

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

“Comparación de la prueba de ELISA en suero y leche para el diagnóstico de Paratuberculosis bovina y su asociación con la condición corporal”

por

**PAPAZIAN BALSAMO, María Florencia
PICASSO RISSO, Catalina**

TG 144

Comparacion de la prueba



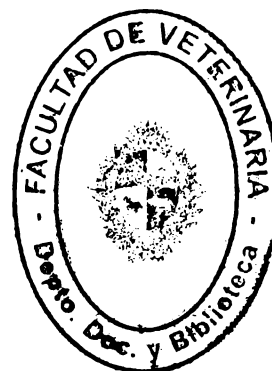
FV/28342

TESIS DE GRADO presentada como uno de los requisitos para obtener el título de Doctor en Ciencias Veterinarias.
(orientación Producción Animal).



MODALIDAD Estudio de Caso.

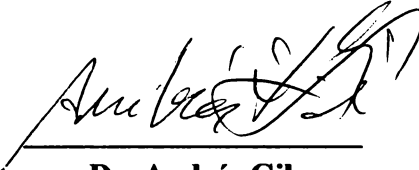
**MONTEVIDEO
URUGUAY
2009**



PÁGINA DE APROBACIÓN

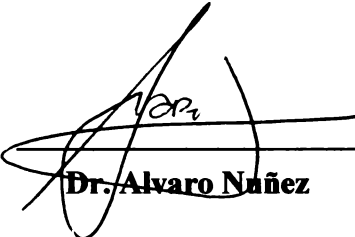
Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:



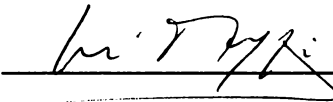
Dr. Andrés Gil

Segundo miembro (tutor):



Dr. Alvaro Nuñez

Tercer miembro (co-tutor):



Dr. José Piaggio

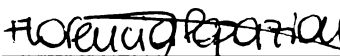
Cuarto miembro

Dr. Pacheco

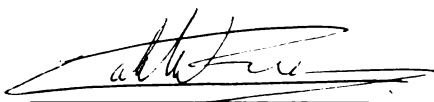
Fecha:

19 de agosto, 2009.

Autores:



María F. Papazian



Catalina Picasso

FACULTAD DE VETERINARIA

Aprobado con 12 (doce) votos

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar nos gustaría agradecer a nuestro tutor y co-tutor Álvaro y Pepe quienes nos acompañaron en este proceso atendiendo nuestras inquietudes e interrogantes.

Al INIA y UDELAR, Facultad de Veterinaria, instituciones que hicieron posible ésta investigación.

A los productores de Colonia y San José, quienes nos abrieron las puertas de sus establecimientos en forma desinteresada y nos brindaron su tiempo para llevar a cabo nuestro estudio.

A la Dra. Alejandra Suanes por su apoyo, estímulo y experiencia. A los Drs. Osvaldo Mourglia y Pablo Puime, todos los compañeros de la cátedra de bioestadística y la Br. Cecilia Acosta por su constante colaboración.

A nuestras familias, por su estímulo, apoyo, guía y acompañamiento en todo momento.

A Nicholas por su compañía y apoyo incondicional.

A nuestras amigas y amigos con los que siempre podemos contar y con los que es más divertido y disfrutable este camino.

A todos aquellos que de una manera u otra estuvieron cerca apoyándonos en este proceso...

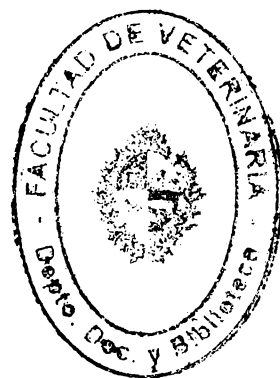


TABLA DE CONTENIDO

Página:

PÁGINA DE APROBACIÓN	II
AGRADECIMIENTOS	III
TABLA DE CONTENIDO	IV
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	VI
1. RESUMEN	X
2. SUMMARY	XI
3. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	1
4. OBJETIVO GENERAL.....	11
4.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS	11
5. MATERIALES Y MÉTODOS	12
5.1. MUESTRAS DE SANGRE	13
5.2. MUESTRAS DE LECHE	13
5.3. OBSERVACIÓN DE LA CONDICIÓN CORPORAL	13
5.4. ANALISIS ESTADISTICO	13
6. RESULTADOS	15
6.1. RESULTADOS SEROLOGICOS.....	15
6.2. RESULTADOS DEL ELISA EN LECHE	15
6.3. COMPARACION DE RESULTADOS DE ELISA	16
6.4. RESULTADOS DEL GRADO DE ACUERDO ENTRE LAS DISTINTAS PRUEBAS DE ELISA.....	16
6.5. RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE LA CONDICIÓN CORPORAL.....	17
6.6. RESULTADOS DE LA COMPARACION ENTRE LA OBSERVACION DE LA CONDICION CORPORAL Y EL DIAGNOSTICO DE ELISA	17

7. DISCUSIÓN.....	18
8. CONCLUSIÓN.....	21
9. BIBLIOGRAFÍA.....	22

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS



Cuadro 1: Márgenes para valorar el grado de acuerdo en función del índice kappa	14
Cuadro 2: Resultados de serología a <i>Map</i>	15
Cuadro 3: Resultados de leche a <i>Map</i>	15
Cuadro 4: Resultados de la observación de la condición corporal agrupados en mala ("1") y buena ("0").....	17
Cuadro 5: Comparación entre condición corporal y resultados de ELISA.....	17
Grafico 1: Comparación entre los resultados de ELISA en suero vs. leche.....	16

1. RESUMEN

La Paratuberculosis (PT), conocida como Enfermedad de Johne, es una patología entérica crónica y progresiva de los rumiantes y animales silvestres, causada por la bacteria *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*). Los animales se contagian siendo terneros, pero no evidencian la enfermedad hasta después de los 2 años de edad. Estos eliminan *Map* en forma intermitente en heces, el que puede sobrevivir en el medio ambiente por largo tiempo. Para detectar animales infectados se emplean pruebas basadas en la respuesta inmune celular, así como pruebas serológicas de inmunidad humoral, como ser el enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), el cual tiene gran especificidad. Recientemente se han desarrollado pruebas de ELISA para su utilización en muestras de leche, que pueden simplificar considerablemente la toma de muestras. Los objetivos de nuestro estudio fueron 1) comparar los resultados de pruebas de ELISA en suero y leche para el diagnóstico de Paratuberculosis bovina en ganado lechero, y 2) determinar la asociación entre la presencia de anticuerpos frente a *Map* y la condición corporal. Para ello se realizó un muestreo de 408 bovinos en lactación en nueve establecimientos lecheros con antecedentes de diarrea crónica de los departamentos de Colonia (8) y San José (1), Uruguay. Se tomaron muestras de sangre y leche, y se evaluó la condición corporal en la escala de 1-5 para ganado lechero. El grado de acuerdo entre el ELISA en suero y en leche se determinó mediante el índice kappa de Cohen. Para evaluar la asociación entre las pruebas de ELISA y la condición corporal se realizó un modelo de Regresión Logística y se calculó el OR. El índice kappa obtenido fue de 0,57 ($p < 0.01$) indicando un acuerdo moderado entre las pruebas. A su vez, los animales considerados positivos a PT (para una o ambas pruebas de ELISA) mostraron una alta asociación $OR = 5,57$, ($p = 0,035$) con la condición corporal inferior al momento de la toma de muestras. Por esto concluimos que existe concordancia entre el ELISA en leche y en suero, y que el ELISA en leche se puede usar como prueba diagnóstica. Además se encontró que los animales con resultado positivo a la prueba de ELISA son los que presentan menor condición corporal.

2. SUMMARY

Paratuberculosis (PT), known as Johne's disease is a chronic, progressive enteric pathology of ruminants and wild animals caused by the bacteria *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (*Map*). The animals get infected as calves, but no evidence the disease is shown until after 2 years of age. *Map* are excreted intermittently in feces, which can survive in the environment for a long time. Tests to detect infected animals are based on the cellular immune response and serological evidence of humoral immunity, such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), which has great specificity. Recently ELISA tests for use in milk samples have been developed. These tests have the advantage that milk is easier to sample than blood. The aims of our study were 1) to compare results of ELISA tests in serum and milk for the diagnosis of bovine PT in dairy cattle and 2) to determine the association with the body condition score (BCS). Sampling was conducted on 408 lactating cattle from nine dairy farms with a history of chronic diarrhea in the departments of Colonia (8) and San Jose (1), Uruguay. Samples of blood and milk were taken, and body condition was scored from 1-5 for dairy cattle. The degree of agreement between the results of ELISA tests in serum and milk was determined using Cohen's kappa index. To assess the association between the ELISA tests and BCS performed a logistic regression model was fit and Odds ratios were calculated. Cohen's kappa index was 0.57 ($p < 0.01$) indicating a moderate agreement between the tests. In turn, animals considered positive for PT (for one or both ELISA test) showed a high association with lower body condition at the time of sampling (OR = 5.57, $p = 0.035$). We concluded that there is concordance between the ELISA test in serum and milk and the ELISA test in milk can be used as a diagnostic test for PT. It was also found that animals with positive results to the ELISA are those with lower BCS.

3. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

La Enfermedad de Johne o Paratuberculosis actualmente se considera una de las más serias enfermedades del ganado vacuno. Es una patología entérica crónica y progresiva de los rumiantes y animales silvestres, causada por una bacteria: *Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis (Map)*.

Este agente etiológico (*Map*), pertenece al género *Mycobacterium* que en ocasiones, presentan un crecimiento filamentosos o pseudomicelios, y aunque no forman estructuras de tipo fúngico (esporas, conidias, cápsulas, hifas), el género debe su denominación al aspecto fungoide de las colonias de *M. tuberculosis*. El *Map* es un bacilo de 1-2 μm de longitud por 0,5 μm de anchura, que normalmente forma colonias rugosas (Sevilla, 2007) no pigmentadas, tal y como puede observarse en extensiones de heces y tejidos, debido a la disposición que adoptan al replicarse dentro de los macrófagos que infectan (Thoen y cols. 1979). Es una bacteria de crecimiento lento, forma colonias claramente visibles tras varias semanas de incubación (Wayne y cols. 1986, Stahl y cols. 1990, Shinnick y cols. 1994). El mismo se caracteriza por ser Gram positivo (a pesar de la escasa penetración de colorante por medio de esta técnica), intracelular facultativo, ácido alcohol resistente y mycobactina dependiente. Es aerobio o microaerófilo y su temperatura óptima de crecimiento se sitúa entre 30 y 45°C (Wayne y cols. 1986, Levy-Frebault y cols. 1992).

Según Ratledge (1982) el *Map* es una bacteria muy resistente a condiciones adversas gracias a la compleja pared celular rica en lípidos y con un lipopolisacárido, lipoarabinomannan (LAM) y a la baja actividad metabólica que tiene (Minnikin 1982), la misma implica una velocidad de crecimiento en condiciones óptimas 24 veces inferior que la de bacterias como *Escherichia coli* (Juste y cols. 1993) sin embargo le permite ser la primera en aparecer cuando las condiciones se vuelven favorables (Ratledge 1982).

Cabe destacar que la bacteria necesita para replicarse componentes presentes en el organismo animal por lo que es un patógeno obligado. El hierro es un nutriente esencial para muchos microorganismos y como la solubilidad del mismo es baja en medio acuoso muchas bacterias han desarrollado mecanismos especializados para su adquisición. En las micobacterias el hierro es secuestrado por sideróforos. De los cuales existen dos tipos conocidos, exoquelina y mycobantina. La primera son pequeñas moléculas proteicas presentes en el líquido extracelular y su función es remover el hierro de los depósitos orgánicos y transportarlo a través de la membrana bacteriana. La mycobantina, interna a la bacteria, es un complejo de alto peso molecular, caracterizado por un núcleo lipídico (Nuñez, 2006). La Mycobantina J fue originalmente descrita como un factor de crecimiento requerido para el *Map*, pero hoy se sabe que es producto de cepas de *Map* adaptadas a crecer en medios de cultivos y es la única accesible comercialmente. (Chiodini y col., 1984; Cocito y col., 1994; Lane y col., 1995; Schwartz y col., 2001).

El *Map* forma parte de un gran grupo de micobacterias de crecimiento lento altamente relacionadas conocidas como *Mycobacterium avium complex*, (*Mac*) o *M. avium-intracellulare complex* (*Maic*), para algunos (Sevilla, 2007). Las *Mac* pueden ser subclasificadas como *Mycobacterium avium* subsp. *Avium* (*Maa*), *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* (*Mas*), y *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*). Para estudiar la diversidad del complejo *Mycobacterium avium* se han realizado estudios fenotípicos y genéticos.

El bacilo puede sobrevivir en el medio ambiente, tierra, agua por largo tiempo (Chiodini y col., 1984; Cocito y col., 1994). En el caso de materia fecal puede llegar hasta los 246 días (Lovell y col., 1944). Sin embargo es sensible a altas temperaturas, luz solar, desecación, elevada concentración de calcio (Schroen y col., 2003, Whittington y col., 2004, Whittington y col., 2005).

El mecanismo de transmisión más importante de la PT es el feco-oral (Sweeney 1996). Los terneros son los animales más susceptibles. Estos en general están expuestos a adquirir la enfermedad con la ingesta de calostro, leche o al mamar de las ubres sucias de las madres (Chiodini y col., 1984a, Sweeney 1996). También existen otras vías de transmisión como ser la vertical prenatal. *Map* ha sido aislado de tejidos fetales (membranas, cotiledones) y de tejidos maternos (endometrio, mucosa uterina) (Sevilla, 2007). Sin embargo Kruij y col. (2003) reportaron que los ovocitos y fetos derivados de madres eliminadoras no son vía de transmisión.

Para el caso de la leche, diversas publicaciones indican que puede aislarse *Map* de vacas clínicamente afectadas (Taylor y col., 1981, Giese y col., 2000), pero también de vacas asintomáticas o subclínicas con cultivo fecal positivo (Sweeney y col., 1992a, Streeter y col., 1995).

El *Map* es un patógeno intracelular que se caracteriza por infectar macrófagos donde evaden la respuesta inmune manteniendo de este modo un estado de infección subclínica durante muchos años. La misma se caracteriza por una fuerte respuesta mediada por células en forma temprana durante estadios subclínicos de la infección, y fuertes respuestas humorales durante las fases clínicas tardías de la enfermedad. La reacción inmune del animal a la infección durante los estados tempranos subclínicos, está dada por la respuesta mediada por células que se caracteriza por proliferación linfocítica y producción de citoquinas por los linfocitos T.

El huésped se infecta con el *Map* siendo terneros. Ingresa al organismo, penetra la superficie de la mucosa gastrointestinal y es fagocitado por macrófagos, pudiendo permanecer intactos dentro de la célula fagocíticas o procesarse y ser presentados al linfocito T (Chiodini y col., 1993; Stabel, 2000; Coussens, 2001; Coussens, 2004; Sigurðardóttir y col., 2004).

La respuesta inmune mediada por células es modulada por varios subconjuntos de linfocitos T, siendo esenciales para proporcionar protección y prevenir la progresión de la enfermedad. La secreción de citoquinas por las poblaciones de células T activan a los macrófagos para destruir al *Map* fagocitado así como a otras células T a fin de contener la infección. La magnitud de la enfermedad tiene una relación inversa con la respuesta celular de los linfocitos T.

Para que el huésped obtenga una respuesta inmune eficaz al microorganismo intracelular, éstos linfocitos deben ser capaces de reclutar las células apropiadas y liberar las citoquinas apropiadas para el desarrollo de un granuloma capaz de contener la infección y aumentando al máximo la actividad bactericida. La infección con el *Map* parece perturbar la respuesta de las células T, particularmente durante las últimas fases de la enfermedad. En la fase subclínica temprana, el microorganismo provoca una respuesta celular que puede caracterizarse por fuertes reacciones de hipersensibilidad tardía tipo IV, respuestas proliferativas de linfocitos y producción de citoquinas por los linfocitos T estimulados. Con el progreso de la enfermedad a las fases clínicas, la respuesta inmune mediada por células disminuye y predomina una respuesta humoral fuerte. Sin tener en cuenta el tipo celular (CD4+, CD8+, o células $\gamma\delta$) el IFN- γ parece ser la citoquina más crítica para controlar las infecciones mycobacteriales (Chiodini, 1996; Stabel, 2000).

Animales mayores de 10 meses aparecen como resistentes y aunque el mecanismo exacto no se conoce, involucra la maduración del sistema inmune incluyendo el balance entre varias subpoblaciones de células T así como su distribución en los tejidos.

La célula B se excluye a menudo en las discusiones de inmunidad al *Mycobacterium* patógeno. De hecho, la presencia de anticuerpos al *Map* no parece otorgar protección a los animales infectados y es indicativo de las fases tardías de enfermedad. A medida que aparecen los signos clínicos la respuesta humoral se hace presente, sin embargo la misma no protege al huésped de la infección por lo que la respuesta celular es esencial para la defensa del animal. Esto se puede explicar porque las células B no puedan responder presentado el antígeno en las fases clínicas de enfermedad debido a anergia celular T y/o B. El reconocimiento de los antígenos del *Map* por parte de los receptores de superficie de las células B, probablemente guíe el proceso de expansión clonal capaz de producir anticuerpos contra el *Map*. La limitada respuesta humoral en estados tempranos de la enfermedad no significa ausencia total de anticuerpos, por lo que los linfocitos B estarían envueltos en la reacción temprana. Sobre todo por el hecho de que la mayoría de los anticuerpos producidos son IgG, y que el cambio de IgM a IgG requiere de IFN- γ y este es segregado ya sea por las células T CD4+ o por T $\gamma\delta$ pero en presencia de linfocitos B, con sus propiedades de procesar antígenos, presentarlos y de activar a lo T CD4+. Respecto a la relación IgM, tiempo de infección y severidad se podría especular con que animales en los que persiste la IgM por largo tiempo son deficientes en producir IFN- γ . (Stabel, 2000; Coussens, 2001; Coussens, 2004).

Los primeros signos de la infección son la producción de IFN- γ y la proliferación de linfocitos. Esto indica la activación de la inmunidad celular, y la excreción intermitente de la bacteria en heces. Esta respuesta irá en incremento junto con la carga micobacteriana excretada en las heces, mientras, los anticuerpos de la respuesta humoral pueden ir apareciendo. Esta fase de aparente equilibrio entre patógeno y hospedador puede durar años. Al final, la respuesta celular cae y la excreción de bacterias aumenta, lo que lleva al estado clínico de la enfermedad (Sevilla, 2007).

La enfermedad de Johne progresa a través de tres estados clínicos: el estado I, subclínico, sin excreción fecal de *Map*, con una baja respuesta humoral y fuerte celular, y sin síntomas clínicos. El estado II, subclínico, pero con eliminación fecal de *Map* caracterizado por una leve respuesta humoral y celular, sin síntomas clínicos. El estado III se reconoce como de alta excreción de *Map* en heces, alta respuesta humoral y débil celular (Sweeney, 1996).

Clínicamente la enfermedad se caracteriza por provocar diarrea intermitente (dependiendo de la especie) y crónica, acompañada de debilidad, hipoproteinemia, edema submandibular y consunción progresiva, que eventualmente lleva a la muerte. Sin embargo, los casos clínicos representan un bajo porcentaje de la casuística de la paratuberculosis, ya que la fase más prolongada es subclínica. Los síntomas que llevan a sospechar la presencia subclínica de la PT son principalmente mermas en la producción láctea, que en bovino lechero puede variar de un 4 hasta un 14% dependiendo de la lactación en que se encuentre (Nordlund y col., 1996, Wilson y col., 1997). También podemos encontrar problemas reproductivos y mastitis (Wilson y col., 1997, Valentin-Weigand y col., 1999).

En la especie bovina los síntomas clínicos no suelen aparecer hasta los dos años de edad y aunque en pequeños rumiantes pueden comenzar antes, su aparición se asocia al estrés (Chiodini y col., 1984a, Blood y col., 1989, García Marín y col., 1994).

Normalmente los casos clínicos se eliminan de los rodeos, pero la forma subclínica de la enfermedad ocasiona importantes pérdidas económicas por la disminución en la producción (Buergelt y Duncan, 1978; Wilson y col., 1993; Benedictus y col., 1997; Hendrick y col., 2005; Lombarda y col., 2005), un pobre comportamiento reproductivo (Nordlund y col., 1996., Johnson-Ifearulundu y col., 1997, Johnson-Ifearulundu y col., 2000,) e incremento de costos de remplazo (Ott y col., 1999). El concepto de "Iceberg" también se aplica a ésta patología, al igual que en muchas enfermedades, en el cual por cada animal con sintomatología clínica nacido en un establecimiento, existen de 15 a 20 animales infectados subclínicamente (Withlock y Buergelt, 1996).

Además de describirse la enfermedad en bovinos, se encontró en otros rumiantes como ser ovinos, cabras, ciervos y camellos. Numerosos estudios en Australia reportan la enfermedad, medidas de manejo, caracterización de las cepas y medidas preventivas en ovinos (Whittington y col., 1999; Sergeant y col., 2002a; Sergeant y col., 2003). Estudios de Paolicchi y col. (2001) en Argentina reportan la presencia de la enfermedad en el ciervo colorado, fundamentalmente animales de 1 a 2 años, con sintomatología y lesiones similares al bovino. Raizman y col. (2005), reportan el primer estudio sobre infección con *Map* en conejos y ciervos en zonas cercanas a los rodeos lecheros en Minnesota. La pérdida progresiva de peso y condición corporal es el signo clínico común a todas las especies (Aller y col., 1973; Newsholme y col., 1981; Seaman y col., 1984; Chiodini y col., 1984a; Gilmour y col., 1991; García Marín y col., 1994), aparentemente como consecuencia de la insuficiente absorción de proteínas que causan los infiltrados celulares y edemas del intestino (Allen y col., 1974b). Esto último no está claro pues se ha podido observar que no hay pérdidas sustanciales de digestibilidad en ovinos con formas clínicas (Juste y cols., 1994).

A la anatomía patológica podemos destacar a nivel intestinal, la presencia de engrosamiento, edema, mucosa corrugada, principalmente en la porción terminal del íleon, pero también en yeyuno, con distensión linfática en la superficie serosa así como se pueden observar los ganglios linfáticos agrandados y edematosos.

Histopatologicamente el proceso inflamatorio se caracteriza por agregado de macrófagos, linfocitos y granulocitos neutrófilos, principalmente en folículos linfoides de las placas de Peyer de yeyuno e íleon, pero también se pueden encontrar granulomas en áreas interfoliculares y en las vellosidades. (Chiodini y col., 1984a; Huda y Jensen, 2003; Sigurðardóttir y col., 2004). La lesión inicial es un discreto y no encapsulado granuloma en la pared del intestino y en los ganglios linfáticos. La misma evoluciona a un granuloma de mayor tamaño o a un proceso granulomatoso difuso, que contiene un número importante de bacterias ácido alcohol resistente en macrófagos y células gigantes multinucleadas. Para detectar estas alteraciones microscópicas típicas de la PT, normalmente se utilizan métodos como la tinción hematoxilina-eosina y Ziehl-Neelsen, las cuales complementadas revelan la presencia de los bacilos asociados a las lesiones (Garrido y col., 2000a). Se pierde la vellosidad a nivel intestinal y la pared se vuelve gruesa, cambios que comprometen la función de absorción junto a una secreción fluida en la luz del intestino. La evolución determina una continua pérdida proteica, que ocasiona hipoproteinemia y edema por disminución de la presión osmótica. La diseminación del *Map* a otros tejidos del organismo ocurre en algunos animales, especialmente en los casos avanzados. La diseminación se encuentra en varios órganos como ser riñones, útero, ubre y ganglios linfáticos (Whitlock y Buergelt, 1996; Huda y Jensen, 2003; Sigurðardóttir y col., 2004).

Dada la especificidad de las características histológicas de las lesiones paratuberculosas, la histopatología también presenta una buena especificidad, y realizando una buena selección de la muestra, también puede presentar una buena sensibilidad, incluso en animales con paratuberculosis subclínica, y a veces superior a la del cultivo (Sevilla, 2007).

Con las drogas que se conocen actualmente el tratamiento con antibióticos es ineficaz y económicamente impracticable. La vacunación llevada a cabo en algunos países reduce el número de eliminadores fecales de *Map* y el número de bovinos infectados en un rodeo pero no reduce los animales enfermos (Muskens y col., 2002).

A nivel mundial ha crecido en forma consistente su importancia y estudios epidemiológicos recientes evidenciaron un claro aumento de la misma a nivel de las explotaciones ganaderas. Esta patología está incluida en la Lista de Enfermedades del Código Internacional de Salud Animal de la OIE (Organización Mundial de la Salud Animal). Además se ha convertido en un problema comercial, dado que algunos países ya están exigiendo pruebas negativas para la importación de ganado en pie y material genético (semes y embriones). Si bien no se la considera zoonosis, existen reportes que la asocian con la enfermedad de Crohn, una grave enteritis en humanos. Incluso se ha aislado de biopsias de intestino de pacientes con dicha enfermedad el *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis (Chiodini y col., 1984; Sanderson y col., 1992; Thompson, 1994; Collins y col., 2000; Stabel, 2000). En el

caso de definirse como tal el impacto puede ser catastrófico para países con una fuerte producción láctea y cárnica como el Uruguay. Esto se ve reflejado en las inversiones que se realizan en el mundo, en busca de alternativas de control. Además el Map, que es excretado por la leche, presenta cierta tolerancia térmica al tratamiento de la misma pudiendo sobrevivir a la pasteurización permaneciendo en la leche envasada que se destina a consumo humano.

El primer reporte de la ocurrencia de diarrea crónica en ganado fue realizado por D'Aroval en 1826. Posteriormente Hansen y Nielsen en 1881 observaron el engrosamiento y corrugación de la mucosa intestinal en ganado muerto con esa forma de enteritis. 14 años después (1895) Johne y Frothingham demostraron la presencia de bacilos ácido alcohol resistente en secciones de intestino de ganado con enteritis. Bang en 1906 distinguió entre enteritis tuberculosa y no tuberculosa, proponiendo el término enteritis pseudotuberculosa. El agente fue aislado por primera vez de bovinos en 1910 por Twort, caracterizándolo como micobacteria y asignándole el nombre de *Mycobacterium enteriditis chronicae pseudotuberculosis bovis johnes*. Posteriormente se le denominó *Mycobacterium paratuberculosis* y se la incluyó como una especie distinta en el género Micobacteria. Actualmente se refiere a ésta patología como Paratuberculosis o enfermedad de Johne. (Chiodini y col., 1984; Cocito y col., 1994).

La PT tiene creciente prevalencia en especies ganaderas y está ampliamente distribuida por todo el mundo (Chiodini y col., 1984a, Kennedy y col., 2001). Varios estudios realizados en Estados Unidos (Collins y col., 1994; Johnson-Ifeorlundu y col., 1999) indican que la enfermedad está presente en los rodeos lecheros de ese país. También existen reportes diagnósticos en Inglaterra (Cetinkaya y col., 1998), Holanda (Muskens y col., 2000), Dinamarca (Jakobsen y col., 2000), y Argentina (Paolicchi y col., 2002).

A nivel nacional la Paratuberculosis ha sido diagnosticada por primera vez en el año 1945 (Cassamagnaghi, 1947), posteriormente fue aislado el agente por Errico y col. (1983) y desde entonces se han reportado casos fundamentalmente en rodeos lecheros.

Los últimos datos publicados en Uruguay del año 2006 (Nuñez, 2006) indican que la estimación de seroprevalencia proyectada a la población bajo estudio fue de 5,65% y dentro de estos un 70,28% de los establecimientos resultaron con al menos un animal seropositivo.

Sin embargo, la prevalencia real de esta enfermedad puede estar enmascarada por las dificultades que plantea su diagnóstico. Las técnicas utilizadas en la detección de animales infectados en general no son especialmente sensibles, a lo que hay que añadir el largo período de latencia desde la infección hasta la aparición de síntomas, y la variabilidad del curso de la enfermedad entre animales (Sevilla, 2007).

Por esto han sido desarrolladas diversas técnicas diagnósticas buscando la detección del agente causal de la enfermedad, que varían tanto en su sensibilidad como en especificidad. El cultivo bacteriológico de heces es el método más confiable puede detectar de 50 a 100 células de Map por gramo de heces, considerándolo

100% específico (Jorgensen 1982, Whitlock 1998). Pero tiene la desventaja de tener una sensibilidad relativamente baja, sobre todo por falsos negativos con animales subclínicos, que se ve aún más reducida por la aparición de cepas de difícil aislamiento. Esto se ha mejorado en base a modificaciones de la técnica, tales como la centrifugación y el aumento en volumen de 1 a 2 gramos de muestra (Chiodini y col., 1984a, Chiodini y col., 1986a, Juste y col., 1991b, Eamens y col., 2000, Whitlock y col., 2000, Whittington y col., 2000a, Corpa y col., 2000a, Whittington y col., 2000c, Whittington y col., 2001d, Crossley y col., 2005). Además es un método lento, requiere varias semanas de incubación, es caro, laborioso (Collins y col., 1990b, Kalis y col., 2002) y comúnmente resulta contaminado. Otra desventaja es que en presentaciones subclínicas la eliminación fecal de *Mycobacterium* es intermitente por lo que solo la utilización de esta técnica puede llevar a detecciones incompletas en los rodeos.

Las tinciones ácido alcohol resistentes de heces o biopsias intestinales pueden ser útiles pero se necesitan bacteriólogos experimentados para identificar al *Mycobacterium*, puesto que las colonias aparecen agrupadas y resulta muy difícil diferenciarlas de otros microorganismos ácido- alcohol resistentes (Chiodini y col., 1984; Stabel, 1996).

Recientemente se han desarrollado métodos de diagnóstico moleculares que requieren la identificación de secuencias de ADN del *Map* siendo uno de ellos el test de la Reaccion en cadena de la Polimerasa (PCR) tanto en heces como en leche el cual es un test rápido, con alta especificidad y sensibilidad. A pesar de estas características, el PCR presenta dificultades, fundamentalmente relacionadas con la presencia de sustancias inhibitorias, que hacen compleja la reacción y hace necesario que exista un gran número de bacterias en la muestra a fin de que las sustancias inhibitorias tengan la menor incidencia posible. Otro problema que se presenta es la dificultad para lisar la gruesa y resistente pared celular del *Map* (Moreira y col., 1999, Gasteiner y col., 2000; Giese y Ahrens, 2000; Garrido y col., 2000, Harris y Barletta, 2001; Strommenger y col., 2001; Shin y col., 2004).

Otras formas de diagnóstico con las que se cuenta son las pruebas para medir la inmunidad mediada por células en el bovino, como ser la prueba intradermocutanea comparada y la prueba ELISA-IFN- γ . La primera es la medida de la respuesta in-vivo de linfocitos T a un antígeno sensibilizado. Esta prueba se ha usado con éxito para el diagnóstico de infección de la Tuberculosis en el ganado pero se ha usado con menores resultados para el diagnóstico de Paratuberculosis debido a su baja sensibilidad y especificidad. La misma se basa en la reacción inflamatoria local que se produce al inyectar intradérmicamente un antígeno en el animal infectado, como respuesta retardada de hipersensibilidad (Chiodini y col., 1984a). Para ello se utilizan dos tipos de inóculos: los extractos proteicos purificados (PPD) *Bovis* (1mg/ml) y PPD *Avium* (2.500 UI). Luego de haber medido el espesor de piel con un calibre, se inocula en forma intradérmica 0.1 ml de tuberculina bovis, a unos 10 cm de la porción superior del cuello y 0,1 ml de PPD aviar a 12 cm por debajo del punto de inoculación de la bovis. La lectura se realiza a las 72 hs pos-inoculación, registrándose el incremento del grosor de la piel en cada punto. La prueba se considera positiva a *Map* si el PPD Aviar inoculado presenta un engrosamiento en la piel mayor; entre 2 y 5 mm. (Chiodini y col., 1984a; Dunn y col., 2005).

Como ya mencionamos la sensibilidad y especificidad de la prueba son bajas, debido a reacciones cruzadas con otras micobacterias y otros microorganismos (de Lisle y col., 1980, Chiodini y col., 1984a, Blood y col., 1989). La utilización de la prueba ELISA-IFN- γ ha sido descrita como una herramienta importante para la detección de casos subclínicos (Chiodini, 1996, Stabel, 2000). Es una prueba rápida para la detección de paratuberculosis y tuberculosis. Generalmente animales infectados presentan linfocitos en su circulación que pueden reconocer antígenos específicos de Mycobacterias. La mayoría de los estudios indican que el ensayo de IFN γ es significativamente más sensible que la prueba intradérmica cutánea para el diagnóstico de la PT (Dunn y col., 2005; Gwozdz y col., 2000; Stabel y Whitlock, 2001b). Según Huda y col. (2003,2004) este test tiene mayor utilidad en la detección de animales jóvenes, (entre 1 y 2 años) que han sido expuestos al *Map* que los test que detectan respuesta humoral.

También se han desarrollado técnicas serológicas que detectan la presencia de anticuerpos, IDGA y ELISA; siendo esta última la de mayor sensibilidad y más útil para detectar cuadros subclínicos a diferencia de técnicas más antiguas, clásicas y simples de implementar como son la Inmunodifusión en Gel Agar. Ambas son técnicas rápidas, baratas, fáciles de ejecutar sin mucho equipamiento, la toma de muestras no entraña dificultades y para el caso del ELISA, automatizable para su uso a gran escala (Juste y col., 1990a, Garrido y col., 2000a).

Wells y col. (2002) reportan que el cultivo bacteriológico detecta microorganismos en heces mientras que el ELISA detecta anticuerpos circulantes, por lo que se podría esperar que los dos test no presenten acuerdo en animales individuales y señalan a su vez que el ELISA es el test más conveniente y más utilizado como prueba de tamiz para analizar un gran número de animales. Según Withlock y col. (2000) la sensibilidad de la prueba ELISA relativa al cultivo de heces es de 87% para animales con sintomatología clínica, 75% en animales que eliminan grandes cantidades de *Map* en heces y 15% en animales bajos eliminadores. Wells y col. (2002), reportan que la sensibilidad del ELISA relacionada al cultivo de heces es mayor en rodeos con bajo numero de eliminadores fecales (66% en rodeos con menos de 5% de eliminadores fecales de *Map*, 36% en rodeos con más del 15% de eliminadores fecales).

La prueba de ELISA, según Paolicchi y col. (2003), es un test sensible, comparado con el cultivo de heces, donde solo un aislamiento no se correlacionó con el resultado del ELISA. Sin embargo encontraron dos animales con cultivo de leche positivos, cultivo de heces negativo y ELISA negativo, lo que sugeriría que la eliminación por leche se produce en los estados tempranos de la infección, pero para poder concluir esto último deberán estudiarse más animales. No obstante, la frecuencia de detección de animales eliminadores en heces es alta y además, la magnitud de los resultados del ELISA están directamente relacionadas con la probabilidad de que el animal esté infectado y excretando mycobacterias en sus heces, lo que permite detectar los animales infecciosos de un rebaño (Collins y col., 2005).

A su vez han sido descritas (Sweeney y col., 1994; Winterhoff y col., 2002; Nielsen y col., 2002a; Collins y col., 2005) altas sensibilidades de la prueba de ELISA

para muestras individuales de leche, y buena concordancia con resultados en suero, para el diagnóstico de paratuberculosis bovina. Por otro lado, varios autores han reportado bajas sensibilidades y/o correlaciones de resultados en muestras individuales de leche en comparación con el suero. (Hardin y Thorne, 1996; Hendrick y col., 2005 a,b). Muchos factores pueden estar influyendo, así como los diferentes kits comerciales de ELISA utilizados en estos trabajos, y la etapa de lactancia en que las muestras fueron tomadas.

Nielsen y col. (2002a) demostraron que en el principio de la lactancia, la probabilidad de resultar positivo fue más alta en el ELISA en leche, mientras que en el ELISA en suero fue mayor al final de la misma. A su vez, tanto en suero como en leche resultaron positivas a partir del segundo parto (Nielsen y col., 2002 a, Kudahl y col., 2004). Contrariamente a otros autores (Hardin y Thorne, 1996; Hendrick y col., 2005b), Van Weering y col. (2007), encontraron una clara, aunque no lineal, relación entre los resultados en muestras de leche individuales y muestras de suero. Sin embargo, los valores de absorbancia en muestras de leche individual fueron generalmente más bajos que en las muestras de suero (Winterhoff y col., 2002). También la repetibilidad de los valores de muestras positivas de leche pareció ser buena, lo que es importante para obtener resultados consistentes en programas de control y estudios longitudinales (Van Weering y col., 2007).

El carácter multifásico o espectral de la enfermedad, hace imposible la adopción de una técnica de referencia única, y si se pretende obtener un diagnóstico de gran sensibilidad y especificidad, debe aplicarse una combinación de técnicas, y hacerlo de manera repetida si es posible (Sevilla, 2007).

Como ya mencionamos, el Map produce alteraciones a nivel del intestino delgado, disminuyendo la capacidad de absorción de nutrientes y causado hipoproteïnemia. Esto conduce a una progresiva disminución de la producción y de peso reflejándose en la condición corporal (CC). A su vez la paratuberculosis al ser una enfermedad crónica que posee un período subclínico variable, dependiendo de la susceptibilidad del animal, carga bacteriana presente y que en este período es el momento en que empieza a manifestarse disminución de absorción de nutrientes llevando a una pérdida de peso, que puede pasar desapercibida o puede ser atribuida a otras etiologías (ya sea carenciales, infecciosas, parasitarias, tóxicas u otras) hasta que se observa clínicamente la diarrea intermitente.

Es por esto que surge la interrogante de la existencia de una asociación entre los animales con enfermedad subclínica y una baja condición corporal.

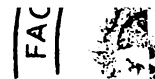
La asignación de grados para clasificar animales por CC es un método subjetivo que permite estimar la cantidad de energía que tiene almacenada como músculo y como grasa, y de esta forma evaluar su estado nutricional (energético). (Orcasberro, 1997).

Las escalas de clasificación se obtienen basándose en lo siguiente: 1) en la palpación de algunas zonas del animal; lomo (apófisis espinosas y transversas) y el área de inserción de la cola; 2) en la palpación y la apreciación visual del animal o 3) sólo la apreciación visual del animal (Orcasberro, 1997).

Las evaluaciones de algunas escalas de CC han demostrado que permiten predecir la composición del animal en forma tan o más exacta que el peso vivo y otras mediciones iniciales (diámetro del tórax, altura de la cruz, etc) del animal (Orcasberro, 1997).

El entrenamiento de observadores sin experiencia es muy rápido y tiene la ventaja frente a las escalas que emplean palpación de que los animales pueden ser apartados en el campo sin necesidad de trasladarlos a los corrales. (Orcasberro., 1997).

4. OBJETIVO GENERAL



Comparación de la prueba de ELISA en suero y leche para el diagnóstico de Paratuberculosis bovina en ganado lechero, y evaluación de su asociación con la condición corporal.

4.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- Implementación y puesta a punto de la prueba de ELISA en leche para la detección de anticuerpos contra el *Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis (Map)*.
- Evaluación de la asociación entre las dos pruebas de ELISA.
- Estudiar la asociación entre la condición corporal de los animales y su status frente a la Paratuberculosis.

5. MATERIALES Y METODOS

Se tomaron muestras de 408 animales bovinos en lactación, de un total de nueve establecimientos lecheros con antecedentes de diarrea crónica, ubicados en los departamentos de Colonia y San José, Uruguay.

Se utilizaron los establecimientos enmarcados dentro del proyecto INIA – FPTA 241 “Paratuberculosis bovina, una limitante en el desarrollo de la producción lechera en el Uruguay”.

El muestreo fue realizado al azar. Se tomaron un total de 406 muestras individuales de sangre y 402 de leche (pool de los cuatro cuartos), valorándose a la vez la condición corporal en 321 animales.

Los animales se encontraban bajo similares condiciones de manejo reproductivo, nutricional y sanitario (similar programa de vacunación). Lo que estandariza la probabilidad de manifestar una condición corporal buena (mayor a 2,5) o mala (menor o igual a 2,5).

Cada muestra individual tanto de sangre como de leche fue procesada utilizando el Kit comercial de ELISA indirecto Pourquoi® que según Collins y col. (2005) es uno de los más sensibles y el más específico del mercado.

Este Kit cuenta con la ventaja de tener en la fase sólida un antígeno proveniente de una proteína protoplásmica del *Map*. Además, previamente es incubado con un extracto de *Mycobacterium phlei* para neutralizar cualquier posible reacción cruzada con mycobacterias atípicas, procedimiento que llevaron a cabo Yokomizo y col. (1986) demostrando que incrementa la especificidad del ELISA para el diagnóstico de *Map*.

La interpretación de la prueba de ELISA se realizó a partir de los valores de densidad óptica obtenidos con un filtro de 450 nm (DO_{450}). Este valor se obtuvo a partir de la fórmula: $S/P = (DO_{450} \text{ de la muestra} - DO_{450} \text{ control negativo} / DO_{450} \text{ del control positivo} - DO_{450} \text{ control negativo}) \times 100$.

Siguiendo las recomendaciones del fabricante cualquier muestra de suero sanguíneo con un S/P igual o menor a 60% es considerado que proviene de un animal que no fue infectado por *Map* (negativo). En el caso de que el S/P se encuentre entre 60 y 70% se lo considera sospechoso, por lo que se necesitaría una segunda prueba para confirmar el estatus sanitario. Si el S/P supera o iguala el 70% los animales a partir de los cuales proviene la muestra fueron infectados por *Map* (positivos).

Se consideró positiva la muestra láctea con valores de S/P superior o igual a 40%, mientras que los sospechosos se encuentran en el rango de 30-40%. Siendo los negativos igual o menor que 30%, según las indicaciones del kit.

5.1. Muestras de Sangre.

Se extrajo de la vena coccígea 10 ml de sangre de cada animal y se colocó en tubos de borosilicato de 100 x 10 mm rotulados. En el laboratorio y luego de producido el proceso de formación del coágulo, se centrifugaron 10 minutos a 3000 rpm, se separó el suero, y se congeló inmediatamente en dos viales hasta su posterior procesamiento. La sangría se realizó con agujas descartables de 18G x 1 y ½ y jeringas descartables de 10ml, utilizándose una por cada animal. Los sueros fueron conservados a fin de que mantengan sus características bioquímicas e inmunológicas. Se identificaron y almacenaron en viales de 1,5 ml en freezer de -20° C. Las muestras de sangre fueron procesadas por la prueba de ELISA indirecto (Kit comercial Pourquoi[®]).

5.2. Muestras de Leche.

Se extrajo de cada animal una muestra de leche de 10ml (pool de los cuatro cuartos). Las muestras de leche se obtuvieron por ordeño manual en frascos de PVC de 60 ml roturados. Las muestras de leche fueron descremadas mediante centrifugación por 10 minutos a 3.500 r.p.m. y la fracción clarificada se conservó a -20°C para su posterior análisis. Las muestras de leche fueron procesadas por la prueba de ELISA indirecto (Kit comercial Pourquoi[®]).

5.3. Observación de la condición corporal.

La observación de la condición corporal se basó en la escala de 1 al 5 descrita por Ferguson y col, (1994); teniendo en cuenta la cobertura de grasa presente en el cuerpo. Siendo el 1 el emaciado, el 2 el flaco, 3 el correspondiente a delgado moderado, el 4 bueno a gordo y el 5 muy buen estado.

Se observó la condición corporal de 321 animales, los cuales se discriminaron en dos grupos. El primero denominado "0" incluye los animales con condición corporal mayor a 2,5 mientras que el grupo "1" abarca los animales emaciados y flacos (menor o igual a 2,5).

A su vez se recabaron datos individuales de los animales (etapa de lactancia).

5.4. Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó preservando las características del diseño, utilizando el software estadístico STATA 10.0.

La estimación de la prevalencia se realizó ponderando por el inverso de la probabilidad de cada animal de ser incluido en la muestra.

Se utilizó el coeficiente kappa, propuesto originalmente por Cohen (1960) para el caso de dos evaluadores o dos métodos, por lo que a menudo se le conoce

como kappa de Cohen, y fue generalizado para el caso de más de dos evaluadores por Fleiss, por lo que a veces también se habla del índice kappa de Fleiss.

Landis y Koch (1977) propusieron unos márgenes para valorar el grado de acuerdo en función del índice kappa (cuadro 1).

kappa	Grado de acuerdo
< 0,00	Sin acuerdo
>0,00 - 0,20	Insignificante
0,21 - 0,40	Discreto
>0,41 - 0,60	Moderado
0,61 - 0,80	Sustancial
0,81 - 1,00	Casi perfecto

Cuadro 1: Márgenes para valorar el grado de acuerdo en función del índice kappa.

Debe tenerse en cuenta que la escala anterior de valoración del índice κ , como los propios autores resaltan, es arbitraria y además, el valor del índice κ no sólo depende de los acuerdos observados, sino también de los esperados.

El índice de concordancia kappa tiene gran utilización en la literatura clínico-epidemiológica, esto se debe tanto a la facilidad de cálculo, como a su clara interpretación (Hospital Universitario Ramón y Cajal. Material docente de la unidad de bioestadística clínica, 2009). Sin embargo tiene sus problemas y limitaciones. El principal problema radica en que está pensada para clasificaciones nominales, en las que no existe un orden de graduación entre las diferentes categorías. En el caso del estudio de la prueba de ELISA en suero de sangre y leche para diagnóstico de Paratuberculosis bovina, esto se vio sorteado, puesto que sólo se tomaron dos categorías independientes (positivo o negativo) sin considerar los sospechosos debido a los escasos datos obtenidos (3 animales).

En el caso de la asociación entre la condición corporal y los resultados de las pruebas de ELISA, se utilizó el cociente p/q denominado "odds", que indica cuánto más probable es que los positivos (a una o ambas pruebas) se encuentren en el grupo "1" (animales emaciados, flacos) que en el grupo "0" de CC.

Se realizó un modelo de Regresión Logística sobre CC como variable de respuesta, el cual incluyó cómo variables independientes el diagnóstico a PT y el establecimiento.

Collins y col. en 1993 encontraron que los animales con un valor de DO intermedio eran más probables de ser positivos que negativos. Por esta razón se consideraron los sospechosos como positivos para el cálculo.

6. RESULTADOS



6.1. Resultados serológicos:

En el cuadro 1 se discriminaron los resultados a partir de los datos de teniendo en cuenta la no existencia de resultados sospechosos.

Estab.	S/P≤60		60<S/P<70		S/P≥70		Total
	animales	%	animales	%	animales	%	
1	45	100	0	0	0	0	45
2	44	97,78	0	0	1	2,22	45
3	44	100	0	0	0	0	44
4	43	93,48	0	0	3	6,52	46
5	43	93,48	0	0	3	6,52	46
6	47	97,92	0	0	1	2,08	48
7	44	97,78	0	0	1	2,22	45
8	44	95,65	0	0	2	4,35	46
9	41	100	0	0	0	0	41
Total	395	97,29	0	0	11	2,71	406

Cuadro 2: Resultados de serología a Map.

La seroprevalencia proyectada a la población animal de estos 9 establecimientos (1811 vacas en lactación) es de 3,2% (IC 95% 0,7% - 5,7%).

6.2. Resultados del ELISA en leche:

De los datos de S/P se clasificaron los resultados de la siguiente manera:

Estab.	S/P≤30		30<S/P<40		S/P≥40		Total
	Animales	%	animales	%	animales	%	
1	40	90,91	0	0	4	9,09	44
2	45	100	0	0	0	0	45
3	40	90,91	1	2,27	3	6,82	44
4	43	95,56	0	0	2	4,44	45
5	44	91,67	1	2,08	3	6,25	48
6	46	95,83	1	2,08	1	2,08	48
7	45	100	0	0	0	0	45
8	44	97,78	0	0	1	2,22	45
9	38	100	0	0	0	0	38
Total	385	95,77	3	0,75	14	3,48	402

Cuadro 3: Resultados de leche a Map.

En cuanto a los 402 datos del ELISA en leche se obtuvo una prevalencia proyectada a la población animal de estos 9 establecimientos (1796 vacas en lactación) del 4% (IC 95% 1,3% - 6,7%). Siendo un 95,77% (385 animales) sin

presencia de anticuerpos para *map*, 3,48% (14 animales) positivos y el resto sospechosos (0,75%).

6.3. Comparación de resultados de ELISA:

En el gráfico número 1 se presenta el diagrama de dispersión de los resultados de ELISA en leche y suero en los 400 animales a los cuales se les realizó ambas pruebas.

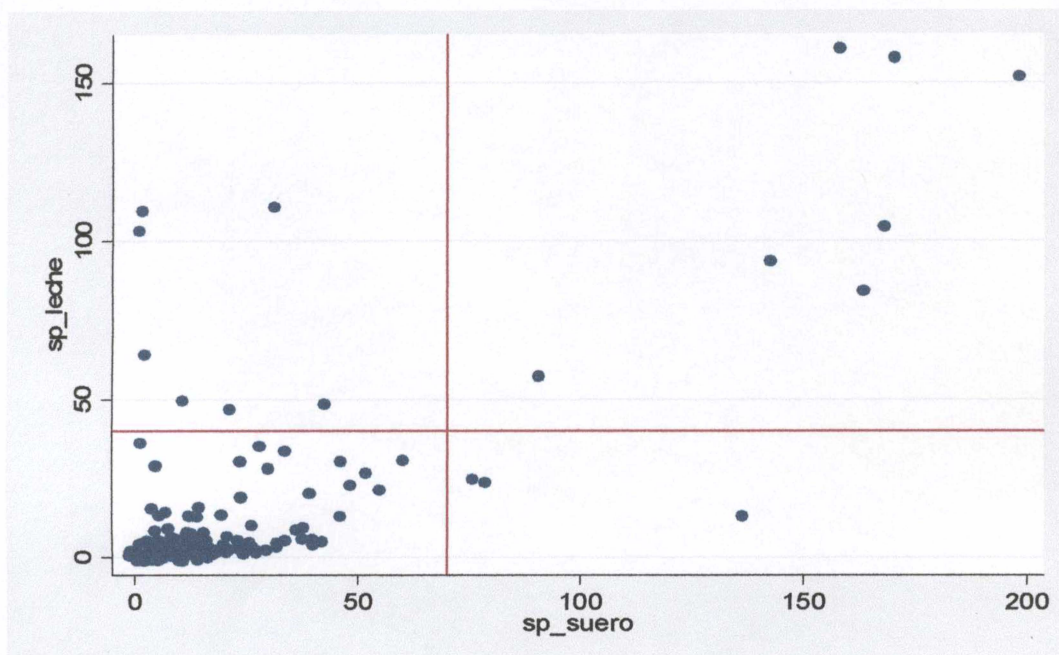


Grafico 1: comparación entre los resultados de ELISA en suero y leche.

Las líneas muestran el punto de corte para los valores positivos. La horizontal indica un sp-leche de 40, mientras que la vertical un sp-suero de 60.

Estas dividen el gráfico en cuatro cuadrantes, en los cuales los positivos y negativos a ambas pruebas se agruparon en el superior derecho e inferior izquierdo respectivamente. En el caso de los cuadrantes restantes se concentraron los animales en los cuales no existió acuerdo entre las pruebas (con muestras positivas a una de ellas).

6.4. Resultados del grado de acuerdo entre las distintas pruebas de ELISA.

La concordancia entre las dos pruebas de ELISA (sangre y leche) utilizando κ de Cohen fue 0,5707 y fue significativo ($p < 0.01$). Según la clasificación de Landis y Koch (1977) el grado de acuerdo entre las distintas técnicas se denomina moderado.

6.5. Resultados de la evaluación de la condición corporal:

cc	0	1	TOTAL
1,5	0	1	1
2	0	7	7
2,25	0	8	8
2,5	0	79	79
2,75	75	0	75
3	93	0	93
3,25	37	0	37
3,5	17	0	17
3,75	3	0	3
4	1	0	1
TOTAL	226	95	321

Cuadro 4: Resultados de la observación de la condición corporal agrupados en mala ("1") y buena ("0").

6.6. Resultados de la comparación entre la observación de la condición corporal y el diagnóstico por ELISA.

CC	Positivo S o L (X=1)	Sospechoso	Negativo (X=0)
1	9	2	84
0	6	0	220
Total	15	2	304

Cuadro 5: Comparación entre condición corporal y resultados de ELISA.

En este caso el valor del OR obtenido fue 5,57 (I.C. 95% de 1,25 a 27,6) y fue significativo ($p=0,035$).

7. DISCUSION

Luego de implementar la prueba de ELISA en leche para la detección de anticuerpos contra el *Map*, se pudo ver que como muchos autores describían es una técnica sencilla y práctica, que no requiere de mucha experiencia.

Del total de los animales muestreados (n=406) el 97,29% (395) fueron negativos a la prueba realizada en suero sanguíneo, mientras que 11 animales (2,71%) resultaron positivos y ningún sospechoso. La seroprevalencia proyectada a la población animal de estos 9 establecimientos es de 3,2%. En contraposición a lo expuesto por Nuñez y col (2006) que encontraron una seroprevalencia proyectada en 8 de los 9 establecimientos de nuestro estudio (1681 vacas en lactación) de 15,44% (IC 95% 9,3 – 21,6). Lo cual nos indica una disminución de la misma desde esa fecha (2006) hasta ahora. Esto se puede explicar por las medidas de control tomadas, como ser la pasteurización de la leche previo a su utilización para la alimentación de los terneros, sabiendo que el *Map* es sensible a esta temperatura y que los terneros son la categoría más sensible a la infección; o por un aumento en la especificidad del kit utilizado (Pourquier®) en relación al estudio previo.

En cuanto a los 402 animales testeados con la prueba de ELISA para muestras de leche, se observó que el 95,77% (385 animales) no presentaban anticuerpos para *map*. 3,48% (14 animales) resultaron positivos y el resto sospechosos (0,75%). Cuando se evaluó la prevalencia proyectada a la población animal de estos 9 establecimientos (1796 vacas en lactación) se notó que era un 0,8% mayor a la expuesta por la serología. Lo que puede estar indicando que a la hora de hacer un estudio de prevalencia de la enfermedad se pueden usar ambos test indistintamente.

En el gráfico 1 se puede apreciar que la gran mayoría (380) de los animales se encuentran en el cuadrante inferior izquierdo, lo que implica que fueron negativos a ambas pruebas, mientras que 10 animales fueron positivos a una de las dos pruebas diagnósticas y 7 resultaron positivos a ambas (cuadrante superior derecho).

Una de las causas de la diferencia presente en los positivos a una de las pruebas y no a ambas, puede deberse al momento de la lactación en que se encontraba el animal. Nielsen y col. (2002a) demostraron que en el principio de la lactancia, la probabilidad de resultar positivo fue más alta en el ELISA en leche, mientras que en el ELISA en suero la probabilidad fue mayor al final de la misma.

En este estudio a la hora de evaluar en qué etapa de la lactación se encontraban las vacas con resultado positivo a una o ambas pruebas se halló que la mayoría de los animales que resultaron positivos sólo al ELISA en leche (4 animales del total) estaban en la primera semana de lactancia, lo que concuerda con lo observado por Nielsen y col. (2002a). A su vez si tenemos en cuenta el estudio realizado por Hardin y col. (1996) de comparación de éstas técnicas; para prevenir en los resultados de la prueba de ELISA en leche, el efecto del incremento de la concentración de IgG en el calostro, se descartaron los animales con un período posparto menor a diez días.

En cuanto a la edad de los animales Huda y col. (2004) describieron que la técnica de ELISA (tanto suero como leche) es la adecuada a la hora de evaluar el estatus serológico frente a la Paratuberculosis en los animales mayores de tres años. Considerando el manejo del rodeo lechero muestreado y la fecha de muestreo, todos los animales en lactación estaban en ésta categoría.

Sin embargo no se pudo evaluar en este estudio, por falta de información, en que número de lactancia (número de parto) se encontraban todas las vacas, parámetro a tener en cuenta según Nielsen y col. 2002a, Kudahl y col. 2004 ya que la probabilidad de resultar positivo es mayor tanto en suero como en leche a partir del segundo parto.

No se debe perder de vista que la sensibilidad de esta técnica depende del estadio de la enfermedad (Dargatz y col., 2001), siendo mayor cuando el ganado excreta el microorganismo por las heces (Collins y col., 1991; Sweeney y col., 1994), y que tiene una menor sensibilidad cuando se trata de animales que no están clínicamente enfermos (Collins y col., 1991; Ridge y col., 1991; Sweeney y col., 1995; Whitlock y col., 2000; Collins y col., 2005), como en este caso.

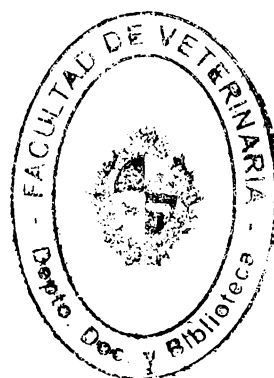
Algunos estudios tratan sobre la utilización de la prueba ELISA en leche (Sweeney y col., 1994), incluso como indicador de la estimación de la prevalencia de rebaños utilizando muestras de leche de tanque (Nielsen y col., 2000, Beyerbach y col., 2004). Nielsen y col. 2002; Stabel y Goff 2004; Collins y col. 2005; Hardin y col. 1996, compararon la prueba de ELISA en suero con leche, encontrando un bajo acuerdo entre ambas, mientras que Hendrick y col. en 2005, en un estudio en el que comparan el ELISA en leche, en suero y el cultivo de heces encuentran una mala concordancia entre ambos ELISA, pero una buena asociación entre el ELISA en leche y el cultivo de heces. Varios autores, (Klausen y col., 2003, Sweeney y col., 1994, Winterhoff y col., 2002; Klausen y col., 2003, Munjal y col., 2004, Salgado y col., 2005, Hendrick y col., 2005; Lombard y col., 2006) evalúan la prueba de ELISA en suero y leche, encontrando diferencias entre los resultados de ambas, pero manteniendo una concordancia aceptable. También sus resultados sugieren una alta sensibilidad de ambos test en rodeos con animales clínicamente enfermos e indican que las muestras de leche pueden ser más convenientes de usar.

El grado de acuerdo entre las pruebas obtenido en nuestro estudio es de un kappa (κ) de Cohen de 0,5707, éste puede ser clasificado como un acuerdo moderado entre ambas pruebas dado que el rango comprende valores entre 0,40 y 0,60, aplicando lo descrito por Landis y Koch (1977), acorde a lo citado por éstos últimos autores.

En cuanto a la CC se puede apreciar en el cuadro 4, que 226 animales pertenecen al grupo "0", mientras que 95 animales (29,6%) se encuentra en el grupo "1". Dentro de estos con mala CC, 9 de los mismos son positivos a una o ambas pruebas y 2 de ellos sospechosos.

Si bien Antognoli y col., (2008), describen que no existe relación estadística significativa entre ambos, es menester destacar que la elección de los animales utilizados para su estudio fue dirigida y no al azar, basándose en el resultado de ELISA (en suero) y características antemortem (diarrea y CC). La mayoría de los animales tenían resultado positivo al ELISA y se agregaron algunos con buena CC y ELISA negativo. A diferencia de nuestro estudio donde los animales fueron seleccionados al azar (con la única premisa de que hubiera antecedentes de diarrea crónica, sin diagnóstico serológico). Sin embargo son pocos los reportes que asocian el status sanitario frente a la Paratuberculosis y la condición corporal.

En nuestro estudio encontramos una asociación significativa entre la positividad (incluyendo los sospechosos) con una mala CC, cuya magnitud se expresa por un alto OR=5,57. La significación del OR esta dada porque difiere de 1 ($p=0,035$), por esto se puede inferir que un animal con mala CC tiene 5,57 veces más probabilidad de ser positivo que negativo. Es una aproximación al riesgo que tiene un animal positivo de tener mala condición corporal.



8. CONCLUSIÓN

Se pudo implementar la prueba de ELISA en leche para la detección de anticuerpos contra el *Map* la cual es una herramienta sencilla y práctica.

A su vez se comprobó la concordancia entre ésta prueba y el ELISA en suero para Paratuberculosis bovina en ganado lechero mayor de 3 años en lactancia. De esta manera podemos decir que la prueba de ELISA en leche se puede usar como prueba diagnóstica ya que arroja similares resultados que la realizada en suero.

En cuanto a la asociación entre el status sanitario frente a la Paratuberculosis y la condición corporal, se puede concluir que los animales con resultado positivo a la prueba de ELISA (una o ambas) son los que presentan menor condición corporal.

Por esto sugerimos que cuando se quiera implementar un programa de control sanitario frente a la PT, se debe elegir los animales con baja condición corporal (menor o igual a 2,5) en caso de que no haya ninguno con manifestación de diarrea crónica al momento de la toma de muestras para realizar la prueba de ELISA.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Allen, W.M., Patterson, D.S. y Slater, T.F. (1974b). A biochemical study of experimental Johne's disease. Protein metabolism in sheep and mice. *J. Comp. Pathol.*, 84: 391-398.
2. Aller, B., Fernández-Díez, M. y Escudero-Díez, A. (1973). Paratuberculosis ovina. *Sup. Cient. Boletín Informativo Cons. Gen. Col. Vet. Esp.*, 196: 11-18.
3. Antognoli, M.C., Garry, F.B., Hirst, H.L., Lombard, J.E., Dennis, M.M., Gould, D.H., Salman, M.D., (2008). Characterization of *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* disseminated infection in dairy cattle and its association with antemortem test results. *Vet. Microbiol.* 127: 300-308.
4. Benedictus, G., Dijkhuizen, A.A., Stelwagen, J., (1997). Economic losses due to paratuberculosis in dairy cattle. *Vet. Rec.* 121: 142-146.
5. Beyerbach, M., Ortmann, G., Gerlach, G.F., Homuth, M., Strutzberg, K. y Kreienbrock, L. (2004). Considerations concerning diagnostic certainties and cut-off values for a bulk milk ELISA for *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis*. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.*, 111: 220-225.
6. Blood, D.C. y Radostits, O.M. (1989). Paratuberculosis (Johne's disease). *Veterinary Medicine*. ed. 7. London, UK. p. 722-729.
7. Buergelt, C.D., Duncan, J.R., (1978). Age and milk production data of cattle culled from a herd with paratuberculosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 173: 478-480.
8. Cassamagnaghi, A., (1947). Enfermedad de Johne's, los primeros casos reconocidos en bovinos del Uruguay. *An. Fac. Vet.*, 5, 1: 83-104.
9. Cavestany, D., Mendez, J.E., (1993). Manual de inseminación artificial en bovinos. INIA, Boletín Divulgación 39: 78-80.
10. Cetinkaya, B., Erdogan, H., Morgan, K. (1998). Prevalence, incidence and geographical distribution of Jonhe's disease in cattle in England and the Welsh borders. *Vet. Record* 143: 265-269.
11. Chiodini, R.J., Van Kruiningen, H.J., Merkal, R.S., Thayer Jr., W.R., Coutu, J.A., (1984). Characteristics of an unclassified *Mycobacterium* species isolated from patients with Crohn's disease. *J. Clin. Microbiol.* 20: 966-971.
12. Chiodini, R.J., Van Kruiningen, H.J. y Merkal, R.S. (1984a). Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): The current status and future prospects. *Cornell Vet.* 74: 218-262.
13. Chiodini, R.J. y Van Kruiningen, H.J. (1986a). The prevalence of paratuberculosis in culled New England cattle. *Cornell Vet.* 76: 91-104.

14. Chiodini, R.J., Davis, W.C. (1993). The cellular immunology of bovine paratuberculosis: immunity may be regulated by CD4+helper and CD8+ immunoregulatory T lymphocytes which down-regulate gamma/delta+ T-cell cytotoxicity. *Microbiol. Pathol.* 14: 347–355.
15. Chiodini, R., Rossiter, C., (1996). Paratuberculosis: a potential zoonosis? *Vet. Clin. North America: Food Anim. Pract.* 12: 457-467.
16. Cocito, C., Gilot, P., Coene, M., De Kesel, M., Poupart, P., Vannuffel, P., (1994). Paratuberculosis. *J. Clin. Microbiol. Rev.* 7: 328-345.
17. Cohen, J., (1960). A coefficient of agreement for nominal scales. *Educ. Psychol. Means* 20: 37-46.
18. Collins, M.T., Keneflick, K.B., Sockett, D.C., Lambrecht, R.S., McDonald, J. y Jorgensen, J. (1990b). Enhanced radiometric detection of *Mycobacterium paratuberculosis* by using filter-concentrated bovine fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.* 28: 2514-2519.
19. Collins, M.T., Sockett, D.C., Ridge, S., Cox, J.C., (1991). Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for Johne's disease. *J. Clin. Microbiol.* 29: 272–276.
20. Collins, M.T., Sockett, D., Goodger, W.J., Conrad, T.A., Thomas, C.B., Carr, D.J. (1994). Herd prevalence and geographic distribution of, and risk factors for, bovine paratuberculosis in Wisconsin. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 204: 636-641.
21. Collins, M.T., (1996). Diagnosis of paratuberculosis. *Vet. Clin. North America: Food Anim. Pract.* 12: 357-371.
22. Collins, D.M., Cavaignac, S., de Lisle, G.W., (1997). Use of four DNA insertion sequences to characterize strains of the *Mycobacterium avium complex* isolated from animals. *Mol. Cell. Probes* 11: 373–380.
23. Collins, M.T., Lisby, G., Moser, C., Chicks, D., Christensen, S., Reicheldefer, M., Hoiby, M., Harms, B., Thomsen, O., Skibsted, U., Binder, V., (2000). Results of Multiple
24. Diagnostic Tests for *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in Patients with Inflammatory Bowel Disease and in Controls . *J. Clin. Microbiol.* 38 (12) p. 4373–4381.
25. Collins, M.T., Wells, S.J., Petrini, K.R., Collins, J.E., Schultz, R.D., Whitlock, R.H., (2005). Evaluation of five antibody detection tests for diagnosis of bovine paratuberculosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12: 685–692.
26. Corpa, J.M., Garrido, J.M., García Marín, J.F. y Pérez, V. (2000a). Classification of lesions observed in natural cases of paratuberculosis in goats. *J. Comp. Pathol.* 122: 255-265.
27. Coussens, P. (2001). *Mycobacterium paratuberculosis* and the bovine immune system. *Anim. Health Res. Rev.* 2: 141-161.

28. Coussens, P. (2004). Model for Immune Response to *Mycobacterium avium* ssp. *Paratuberculosis* in cattle. *Infect. Immun.* 72: 3089-3096.
29. Crossley, B.M., Zagmutt-Vergara, F.J., Fyock, T.L., Whitlock, R.H. y Gardner, I.A. (2005). Fecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by dairy cows. *Vet. Microbiol.* 107: 257-263.
30. Dargatz, D.A., Byrum, B.A., Barber, L.K., Sweeney, R.W., Whitlock, R.H., Shulaw, W.P., Jacobson, R.H., Stabel, J.R., (2001). Evaluation of a commercial ELISA for diagnosis of paratuberculosis in cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 218(7):1163-1166.
31. de Lisle, G.W., Seguin, P., Corner, A.H. y Duncan, J.R. (1980). Bovine paratuberculosis: A herd study using complement fixation and intradermal test. *J. Comp. Med.* 44: 177-182.
32. Dunn, J.R., Kaneene, J.B., Grooms, D.L., Bolin, S.R., Bolin, C.A., Bruning-Fann, C.S. (2005). Effects of positive results for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* as determined by microbial culture of feces or antibody ELISA on results of caudal fold tuberculin test and interferon-gamma assay for tuberculosis in cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 226: 429-435.
33. Eamens, G.J., Whittington, R.J., Marsh, I.B., Turner, M.J., Saunders, V., Kemsley, P.D. y Rayward, D. (2000). Comparative sensitivity of various faecal culture methods and ELISA in dairy cattle herds with endemic Johne's disease. *Vet. Microbiol.* 77: 357-367.
34. Feinstein A.R., Cicchetti D.V., (1990). High agreement but low kappa: I. The problem of two paradoxes, *J. Clin. Epidemiol.* 43: 543-549.
35. Ferguson, J.D., Galligan, D.T., Thomsen, N., (1994). Principal descriptors of body condition score in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 77: 2695-2703.
36. García Marín, J.F., Pérez, V., García de Jalón, J.A., De las Heras, M., Barberá, M., Fernández de Luco, D. y Badiola, J.J. (1994). Diagnóstico de casos clínicos de paratuberculosis ovina y caprina. *Med.Vet.*, 11: 491-502.
37. Garrido, J.M., Aduriz, G., Juste, R.A. y Geijo, M.V. (2000a). Los métodos de diagnóstico de la paratuberculosis en el ganado vacuno. En: Juste, R. *Paratuberculosis bovis*. Aula Veterinaria, vol. 93, Madrid, España. p. 49-61.
38. Garrido, J.M., Cortabarría, N., Oguiza, J.A., Aduriz, G. y Juste, R.A. (2000b). Use of a PCR method on fecal samples for diagnosis of sheep paratuberculosis. *Vet. Microbiol.* 77: 379-386.
39. Gasteiner, J., Awad-Másalmeh, M., Baumgartner, W. (2000). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle in Austria, diagnosis with culture, PCR, ELISA. *Vet. Microbiol.* 77: 339-349.

40. Giese, S.B. y Ahrens, P. (2000). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk from clinically affected cows by PCR and culture. *Vet. Microbiol.* 77: 291-297.
41. Gilmour, N.J.L. y Angus, K.W. (1991). Johne's disease. En: Martin, W. B. y Aitken, I. D. *Diseases of sheep*. ed. 2. Blackwell Scientific Publications. Oxford, UK. p. 95-99.
42. Grant, I.R., Ball, H.J. y Rowe, M.T. (2002). Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in bulk raw and commercially pasteurized cows' milk from approved dairy processing establishments in the United Kingdom. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 2428-2435.
43. Gwozdz, J.M., Thompson, K.G., Murray, A., Reichel, M.P., Manktelow, B.W., West, D.M. (2000). Comparison of three serological test and an interferon γ assay for the diagnosis of paratuberculosis in experimentally infected sheep. *Aus. Vet. J.* 78: 779-783.
44. Hardin, L.E., Thorne, J.G., (1996). Comparison of milk with serum ELISA for the detection of paratuberculosis in dairy cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 209: 120-122.
45. Harris, N.B., Barletta, R.G. (2001). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. *Clin. Microbiol. Rev.* 14: 489-512.
46. Hendrick, S., Duffield, T., Leslie, K., Lissemore, K., Archambault, M., Kelton, D., (2005a). The prevalence of milk and serum antibodies to *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in dairy herds in Ontario. *Can. Vet. J.* 46: 1126-1129.
47. Hendrick, S.H., Duffield, T.E., Kelton, D.E., Leslie, K.E., Lissemore, K.D., Archambault, M., (2005b). 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.
48. Huda, A. y Jensen, H.E. (2003). Comparison of histopathology, cultivation of tissues and rectal contents, and interferon-gamma and serum antibody responses for the diagnosis of bovine paratuberculosis. *J. Comp. Pathol.* 129: 259-267.
49. Huda, A., Jungersen, G., Lind, P., (2004). Longitudinal study of interferon-gamma, serum antibody and milk antibody responses in cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*, *Vet. Microbiol.* 104: 43-53.
50. Jakobsen, M.B., Alban, L., Nielsen, S.S. (2000). A cross-sectional study of paratuberculosis in 1155 Danish dairy cows. *Prev. Vet. Med.* 46: 15-27.
51. Johanson, Y.J., Kaneene, J.B., (1997). Epidemiology and economic impact of subclinical Johne's disease: a review. *Vet. Bull.* 67: 437-446.

52. Johnson-Ifeorunlu, Y.J., Kaneene, J.B. (1999). Distribution and environmental risk factors for paratuberculosis in dairy cattle herds in Michigan. *Aust. Vet. J.* 60: 589-596.
53. Johnson-Ifeorunlu, Y.J., Kaneene, J.B., Sprecher, D., Gardiner, J.C., Lloyd, J.W., (2000). The effect of subclinical *Mycobacterium paratuberculosis* infection on days open in Michigan USA dairy cows. *Prev. Vet. Med.* 46: 171-181.
54. Jorgensen, J.B. (1982). An improved medium for culture of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine faeces. *Acta Vet. Scand.* 23: 325-335.
55. Juste, R.A. y Aduriz, J.J. (1990a). Diagnóstico. En: Juste, R.A. *Paratuberculosis. ovis*, Aula Vet. Madrid, España. p. 49-62.
56. Juste, R.A., Marco, J.C., Saez de Ocariz, C. y Aduriz, J.J. (1991b). Comparison of different media for the isolation of small ruminant strains of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 28: 385-390.
57. Juste, R.A., Aduriz, G., Bascones, M., Foley, E., Bargar, T.W. y Barletta, R.G. (1993). Effect of iron on mycobactin production and dependence in *Mycobacteria*. *Proc. 74th Annu. Meet. C.R.W.A.D. Chicago, IL, USA.* p. 64.
58. Juste, R.A., García Marín, J.F., Peris, B., Sáez de Ocariz, C. y Badiola, J.J. (1994). Experimental infection of vaccinated and non-vaccinated lambs with *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Comp. Pathol.* 110: 185-194.
59. Kalis, C.H., Barkema, H.W., Hesselink, J.W., van Maanen, C. y Collins, M.T. (2002). Evaluation of two absorbed enzyme-linked immunosorbent assays and a complement fixation test as replacements for fecal culture in the detection of cows shedding *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *J. Vet. Diagn. Invest.* 14: 219-224.
60. Kennedy, D.J. y Benedictus, G. (2001). Control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in agricultural species. *Rev. Off. Int. Epizoot.* 20: 151-179.
61. Klausen, J., Hudab, A., Ekeröth, Ahrens, P., (2003). Evaluation of serum and milk ELISAs for paratuberculosis in Danish dairy cattle. *Prev. Vet. Med.* 58: 171-178.
62. Kruip, T.A., Muskens, J., Van Roermund, H.J., Bakker, D. y Stockhofe-Zurwieden, N. (2003). Lack of association of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with oocytes and embryos from moderate shedders of the pathogen. *Theriogenology*, 59: 1651-1660.
63. Kudahl, A., Nielsen, S.S. y 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.

64. Lane, S.J., Marshall, P.S., Upton, R.J., Ratledge, C., Ewing, M. (1995). Novel Extracellular Mycobactins, the Carboxymycobactins from *Mycobacterium avium*. Tetrahedron Letters. 36: 4129-4132.
65. Landis, J.R., Koch, G.G., (1977). The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics 33:159-174.
66. Latour, J., Abraira, V., Cabello, J.B., López Sánchez, J., (1997). Métodos de investigación en cardiología clínica (IV). Las mediciones clínicas en cardiología: validez y errores de medición. Rev Esp Cardiol 50:117-128.
67. Levy-Frebault, V.V. y Portaels, F. (1992). Proposed minimal standards for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium* species. Int. J. Syst. Bacteriol. 42: 315-23.
68. Lombard, J.E., Garry, F.B., McCluskey, B.J., Wagner, B.A., (2005). Risk of removal and effects on milk production associated with paratuberculosis status in dairy cows. J. Am. Vet. Med. Assoc. 227: 1975–1981.
69. Lombard, J.E., Byrem, T.M., Wagner, B.A. y McCluskey, B.J. (2006). Comparison of milk and serum enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in dairy cattle. J. Vet. Diagn. Invest. 18: 448-458.
70. Lovell, R., Levi, M.L. y Francis, J. (1944). Studies on the survival of Johne's bacilli. J. Comp. Pathol. 34: 120-129.
71. Minnikin, D.E. (1982). Lipids: Complex Lipids, Their Chemistry, Biosynthesis and Roles. En: Ratledge, C. y Stanford, J. Physiology, Identification and Classification. The Biology of the Mycobacteria. Academic Press. London, UK. p. 95-184.
72. Moreira, A.R., Paolicchi, F., Morsella, C., Zumarraga, M., Cataldi, A., Fabiana, B., Alicia, A., Piet, O., van Soolingen, D. e Isabel, R.M. (1999). Distribution of IS900 restriction fragment polymorphism types among animal *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from Argentina and Europe. Vet. Microbiol. 70: 251-259.
73. Munjal, S.K., Boehmer, J., Beyerbach, M., Strutzberg-Minder, K. y Homuth, M. (2004). Evaluation of a LAM ELISA for diagnosis of paratuberculosis in sheep and goats. Vet. Microbiol. 103:107-114.
74. Muskens, J., Barkema, H.W., Russchen, E., van Maanen, K., Schukken, Y.H., Bakker, D. (2000). Prevalence and regional distribution of paratuberculosis in dairy herds in the Netherlands. Vet. Microbiol. 77: 253-261.
75. Muskens, J., van Zijdervelt, F., Eger, A., Bakker, D. (2002). Evaluation of the long term immune response in cattle after vaccination against paratuberculosis in two dairy herds. Vet. Microbiol. 86: 269-278.
76. Newsholme, S.J. y Pletcher, J.M. (1981). A mycobateriosis in a sheep resembling paratuberculosis (Johne's disease). J. Vet. Assoc. 143-144.

77. Nielsen, S.S., Enevoldsen, C., Grohn, Y.T., (2002a). The *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* ELISA response by parity and stage of lactation. *Prev. Vet. Med.* 54: 1–10.
78. Nordlund, K.V., Goodger, W.J., Pelletier, J., Collins, M.T., (1996). Associations between subclinical and milk production, milk components, and somatic cell counts in dairy herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 208 (11): 1872-1896.
79. Nuñez, A., (2006). Paratuberculosis bovina en Ganado Lechero en la Cuenca Sur del país. Tesis Maestría. Posgrado Facultad Veterinaria Montevideo, Uruguay. p. 1-40.
80. Núñez, A., Piaggio, J., Zaffaroni, R., Cernichiaro, N., Suanes, A., De Freitas, J., Huertas, S., Gil, A., (2003). Seroprevalence study of bovine paratuberculosis in dairy herds in Uruguay. *Proceedings of the XI International Congress in Animal Hygiene. ISAH 2003*, 23-27. México. p. 493-495.
81. Orcasberro, R., (1997). Estado corporal, control del amamantamiento y performance reproductiva de rodeos de cría. En Carámbula, M., Vaz Martins, D., Indarte, E. *Pasturas y producción animal en áreas de ganadería extensiva*. 2ª. ed. Montevideo, INIA, p. 158-169.
82. Ott, S., Wells, S.J., Wagner, B.A., (1999). Herd-level economic losses associated with Johne's diseases on US dairy operations. *Prev. Vet. Med.* 40(3-4):179-192.
83. Paolicchi, F., Vagnozzi, A., Morsella, C., Verna, A., Mássone, A., Portiannsky, E., Gimeno, J. (2001), Paratuberculosis in Red Deer (*Cervus elephus*): an Immunohistochemical study. *J. Vet. Med.* 48: 313-320.
84. Paolicchi, F., Zumarraga, M., Gioffre, A., Zamorano, P., Morsella, C., Verna, A., Cataldi, A., Alito, A., Romano, M. (2003). Application of Different Methods for the Diagnosis of Paratuberculosis in a Dairy Cattle Herd in Argentina. *J. Vet. Med.* 50: 20–26.
85. Paolicchi, F., (2004). Paratuberculosis: Métodos de diagnóstico y perspectivas de control. XXXII Jornadas Uruguayas de Buiatría, Uruguay. p. 127-131.
86. Piaggio, J., Nuñez, A., Gil, A., (2002). Johne's disease serological prevalence in Uruguayan dairy cows. En Juste, R., Geijo, M., Garrido, J. *Proceedings of the 7º International Colloquium of Paratuberculosis*. International Association for Paratuberculosis, Bilbao, España. p. 455-456.
87. Raizman, E.A., Wells, S.J., Jordan, P.A., DelGiudice, G.D. y Bey, R.R. (2005). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from freeranging deer and rabbits surrounding Minnesota dairy herds. *Can. J. Vet. Res.* 69: 32-38.

88. Ratledge, C. (1982). Nutrition, Growth and Metabolism. En: Ratledge, C. y Stanford, J. Physiology, Identification and Classification. The Biology of the *Mycobacteria*. Academic Press. London. p. 185-271.
89. Ridge, S.E., Morgan, I.R., Sockett, D.C., y col. (1991). Comparison of the Johne's absorbed EIA and the complement-fixation test for the diagnosis of Johne's disease in cattle. *Aust. Vet. J.* 68: 253-257.
90. Salgado, M., Manning, E.J. y Collins, M.T. (2005). Performance of a Johne's disease enzyme-linked immunosorbent assay adapted for milk samples from goats. *J. Vet. Diagn. Invest.* 17: 350-354.
91. Sanderson, J.D., Moss, M.T., (1992). The *Mycobacterium Paratuberculosis* DNA in Crohn's disease tissues. *Gut* 33: 890-896.
92. Schroen, C.J., Kluver, P.F., Butler, K.L., McDonald, W.L., Hope, A.F. y Condrón, R.J. (2003). Factors affecting the survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in soil. En: Juste, R.A. Proc. 7th Int. Coll. Paratub. Madison, WI, USA. p. 10-15.
93. Schwartz, B.D., De Voss, J.J. (2001). Structure and absolute configuration of mycobactin J. *Tetrahedron Letters.* 42: 3653-3655.
94. Seaman, J.T. y Thomson, D.R. (1984). Johne's disease in sheep. *Aust. Vet. J.* 61: 227-229.
95. Sergeant, E.S. y Baldock, F.C. (2002a). The estimated prevalence of Johne's disease infected sheep flocks in Australia. *Aust. Vet. J.* 80: 762-768.
96. Sergeant, E.S., Marshall, D.J., Eamens, G.J., Kearns, C. y Whittington, R.J. (2003). Evaluation of an absorbed ELISA and an agar-gel-immuno-diffusion test for ovine paratuberculosis in sheep in Australia. *Prev. Vet. Med.* 61: 235-248.
97. Sevilla, I. (2007). Caracterización molecular, detección y resistencia de *mycobacterium avium subespecie Paratuberculosis*. Tesis doctoral Universidad del País Vasco, País Vasco. p. 1-113.
98. Sigurðardóttir, O., Valheim, M., Press, C. (2004). Establishment of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in the intestine of ruminants. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 56: 819-834.
99. Shin, S.J., Chang, Y.F., Huang, C., Zhu, J., Huang, L., Yoo, H.S., Shin, K., Stehman, S., Shin Sang, J., Torres, A. (2004). Development of a polymerase chain reaction test to confirm *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in culture. *J. Vet. Diagn. Invest.* 16: 116-120.
100. Shinnick, T.M. y Good, R.C. (1994). Mycobacterial taxonomy. *J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 13: 884-901.

101. Stabel, J.R., (1996). An improved method for cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples and comparison to three other methods. *J. Vet. Diagn. Invest.* 9: 375-380. 18(28).
102. Stabel, J.R., (2000). Johne's Disease and milk: Do consumers Lane, S.J., Marshall, P.S., Upton, R.J., Ratledge, C., Ewing, M., (1995). Novel Extracellular Mycobactins, the Carboxymycobactins from *Mycobacterium avium*. *Tetrahedron Letters*, 36, (23): 4129-4132.
103. Stabel, J.R. y Whitlock, R.H. (2001b). An evaluation of a modified interferon-gamma assay for the detection of paratuberculosis in dairy herds. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 79: 69-81.
104. Stahl, D.A. y Urbance, J.W. (1990). The division between fast- and slow-growing species corresponds to natural relationships among the mycobacteria. *J. Bacteriol.* 172: 116-124.
105. Streeter, R.N., Hoffis, G.F., Bech-Nielsen, S., Shulaw, W.P. y Rings, M. (1995). Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from calostrum and milk of subclinically infected cows. *Am. J. Vet.* 56: 1322-1324.
106. Strommenger, B., Stevenson, K., Gerlach, G. (2001). Isolation and diagnostic potential of ISMav2, a novel insertion sequence-like element from *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *FEMS Microbiol. Letters.* 196: 31-37.
107. Sweeney, R.W., Whitlock, R.H. y Rosenberger, A.A. (1992a). *Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. *J. Clin. Microbiol.* 30: 166-171.
108. Sweeney, R.W., Whitlock, R.H., Buckley, C.L., Spencer, P., Rosenberger, A.E., Hutchinson, L.J., (1994). 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.
109. Sweeney, R.W., Whitlock, R.H., Buckley, C.L., Spencer, P.A., (1995). Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7 (4), 488-493.
110. Sweeney, R. (1996). Transmission of Paratuberculosis. En: *Vet. Clin. North Am.* Sweeney, R. The W.B. Saunders Company, Philadelphia. *Food Animal Practice.* 12: 305-312.
111. Taylor, T.K., Wilks, C.R. y McQueen, D.S. (1981). Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from the milk of a cow with Johne's disease. *Vet. Rec.* 109: 532-533.
112. Thoen, C.O. y Muscoplat, C.C. (1979). Recent developments in diagnosis of paratuberculosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 174: 838-840.

113. Thompson, D.E., (1994). The rol of mycobacteria in Crohns disease. J. Med. Microbiol. 41: 74-94.
114. Valentin-Weigand, P. y Goethe, R. (1999). Pathogenesis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections in ruminants: still more questions than answers. Microbes. Infect. 1: 1121-1127.
115. Van Weering, H. y col., (2007). Diagnostic performance of the Pourquier ELISA for detection of antibodies against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in individual milk and bulk milk samples of dairy herds, Vet. Microbiol. 125: 49-58.
116. Wayne, L.G. y Kubica, G.P. (1986). Mycobacteria. Family *Mycobacteriaceae* Chester 1897. En: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. y Holt, J.G. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore, MD, USA. p. 1436-1457.
117. Wells, S.J., Whitlock, R.H., Wagner, B.A., Collins, J., Garry, F., Hirst, H., Lawrence, J., Saville, W.J., Naugle, A.L., (2002). Sensitivity of test strategies used in the Voluntary Johne's Disease Herd Status Program for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* infection in dairy cattle herds. J. Am. Vet. Med. Assoc. 220(7): 1053-1057.
118. Whan, L.B., Grant, I.R., Ball, H.J., Scott, R. y Rowe, M.T. (2001). Bactericidal effect of chlorine on *Mycobacterium paratuberculosis* in drinking water. Letters Microbiol. 33: 227-231.
119. Whitlock, R.H., Rosenberger, A.E., Siebert, M., Sweeney, R.W., (1992). Environmet contamination of dairy farms with cattle infected with *Mycobacterium paratueberculosis*. Proc. XVII World Buiatrics Congr., St Paul, MN. p. 84.
120. Whitlock, R.H., Buergelt, C. (1996). Preclinical and clinical manifestation of paratuberculosis. In The Veterinary Clinics of North America, Sweeney, R. The W.B. Saunders Company, Philadelphia. Food Animal Practice. 12: 345-356.
121. Whitlock, R.H., Rosenberger, A.E., Sweeney, R.W., Spencer, P.A., (1996). Distribution of *M. paratuberculosis* in tissues of cattle from herds infected with Johne's disease. In: Chiodini, R.J., Hines, M.E., Collins, M.T. (Eds.). Proceedings of the Fifth
122. International Colloquium on Paratuberculosis, Madison, WI, USA, p. 168-171.
123. Whitlock, R.H. (1998). Johne's disease (Paratuberculosis): diagnostic tests for individual animal and the herd. En: Junta ANEMBE. V Congr. Int. Med. Bov. Sitges, Cataluña, España. p. 69-72.

124. 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 (3-4): 387-398.
125. Whittington, R., Marsh, I., Choy, E. y Cousins, D. (1999). Polymorphism in IS1311, an insertion sequence common to *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, can be used to distinguish between and within these species. *Mol. Cell. Probes.* 12: 349-358.
126. Whittington, R.J., Fell, S., Walker, D., McAllister, S., Marsh, I., Sergeant, E., Taragel, C.A., Marshall, D.J. y Links, I.J. (2000a). Use of pooled fecal culture for sensitive and economic detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 38: 2550-2556.
127. Whittington, R.J., Reddacliff, L., Marsh, I., McAllister, S. y Saunders, V. (2000c). Temporal patterns and quantification of excretion of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in sheep with Johne's disease. *Aust. Vet. J.* 78: 34-37.
128. Whittington, R.J., Taragel, C.A., Ottaway, S., Marsh, I., Seaman, J. y Fridriksdottir, V. (2001d). Molecular epidemiological confirmation and circumstances of occurrence of sheep (S) strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cases of paratuberculosis in cattle in Australia and sheep and cattle in Iceland. *Vet. Microbiol.* 79: 311-322.
129. Whittington, R.J., Marshall, D.J., Nicholls, P.J., Marsh, I.B. y Reddacliff, L.A. (2004). Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 2989-3004.
130. Whittington, R.J., Marsh, I.B. y Reddacliff, L.A. (2005). Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dam water and sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 5304-5308.
131. Wilson, D.J., Rossiter, C., Han, H.R., Sears, P.M., (1993). Association of *Mycobacterium paratuberculosis* infection with reduced mastitis, but with decreased milk production and increased cull rate in clinically normal dairy cows. *Am. J. Vet. Res.* 54 (11): 1851-1857.
132. Wilson, D.J., Rossiter, C.A., Han, H.R. y Sears, P.M. (1997). Financial effects of *Mycobacterium paratuberculosis* on mastitis, culling and milk production in clinically normal dairy cattle. En: Chiodini, Hines, y Collins. *Int. Coll. Paratub.* Rehoboth, MA, USA. p. 151-158.
133. Winterhoff, C., Beyerbach, M., Homuth, M., Strutzberg, K., Gerlach, G.F., (2002). Establishment and evaluation of an ELISA for the detection of antibodies in milk against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 109: 230-234.

134. Yokomizo, Y., (1986). Evaluation on an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using *Mycobacterium phlei*-absorbed serum for the diagnosis of bovine paratuberculosis in a field study. Jap. Ag. Res. Q. 20: 60-67.
135. Yokomizo, Y., Yugi, H., Merkal, R.S., (1985). A method of avoiding false-positive reactions in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculosis. Jap. J. Vet. Sci. 47: 111-119.
136. Yokomizo, Y., Merkal, R.S., Lyle, P. (1983). Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine immunoglobulin G1 antibody to a protoplasmic antigen of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* . Am. J. Vet. Res; 44: 2205-2207.
137. Hospital Universitario Ramón y Cajal. Material docente de la unidad de bioestadística clínica (2009). Disponible en http://www.hrc.es/bioest/M_docente.html. Fecha de consulta: 12 de mayo de 2009.