NEILD, P.; RHODES, G.; PICKUP, R.; HERMON-TAYLOR, J. Detection and verification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fresh ileocolonic mucosal biopsy specimens from individuals with and without Crohn's disease. **J. Clin. Microbiol.** 41: 2915-2923. 2003.
- [7] COLLINS, M.T.; WELLS, S.J.; PETRINI, K.R.; COLLINS, J.E.; SCHULTZ, R.D.; WHITLOCK, R.H. Evaluation of five antibody detection tests for diagnosis of bovine paratuberculosis. **Clin. Diagn. Lab Immunol.** 12: 685-692. 2005.
- [8] EZANNO, P.; VAN SCHAİK, G.; WEBER, M.F.; HEESTERBEEK, J.A. A modeling study on the sustainability of a certification-and monitoring program for paratuberculosis in cattle. **Vet. Res.** 36:811-826. 2005.
- [9] FAVILA-HUMARA, L.; HERNÁNDEZ-CASTRO, R.; CHÁVEZ-GRIS, G. Detección de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en leche de cabras por PCR en México. **V Congreso de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos**. Mendoza, 2-4, mayo, Argentina. 1-3pp. 2007.
- [10] GASQUEZ, A. La Necropsia. Parte I. **La necropsia en los mamíferos domésticos**. Editorial Internacional. 13-21pp. 1989.
- [11] GONDA M.G.; CHANG, Y.M.; SHOOK, G.E.; COLLINS, M.T.; KIRKPATRICK, B.W. Effect of *Mycobacterium paratuberculosis* infection on production, reproduction, and health traits in US Holsteins. **Prev. Vet. Med.** 80(2-3): 103-19. 2007.
- [12] GUMBER, S.; EAMENS, G.; WHITTINGTON, R.J. Evaluation of a Pourquier ELISA kit in relation to agar gel immunodiffusion (AGID) test for assessment of the humoral immune response in sheep and goats with and without *Mycobacterium paratuberculosis* infection. **Vet. Microbiol.** 115: 91-101. 2006.
- [13] HARDIN, L.E.; THORNE, J.G. Comparison of milk with serum ELISA for the detection of paratuberculosis in dairy cows. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 209: 120-122. 1996.
- [14] HENDRICK, S.; DUFFIELD, T.; LESLIE, K.; LISSEMORE, K.; ARCHAMBAULT, M.; KELTON, D. The prevalence of milk and serum antibodies to *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in dairy herds in Ontario. **Can. Vet. J.** 46:1126-1129. 2005a.
- [15] HENDRICK, S. H.; DUFFIELD, T. E.; KELTON, D. E.; LESLIE, K. E.; LISSEMORE, K. D.; ARCHAMBAULT, M. Evaluation of enzymelinked immunosorbent assays performed on milk and serum samples for detection of paratuberculosis in lactating dairy cows. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 226:424-428. 2005b.
- [16] HINGER, M.; BRANDT, H.; HORNER, S.; ERHARDT, G. Short communication: Association analysis of microsatellites and *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis antibody response in German Holsteins. **J. Dairy Sci.** 90(4):1957-61. 2007.
- [17] KALIS, C.H.; HESSELINK, J.W.; BARKEMA, H.W.; COLLINS, M.T.; Culture of strategically pooled bovine fecal samples as a method to screen herds for paratuberculosis. **J. Vet. Diagn. Invest.** 12 :547-551. 2000.
- [18] KLAUSEN, J.; HUDA, A.; EKEROTH, L.; AHRENS. P. Evaluation of serum and milk ELISAs for paratuberculosis in Danish dairy cattle. **Prev. Vet. Med.** 58:171-178. 2003.

- [19] KUDAHL, A.; NIELSEN, S.S.; SORENSEN, J.T. Relationship between antibodies against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk and shape of lactation curves. **Prev. Vet. Med.** 62:119–134. 2004.
- [20] MANNING, E.J.B.; COLLINS, M.T. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis, and diagnosis. **Rev. Sci. Tech.** 20:133–150. 2001.
- [21] MELENDEZ, A. Paratuberculosis. En: Contreras J.A. (Ed.) **Enfermedades de los Bovinos**. Full Color Representaciones. Barquisimeto, Lara, Venezuela. 585-602pp. 2000.
- [22] MINISTERIO DEL AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES RENOVABLES. División de Información Ambiental. Dpto. de Hidrológica y Meteorología. Sección de Procesamiento de Datos. Estación Puente sobre el Lago de Maracaibo. Informes Técnicos. 1-36pp. 1994.
- [23] MUSKENS, J.; BARKEMA, H.W.; RUSSCHEN, E.; VAN MAANEN, K.; SCHUKKEN, Y.H.; BAKKER, D. Prevalence and regional distribution of paratuberculosis in dairy herds in The Netherlands. **Vet. Microbiol.** 77: 253–261. 2000.
- [24] NASER, S.A.; NASER, N.A.; *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis and Crohn's disease. In: Scheld, W.M., Hooper, D.C., Hughes, J.M. (Eds.), **Emerging Infections**, Vol. 7. American Society for Microbiology Press. 225–245pp. 2007.
- [25] NIELSEN, S.S. Variance components of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of IgG antibodies in milk samples to *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in dairy cattle. **J. Vet. Med. Series B** 49 (8) :384–387. 2002.
- [26] NIELSEN, S.S.; ENEVOLDSEN, C.; GROHN, Y.T. The *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* ELISA response by parity and stage of lactation. **Prev. Vet. Med.** 54: 1–10pp. 2002a.
- [27] NIELSEN, S.S.; GROHN, Y.T.; ENEVOLDSEN, C. Variation of the milk antibody response to paratuberculosis in naturally infected dairy cows. **J. Dairy Sci.** 85: 2795–2802. 2002b.
- [28] OSTERSTOCK, J.B.; FÍSGATE, G.T.; NORBY, B.; MANNING, E.J.; COLLINS, M.T.; ROUSSEL, A.J. Contribution of environmental mycobacteria to false-positive serum ELISA results for paratuberculosis. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 230(6):896-901. 2007.
- [29] PARK, H.; JANG, H.; KIM, C.; CHUNG, B.; CHAN, C.; PARK, S.K.; SONG, S. Detection and identification of *Mycobacteria* by amplification of the internal transcribed spacer regions with genus-and species-specific PCR primers. **J. Clin Microbiol.** 38:4080-4085. 2000.
- [30] PINO-RAMIREZ, D. Exploración del individuo y del rebaño. Examen del sistema digestivo. **Fundamentos del diagnóstico clínico en grandes animales**. Ediciones Astro Data. 69-154, 269-366pp. 2002.
- [31] RISTOW, P.; MARASSI, C. D.; RODRIGUES, A.; OELEMANN, W.; ROCHA, F.; SANTOS, A.; CARVALHO, E.; CARVALHO, C.; FERREIRA, R.; FONSECA, L.; LILENBAUM, W. Diagnosis of paratuberculosis in a dairy herd native to Brazil. **The Vet. J.** 174 (2) : 432-434. 2007.
- [32] SOTO, J. P.; KRUIZE, J.; LEIVA, S. Aislamiento de *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* de fecas en rebaños lecheros infectados mediante el Método de Cornell modificado. **Arch. Med. Vet.** XXXIV (2):275-282. 2002.
- [33] STABEL, J.R.; WELLS, S.; WAGNER, B.A. Relationships between fecal culture, ELISA, and bulk tank milk test results for Johne's disease in US dairy herds. **J. Dairy Sci.** 85:525–531. 2002.
- [34] SWEENEY, R.W.; WHITLOCK, R.H.; BUCKLEY, C.L.; SPENCER, P.; ROSENBERGER, A.E.; HUTCHINSON, L.J. Diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle, using enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. **Am. J. Vet. Res.** 55:905–909. 1994.
- [35] UZOIGWE, J.C.; KHAITSA, M.L.; GIBAS, P.S. Epidemiological evidence for *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis as a cause of Crohn's disease. **Epidemiol. Infect.** 20:1-12. 2007.
- [36] VALENTIN-WEIGAND, P. Johne's disease: pathogenesis and problems related to diagnosis. In: Kaske, M., Scholz, H., Holtersshinken, M. (Eds.), **Recent Developments and Perspectives in Bovine Medicine**. XXII World Buiatrics Congress, Hanover, 18–23 August, Germany, 48–57pp. 2002.
- [37] VAN WEERING, H.; VANSCHAIK, G.; VANDERMEULEN, A.; WAAL, M.; FRANKEN, P. Diagnostic performance of the Pourquier ELISA for detection of antibodies against *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in individual milk and bulk milk samples of dairyherds. **Vet. Microbiol.** 125 (1):49-58. 2007.
- [38] VAN SCHAİK, G.; ROSSITER, C. R.; STEHMAN, S. M.; SHIN, S. J.; SCHUKKEN, Y. H. Longitudinal study to investigate variation in results of repeated ELISA and culture of fecal samples for *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in commercial dairy herds. **Am. J. Vet. Res.** 64: 479–484. 2003.
- [39] VAN SCHAİK, G.; HARO, F.; MELLA, A.; KRUIZE, J. Bayesian analysis to validate a commercial ELISA to detect paratuberculosis in dairy herds of southern Chile. **Prev. Vet. Med.** 79(1):59-69. 2007.

- [40] WEBER, M.F.; GROENENDAAL, H.; VAN ROERMUND, H.J.; NIELEN, M. Simulation of alternatives for the Dutch Johne's disease certification-and-monitoring program. **Prev. Vet. Med.** 62: 1–17. 2004.
- [41] WEBER, M.F.; VAN ROERMUND, H.J.; VERNOOIJ, J.C.; KALIS, C.H.; STEGEMAN, J. A. Cattle transfers between herds under paratuberculosis surveillance in the Netherlands are not random. **Prev. Vet. Med.** 76: 222–236. 2006.
- [42] WHITLOCK, R.H.; WELLS, S.J.; SWEENEY, R.W.; VAN TIEM, J. ELISA and fecal culture for paratuberculosis (John's disease): sensitivity and specificity of each method. **Vet. Microbiol.** 77: 387–398. 2000.
- [43] ZUMÁRRAGA, M.J.; MEIKLE, V.; BERNARDELLI, A.; ABDALA, A.; TARABLA, H.; ROMANO, M. I.; CATALDI, A. Use of touch-down polymerase chain reaction to enhance the sensitivity of Mycobacterium bovis detection. **J. Vet. Diagn. Invest.** 17(3):232-8. 2005.