

PARATUBERCULOSIS BOVINA EN GANADO LECHERO

Alvaro Núñez Alesandre, DMTV, MSc.
Facultad de Veterinaria, Uruguay.
DILAVE, MGAP, Uruguay.

1. RESUMEN

La Paratuberculosis, también conocida como Enfermedad de Johne es una enfermedad entérica crónica, producida por una bacteria: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, caracterizada en bovinos por diarrea crónica, pérdida de peso y muerte. Actualmente se la asocia con una enteritis en humanos, conocida como enfermedad de Crohn. La seroprevalencia puede ser asociada a varios factores: tamaño del rodeo, condiciones ambientales, cuidados con el ternero, manejo de vaquillonas preñadas, prácticas de manejo y eliminación del estiércol. El objetivo de este estudio es determinar la seroprevalencia de la Paratuberculosis en rodeos lecheros de Florida y Colonia, mediante un muestreo serológico transversal y evaluar la asociación con prácticas de manejo a través de un estudio de casos y controles analizados en un modelo de regresión logística. La estimación de la seroprevalencia proyectada a la población bajo estudio fue de $5,6\% \pm 1,3$ y un $70,2\% \pm 8,1$ de los establecimientos resultaron con al menos un animal seropositivo. Mediante un modelo multivariable de regresión logística se encontró que el número de vacas en ordeño y la variable correspondiente a si en el área de parto encierran o tratan animales enfermos presentaba una tendencia a estar asociada a la seroprevalencia. Establecimientos con más de 180 vacas en ordeño tienen casi 5 veces menos probabilidad de tener paratuberculosis que los más pequeños. La distancia de la fuente de agua de bebida al estercolero presentó una asociación positiva con la seroprevalencia. Se destaca el alto número de establecimientos con al menos 1 animal seropositivo, mientras que la seroprevalencia es similar a la encontrada en la mayoría de los estudios realizados en el mundo.

INTRODUCCIÓN

La Paratuberculosis, también conocida como Enfermedad de Johne es una enfermedad entérica crónica y progresiva de los rumiantes y animales silvestres, producida por una bacteria: *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* (Map), gram positiva, facultativa, ácido alcohol resistente, mycobactin dependiente y caracterizada clínicamente en bovinos por diarrea crónica, debilidad, pérdida de peso, hipoproteinemia y muerte. Esta enfermedad se encuentra en la Lista de Enfermedades del Código Internacional de Salud Animal de la OIE (Organización Mundial de la Salud Animal).

En 1826, D'Aroval reportó la ocurrencia de diarrea crónica en ganado. Posteriormente Hansen y Nielsen en

1881 observaron el engrosamiento y corrugación de la mucosa intestinal en ganado muerto con esa forma especial de enteritis. En 1895 Johne y Frothingham demostraron la presencia de bacilos ácido alcohol resistentes en secciones del intestino de ganado con enteritis. Bang en 1906 distinguió entre enteritis tuberculosa y no tuberculosa, proponiendo el término enteritis pseudotuberculosa. El agente recién fue aislado por primera vez de bovinos por Twort en 1910, que lo caracterizó como micobacteria y lo denominó *Mycobacterium enteriditis chronicae pseudotuberculosis bovis johnes*. Después de la caracterización total del *Mycobacterium paratuberculosis* como una especie distinta en el género *Micobacteria* se la denominó Paratuberculosis o enfermedad de Johne. (Chiodini, R. y col. 1984; Cocito C. y col. 1994).

Los animales se contagian siendo terneros, pero no evidencian la enfermedad hasta después de los 2 años. Después de un largo periodo de incubación que puede ser de años, los bovinos comienzan a eliminar cantidades detectables de Map en heces, el que puede sobrevivir en el medio ambiente, en la tierra, agua y materia fecal por largo tiempo. (Chiodini, R. y col. 1984; Cocito C. y col. 1994). A pesar de que los casos clínicos se eliminan de los rodeos, animales que cursan la enfermedad subclínicamente pueden causar pérdidas económicas importantes debido a una menor producción y un pobre comportamiento reproductivo (Johnson-Ifearulundu Y.J. y col. 1997, Johnson-Ifearulundu Y.J. y col. 2000). Aunque no se la considera zoonosis, actualmente hay reportes que la asocian con una grave enteritis en humanos llamada enfermedad de Crohn, habiéndose incluso aislado el *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* de biopsias de intestino de pacientes con esa enfermedad (Chiodini, R.J. y col. 1984; Chiodini, R.J. 1989; Sanderson, J.D. y col. 1992; Collins M.T. y col. 2000; Stabel, J.R. 2000). Las prácticas de manejo de los establecimientos lecheros pueden influenciar la transmisión de *M. paratuberculosis* del ganado adulto a los jóvenes, por lo que la identificación y la asociación de estas con la seroprevalencia puede resultar de suma utilidad tanto para conocer aspectos epidemiológicos como para establecer criterios a ser utilizados en la prevención de la enfermedad.

Los antecedentes en Uruguay indican que fue diagnosticada por primera vez en el año 1944 por Cassamagnaghi A. y Cassamagnaghi A. (h), (1947), que estudiaron casos clínicos de animales con diarrea crónica y emaciación. Estudios posteriores de Errico F. y col. (1983) aislaron el agente en rodeos lecheros y de animales con sospecha clínica de la enfermedad y desde entonces, han reportado casos fundamentalmente en rodeos lecheros. Estudios que realizaron en un periodo de cinco años a partir de muestras patológicas con lesiones granulomatosas



se destaca que el 21% eran del grupo *M. avium*.

Errico F. y col., en 1990 realizaron un ensayo sobre control de la enfermedad en establecimientos lecheros, donde recomiendan medidas a fin de controlar la enfermedad, basadas en un correcto diagnóstico, medidas de manejo e higiene. Aunque desde 1944 se describen casos clínicos de la enfermedad, se desconocía cuál era la situación de los rodeos lecheros del país en cuanto a la seroprevalencia del *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis, elemento imprescindible para planificar estrategias de control. Estudios recientes (Piaggio y col., 2002; Núñez y col., 2003, Núñez A., 2006) determinaron la seroprevalencia en rodeos lecheros de la cuenca lechera más importante de Uruguay así como estudios sobre factores asociados a la enfermedad.

Estudios realizados por el NAHMS-USDA (Sistema Nacional de Monitoreo en Salud Animal del Departamento de Agricultura), analizando los resultados del Programa Dairy' 96 desde el punto de vista económico, determinó que los establecimientos con presencia del agente pierden U\$S 200 por vaca y por año. Ott y col en 1999, estudiaron la importancia económica de la Paratuberculosis bovina a nivel de los rodeos lecheros, concluyendo que las pérdidas son muy grandes y ocurren en rodeos de todos los tamaños y regiones. Las pérdidas económicas se atribuyen tanto a la enfermedad clínica como a la infección subclínica. Estas incluyen la reducción de la eficiencia alimenticia, menor producción de leche, disminución de la grasa y proteínas de la leche, pérdidas de peso, disminución de la fertilidad, pérdidas del potencial genético por refugio de animales genéticamente superiores e incremento de la incidencia de mastitis.

El agente etiológico de la Paratuberculosis bovina es el *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis, (Map), bacteria gram positiva, ácido alcohol resistente, intracelular facultativa, con un tamaño entre 0,5 a 1,5 μm y resistente a los tratamientos debido a su pared celular fuerte, relativamente rica en lípidos y con un lipopolisacárido, lipoarabinomannan (LAM). Perteneciente a la familia Mycobacteriaceae, se caracteriza por su lento crecimiento in vitro, por producir colonias rugosas no pigmentadas y por la dependencia de la presencia de Mycobactin, quelante del hierro en el medio de cultivo para su desarrollo. El Map tiene la condición de suspender su metabolismo, manteniéndose inactivo por meses. Esto permitiría que el microorganismo persista en el medio ambiente, más de dos años en el agua y nueve meses en las heces. Pero debido a que el Map es un patógeno obligado, necesita para replicarse estar en el organismo animal. Su gruesa y fuerte pared celular lo hace más resistente al tratamiento térmico. 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. Se conocen dos tipos de sideróforos, mycobantina y exoquelina. La primera es interna a la bacteria y las exoquelinas 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 Mycobactina es un complejo de alto peso molecular, caracterizado por un núcleo lipídico. La Mycobactina 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, R.J y col 1984; Cocito C. y col.1994).

El Map esta antigénica y genéticamente relacionado con el *Mycobacterium avium* subsp. avium (Maa), *Mycobacterium avium* subsp. silvaticum (Más), con los que forman el *Mycobacterium avium* complex, Mac. De acuerdo a estas similitudes se ha propuesto al Map como una subespecie de *M. avium*. Las diferencias genéticas más relevantes que distinguen el Maa del Map son la presencia en este último, de secuencias de inserción denominadas IS900 e ISMav2. Estas secuencias son específicas de Map y son usadas como blanco para la detección por PCR. (Cocito C. y col. 1994 ; Harris N.B. y col. ; Motiwala A.S. y col. 2006). Los hallazgos patológicos se centran a nivel intestinal, donde los cambios macroscópicos afectan principalmente la porción terminal del ileon el que se presenta engrosado, edematoso, con la mucosa corrugada, y con los ganglios linfáticos agrandados y edematosos

Numerosas técnicas de diagnóstico han sido desarrolladas buscando la detección del agente causal de la enfermedad, pero este hecho es muy variable, dependiendo de la sensibilidad y especificidad de cada test. El cultivo bacteriológico de heces es el método más confiable y específico pero tiene la desventaja de ser poco sensible y de requerir 12 semanas de incubación y comúnmente resultar contaminado por lo que se han desarrollado procedimientos que llevan a reducir esta contaminación tanto de bacterias como de hongos basados en la utilización del medio de Herrold y antibióticos 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, R.J. y col., 1984; Stabel, J R. 1996). Se han desarrollado técnicas serológicas que detectan la presencia de anticuerpos, siendo la Técnica de ELISA la de mayor sensibilidad y la más útil para detectar cuadros subclínicos a diferencia de las técnicas más antiguas, clásicas y simples de implementar como son la Inmunodifusión en Gel Agar y la Fijación de Complemento que a pesar de ser más específicas no sirven para detectar estadios tempranos. Recientemente se han desarrollado métodos de diagnóstico moleculares utilizando sondas de DNA para heces y PCR. La utilización de PCR en leche ha tomado auge en los últimos tiempos (Collins M.T. 1996; Collins D.M. y col



1997). Los anticuerpos contra la Paratuberculosis son producidos en los animales en los estadios tardíos de la infección. La mayoría de los estudios de seroprevalencia han sido realizados en rodeos lecheros y utilizan la prueba de ELISA para la detección serológica como prueba de tamiz para detección de anticuerpos contra Map, método considerado el más estandarizado para caracterizar el status sanitario en rodeos (Wells y col. 2002). También se ha propuesto al muestreo ambiental por cultivo bacteriano, como una alternativa para la detección de rodeos positivos a paratuberculosis (Raizman y col. 2004). La respuesta inmune a la infección con Map 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. 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. La detección de la enfermedad subclínica resulta de mucha utilidad para establecer criterios de prevención. La utilización de la prueba ELISA IFN- γ que detecta la respuesta inmunitaria mediada por células ha sido descrita como una herramienta importante para la detección de casos subclínicos. La otra herramienta diagnóstica para detectar este tipo de inmunidad se basa en la prueba intradermocutánea comparada, inoculando PPD aviar y bovis en tabla del cuello. (Chiodini, R.J. 1996, Stabel, J.R. 2000).

Se han realizado numerosos estudios de seroprevalencia de la enfermedad, encontrándose en algunos países resultados de seroprevalencia baja (Gasteiner J. y col 1999). Diferentes estudios en Estados Unidos muestran que la enfermedad está presente en los rodeos lecheros. Collins M.T. y col en 1994 en un muestreo aleatorio transversal de 158 rodeos y 4990 animales testeados encuentran una seroprevalencia aparente de 7,2%, con un 50% de los rodeos con al menos 1 animal positivo. Otros estudios (Johnson-Ifearulundu Y.J. y col 1999) presentan que en el estado de Michigan un 6,9% de bovinos serológicamente positivos, con un 54% de establecimientos con más de 2 animales reaccionantes. Estudios en Europa muestran resultados muy variables, en Inglaterra un 17,4% de rodeos presentan evidencias de la enfermedad (Cetinkaya B. y col. 1998); en Holanda se encuentran resultados de seroprevalencia de 2,5% con un 55% de los rodeos con 1 o más animales reaccionantes positivos (Muskens J. y col 2000). En Dinamarca encuentran valores individuales más altos, 8,8%, pero con 19 de 22 establecimientos testeados con al menos 1 animal seropositivo. (Jakobsen M.B. y col. 2000). En Argentina, en la Provincia de Buenos Aires se presentan resultados de 26,5% en ganado de carne y 56% en ganado lechero, mientras que en el resto de Provincias testadas la

seroprevalencia oscila entre 0% y 7%. (Paolicchi F. y col. 2002).

El riesgo potencial de introducir la enfermedad y diseminarla, se ha estudiado comparando prácticas de manejo con rodeos positivos o negativos, ya sea seleccionados por serología, cultivo de heces o por sintomatología clínica (Muskens J. y col. 2003). Existen numerosos estudios que asocian factores y prácticas de manejo con la presencia de la enfermedad. Los estudios sobre estas asociaciones utilizan una encuesta con la que se obtienen información sobre prácticas de manejo, antecedentes sanitarios, datos productivos y reproductivos y la mayoría utiliza la prueba de ELISA para detección de anticuerpo como prueba para estimar el estatus de infección del rodeo. (Johnson-Ifearulundu Y.J. y Kaneene J.B. 1998; Johnson-Ifearulundu Y.J., Kaneene J.B. 1999).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la seroprevalencia de la Paratuberculosis en rodeos lecheros de la cuenca sur del país y generar hipótesis respecto a los factores de manejo asociados a la seroprevalencia de la enfermedad.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Determinar la seroprevalencia de la Paratuberculosis bovina a nivel de animales en los rodeos lecheros de los departamentos de Colonia y Florida
- 2 Determinar la Seroprevalencia de la Paratuberculosis bovina a nivel de establecimientos de los departamentos de Florida y Colonia.
- 3 Mediante un estudio de casos y controles estimar los factores o variables asociados a la seroprevalencia.

MATERIALES Y METODOS

Se realizaron dos muestreos de establecimientos lecheros, el primero correspondió al año 2001 con participación voluntaria y un segundo muestreo, en el 2003 donde se realizó un muestreo aleatorio representativo de la población.

La estrategia planteada para el estudio del 2001 consistió en trabajar con grupos de profesionales veterinarios y los productores lecheros por ellos asesorados. Los veterinarios participantes se plantearon como el nexo natural entre el equipo de trabajo del proyecto y los productores lecheros.

El área involucrada en los muestreos correspondió a parte del departamento de Colonia y a Florida. Los muestreos abarcaron ambas unidades de información e interés, establecimientos y animales. La región involucrada



en este estudio cuenta con un universo en el entorno de los 1.000 establecimientos, lo cual representa casi una cuarta parte de los tambos de todo el país. Los análisis de laboratorio fueron desarrollados en el Laboratorio del Departamento de Rumiantes y Suinos de la Facultad de Veterinaria.

Datos relevados: recolección de información. Formularios de riesgo, prácticas de manejo y toma de muestras de sangre.

Se realizó una encuesta en cada establecimiento recabando la información a través de entrevista personal con el encargado del mismo. El cuestionario incluyó preguntas sobre características físicas y prácticas de manejo general del establecimiento.

También se realizó un cuestionario estructurado en base a preguntas cerradas ej. (Si/No) donde se buscó evaluar prácticas relacionadas a la presencia de Paratuberculosis bovina, las que se estratificaron por categoría terneros pre-destete y post-destete, vaquillonas y vacas adultas.

Además de las entrevistas personales la información se complementó con: observación in situ, utilización de bases de datos ya existentes y toma de muestras de los animales. Las observaciones se realizarán sobre los aspectos de instalaciones, higiene ambiental y características de los animales. Las muestras tomadas fueron de sangre.

En la 1ª. Etapa del muestreo 2001 se identificaron los productores a través de la selección de los veterinarios de campo. En el estudio transversal (muestreo aleatorio) se realizó un muestreo estratificado por departamentos en las secciones policiales involucradas en el proyecto.

El único criterio de exclusión aplicado para participar en el proyecto fue el número de vacas, siendo excluidos los establecimientos con una población inferior a 30 vacas. La metodología del muestreo se desarrolló en dos etapas: en la primera se seleccionarán los establecimientos y en la segunda etapa se seleccionaron los animales. El estudio realizado en el 2001 implicó 52 establecimientos lecheros y el muestreo representativo del 2003 incluyó 40 establecimientos. Del total de establecimientos estudiados; 67 pertenecientes al departamento de Florida, 25 al departamento de Colonia.

En la segunda etapa del muestreo, en todos los casos, los animales se seleccionarán por muestreo aleatorio sistemático. La categoría muestreada fueron las vacas y en todos los casos muestrearán al menos 20 vacas en ordeño de las cuales se trató de que 5 fueran de primera parición.

De los 52 tambos del primer muestreo, 40 pertenecen al departamento de Florida y 12 al departamento de Colonia. De los 40 tambos del segundo muestreo fueron:

28 de Florida, y 12 de Colonia.

El diseño pretendió detectar problemas sanitarios que afectaran al 5% o más de los establecimientos a un nivel de confianza del 95%. Dentro de los establecimientos el poder del muestreo fue para detectar problemas que afectaran al menos un 15% de las vacas con un nivel de confianza del 95%.

Los marcos de referencia utilizados a los efectos de comparaciones poblacionales y en los estudios transversales fueron las bases de datos de DICOSE, 2001 y 2003. En los años del estudio (2001-2003), en Florida los tambos considerados representaron entre el 83 y 86% de la población total, en Colonia la representación estuvo entre el 75 y 77%. En lo que respecta a las vacas lecheras los porcentajes fueron: Florida del 97 al 98%, Colonia del 95 al 96%.

Las estimaciones de seroprevalencia se realizan a partir del muestreo aleatorio estratificado, mientras que para el estudio de casos y controles se utilizan ambos muestreos.

Como ya se mencionó en los establecimientos seleccionados se tomaron muestras de sangre de 20 animales adultos en producción. Para la extracción de sangre se utilizaron jeringas descartables de 10 ml y agujas 18 G x 1 y ½. La toma se hizo de la vena caudal por venopunción. La sangre se depositó en tubos de vidrio de 100 x 16 mm, fueron identificadas con la clave del establecimiento y con la identificación del tubo, el que se correlacionaba en una planilla con la identificación individual del animal, en este caso caravanas. Posteriormente se colocaban en conservadoras con refrigerante y se enviaron al laboratorio de Facultad de Veterinaria para su procesamiento.

El total de muestras de sangre remitidas al laboratorio fue de 2224, siendo la población referencial de 123.000 animales. En Florida se tomaron muestras de 1622 animales, y en Colonia 602.

Las muestras una vez llegadas al laboratorio de Facultad de Veterinaria fueron centrifugadas, se separó el suero y se envasó por duplicado a viales de 1,5 ml. los que se identificaron, rotularon y congelaron a -20°C hasta su procesamiento.

Se realizó el diagnóstico de laboratorio para Paratuberculosis bovina siguiendo algunos de los métodos recomendados por el manual de la OIE y los procedimientos del proveedor del kit diagnóstico.

Para la detección de anticuerpos contra la Paratuberculosis se utilizó la técnica de enzyme linked immunoassay (ELISA). Se empleó el kits comercial de IDEXX Lab (HerdChek M.pt.) que detecta la presencia de anticuerpos contra M.Paratuberculosis en suero o plasma y es recomendado para ser usado como prueba de tamiz. La presencia o ausencia de anticuerpos es determinada por el cociente entre las densidades ópticas muestra/control positivo según protocolo del laboratorio productor del kit. Si este cociente es ≥ 0.25 la muestra es considerada positiva a la presencia de anticuerpos contra Mycobacterium Paratuberculosis. Según el proveedor la sensibilidad del

kit es en casos clínicos del 90% y en animales que padecen la enfermedad en forma subclínica del 50%, mientras que la especificidad de la prueba es del 99%.

Para estimar la seroprevalencia en Bovinos los datos se ponderaron de acuerdo al diseño, considerando el tamaño del establecimiento (en número de vacas), el marco geográfico del estudio (estratos de Florida y Colonia) y la estrategia de selección, realizando las proyecciones a la población mediante las rutinas para análisis de "survey data" del software STATA-8.

El estudio de los factores asociados a la seroprevalencia de Paratuberculosis en los establecimientos se realizó mediante un estudio de casos y controles. Se definieron como "casos" aquellos establecimientos con 2 o más animales seropositivos utilizando como referencia la prueba ELISA con el kit del laboratorio IDEXX. Se definieron como controles a todos los establecimientos que fueron estudiados y no calificaron para casos.

El estudio de la asociación entre los casos (alta serología) y los potenciales factores de riesgo se realizó primero en forma univariada mediante la evaluación del odds ratio (OR). Para factores con más de dos categorías en escala ordinal se utilizaron pruebas de Chi cuadrado de homogeneidad. Luego del análisis univariado se pasó a un análisis multivariado de regresión logística. Para la selección de las variables a incluir en el modelo se utilizó el método backward stepwise estimation, comenzando con las cinco variables del formulario de Evaluación del Riesgo que en forma individual mostraron significación menor a 0.25 de acuerdo al criterio recomendado por Hosmer D.W., Lemeshow S. (2000).

Las variables cuantitativas fueron evaluadas mediante pruebas t (Student) para diferencias entre medias de los grupos (casos y controles) y Análisis de Regresión Múltiple para controlar posibles variables de confusión.

En el modelo de regresión logística se estudió la variable vacas en ordeño como variable cuantitativa y también se la categorizó para ver cual de las dos ajustaba mejor en el modelo. SE establecieron 4 categorías: la 1, menos de 67 vacas en ordeno, la 2 entre 68 y 115 vacas, la 3 entre 116 y 180, y la 4 más de 180 vacas en ordeño, usandose como punto de corte los cuartiles de la distribución de los establecimientos en función del numero de vacas.

Los datos de los establecimientos participantes del estudio se proyectaron a la población en función de un análisis estratificado por departamento.

Los datos correspondientes a los animales se estratificaron por departamento, se consideraron los establecimientos como conglomerados y se pesaron en función de la población del establecimiento y el departamento para cada año del estudio.

Estudio de Seroprevalencia:

El estudio de seroprevalencia se basó en el muestreo transversal, que fue realizado al azar. La estimación proyectada a la población bajo estudio fue de $5,65\% \pm 1,3$ (estimación de punto y error estándar). Grafico N° 1.



■ Seropositivos **■ Seronegativos**
Gráfico N° 1: Seroprevalencia de Paratuberculosis bovina en rodeos lecheros de los departamentos de Colonia y Florida.

Seroprevalencia por categoría

El estudio de seroprevalencia ya sean vacas adultas o vacas de primera cría (vaquillonas) muestra que las vacas adultas presentan una seroprevalencia de $6,08\% \pm 1,76$ mientras que las vaquillonas presentan $3,87\% \pm 2,13$ de seropositividad. (Gráfico N° 2)

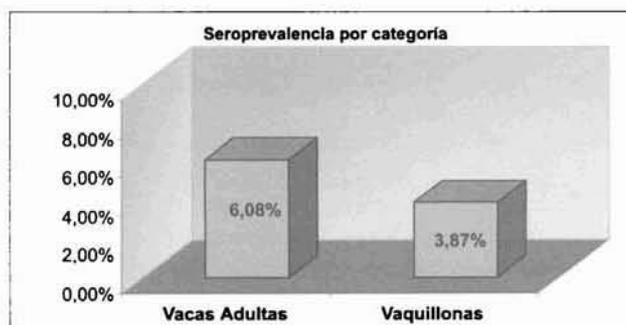


Gráfico N° 2: Seroprevalencia de paratuberculosis bovina en vacas adultas y vaquillonas en los departamentos de Florida y Colonia.

Estimación de Seroprevalencia por Departamento

La estimación de seropositivos por departamento indica que el departamento de Florida presenta un $5,63\% \pm 1,36$ de seroprevalencia, mientras que Colonia presenta un $6,19\% \pm 1,79$ de animales serológicamente positivos. (ver Gráfico N° 3)



Seroprevalencia de Paratuberculosis bovina en rodeos lecheros por departamento

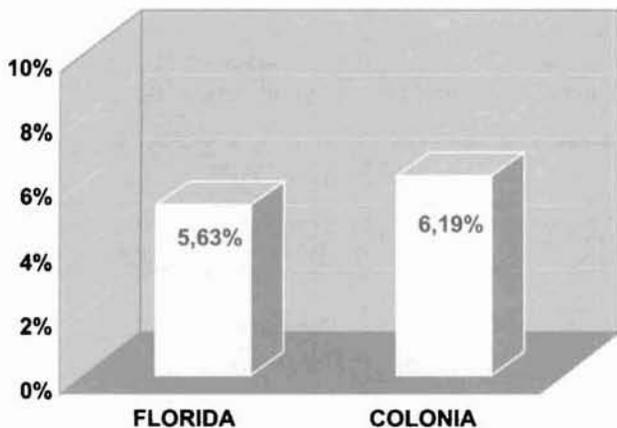


Gráfico N° 3: Seroprevalencia de Paratuberculosis bovina por departamento

Estudio de seroprevalencia a nivel de establecimientos

La seroprevalencia estimada de los rodeos lecheros seropositivos a Paratuberculosis bovina indica que el 70,28%± 8,19 de los establecimientos lecheros de Florida y Colonia presentan al menos 1 animal seropositivos. (Gráfico N° 4).

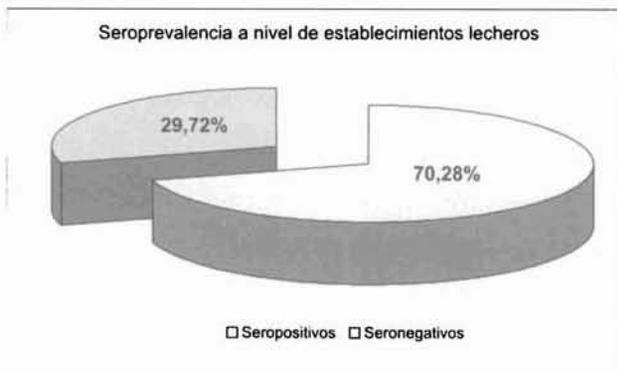


Gráfico N° 4: Seroprevalencia de Paratuberculosis bovina a nivel de establecimientos lecheros en los departamentos de Florida y Colonia

Estratificación de establecimientos por seroprevalencia

La estratificación de los establecimientos de acuerdo a su nivel de seroprevalencia interna muestra que el 29,72% de los establecimiento son seronegativos, el 35,88% presentan menos del 10% de animales serologicamente positivos, el 22,29% entre 10 y 15%, el 3,40% entre el 15 y 20 % de animales seropositivos, el 8,07% entre el 20 y 25% y el 0,64% más del 25% de seroprevalencia. (Gráfico N° 5).

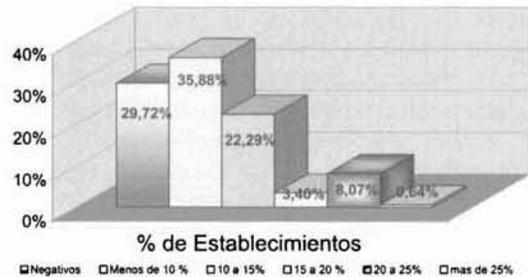


Gráfico N° 5: Estratificación de los rodeos lecheros estudiados según la seroprevalencia que presentan.

Estratificación de los establecimientos por seroprevalencia y por departamento

Los resultados de la estratificación de establecimientos por seroprevalencia y departamento muestra que en Colonia el 30,76% de los establecimientos son seronegativos, el 23,08% presentan una serprevalencia menor a 10%, el 23,08% entre 10 y 15%, el 0% entre el 15 y 20 % , el 15,38% entre el 20 y 25% y el 7,70% más del 25% de seroprevalencia. En el departamento de Florida el 29,63% de los establecimientos son serologicamente negativos, el 37,04% presentan menos del 10% de seroprevalencia, el 22,22% entre 10 y 15%, el % entre el 15 y 20 % de animales seropositivos, el 7,40% entre el 20 y 25% y el 0% más del 25% de seroprevalencia.

Estudio de Factores asociados a la presencia de Paratuberculosis.

Con el punto de corte descrito en materiales y métodos fueron clasificados como casos 52 establecimientos mientras que 40 lo fueron como controles. (Tabla N° I)

Tabla N° I: Distribución de los establecimientos en casos y controles.

	Frecuencia	Porcentaje
Casos	52	56,52
Controles	40	43,48
Total	92	100

Análisis Univariado

El estudio individual detalla la asociación de cada variable en forma aislada con la presencia de casos. Las variables se recodificaron en forma dicotómica correspondiendo a 0 "Ausencia del Factor" y 1 "Presencia del Factor". Las variables que mostraron valores de significación



menores a 0.25 se presentan a continuación, junto con su Odds Ratio (OR: Relación de las Odds), o razón de probabilidades de ser caso habiendo sido expuesto al FR y no habiéndolo sido. El OR estima el Riesgo Relativo cuando estudiamos factores de baja prevalencia y es la estimación adecuada en estudio de casos y controles. Mide aproximadamente cuanto más probable es que sea caso un establecimiento entre aquellos con exposición al FR que entre aquellos no expuestos, proporcionando una estimación del riesgo de ser caso en presencia de exposición al factor.

En Área de Parto:

- En el área de parto se encierran o tratan animales enfermos (OR= 3,21)
- Utilización de Nodrizas (OR = 1,93)
- Esta área es utilizada para más de una vaca simultáneamente (OR= 5,41)

En el manejo de los Terneros pre-destete.

- Los terneros pre-destete se encuentran en contacto directo con las vacas? (OR=3,88)

En el manejo de Terneros pos-destete:

- Los terneros posdestete comparten el pastoreo con animales adultos (OR=1,84)

Análisis Multivariado

El modelo de regresión logística se corrió con la variable respuesta caso-control y con las variables independientes anteriormente citadas. Se forzó dentro del modelo la variable muestreo que diferencia los dos muestreos. Las únicas variables que finalmente quedaron en el modelo fueron la variable muestreo, el número de vacas en ordeño y la variable "encierran animales enfermos en el área de parto".

En el área de parto se encierran o tratan animales enfermos (OR= 3,28) y una significancia de $p=0,081$.

La variable vacas en ordeño explica mejor el modelo como variable categórica, al dar mayor significación y muestra que la categoría 4, establecimientos con más de 180 vacas en ordeño tienen casi 5 veces menos probabilidad de tener paratuberculosis que los restantes. (Odds Ratio: 0,20).

Asociación con variables categóricas de la encuesta

No se encontró diferencia entre los casos y los controles en la forma de proveerse de animales de remplazo. La gran mayoría de los establecimientos (86,21%) crían sus propios remplazos por lo que no hubo asociación.

A pesar de que un 53,33% de los casos presentaban diarrea crónica, no hubo diferencia significativa con el gru-

po control que presentó un 37,50% de establecimientos con diarreas crónicas por lo tanto los antecedentes de diarrea crónica en el establecimiento no evidenciaron asociación con la ocurrencia de casos.

En cuanto a antecedentes de diagnóstico clínico de Paratuberculosis bovina, un 15,22% de los casos si lo tenían contra un 7,69% de los controles, pero la diferencia no fue estadísticamente significativa.

En lo que respecta a la eliminación o refugio de animales con diarreas crónica, el 28,95% de los controles descartan a los animales con diarrea crónica mientras que en el grupo casos el 19,57% de los tambos refugan por esta causa.

En lo referido al estercolero, y la distancia que presenta con la sala de ordeño, con el agua con que se limpia el tambo y con el agua de bebida, se destaca que el grupo control presenta en las tres variables mayor distancia que el grupo casos. El estudio estadístico con la prueba de t de Student para varianzas diferentes, muestra que la diferencia en la distancia entre el estercolero y la sala de ordeño no es significativa $P= 0,30$. La prueba para la distancia del estercolero al agua de limpieza tampoco da significativa, pero muestra una tendencia $p= 0,0625$ y la única que da estadísticamente significativa es la distancia estercolero con la fuente del agua de bebida, $p=0,0482$.

En lo que respecta a la producción lechera, se encontró una diferencia de 0,946 litros entre el grupo control y el grupo caso, que equivale a una disminución de 5,58% de litros en los casos, pero realizado un test de t, esta diferencia no es estadísticamente significativa, $p= 0,13$.

DISCUSIÓN

En el curso del presente estudio fueron testeados por la prueba de ELISA para detección de anticuerpos contra *Micobacterium avium* subsp. paratuberculosis, 2224 muestras bovinas provenientes de 92 tambos de los departamentos de Colonia y Florida. La prueba de ELISA para detección de anticuerpos es la prueba más utilizada y la más aceptada en estudios de seroprevalencia (Collins M.T. y col, 1993). Este estudio confirma la presencia de Map en los rodeos lecheros de la cuenca sur del Uruguay,

Los resultados encontrados a partir de los datos del muestreo transversal muestran una seroprevalencia a nivel de los animales de $5,65\% \pm 1,3$ y la proyección estima que un 70,27% de los establecimientos lecheros de los departamentos de Florida y Colonia tienen al menos un animal serológicamente positivo. Los dos departamentos estudiados presentan resultados muy similares

Es preocupante la alta difusión encontrada que afecta el 70% de los rodeos. El 35% de los establecimientos presentan más del 10% de los animales seropositivos, lo que resulta también de preocupación puesto que implicaría un alto número de animales eliminadores de Map por heces. Estos resultados son coincidentes con algunos estudios realizados en cuencas lecheras, pero con otras características de cría de terneros y manejo de los rodeos, donde la cría



en estabulación crea condiciones de convivencia que debería tener mayor impacto en la difusión de la enfermedad. Los resultados encontrados por Collins M.T. y col en 1994, encuentran una seroprevalencia levemente más alta 7,2%, pero con menor difusión entre los rodeos, 50%. Resultados muy similares a los encontrados en este estudio fueron encontrados por Johnson-Ifearulundu J. y Kaneene J. en 1998 en el estado de Michigan, USA, con 6,9% de seroprevalencia y 66% de rodeos con al menos un animal seropositivo. Estos reportes son más altos que los relevados por el NAHMS en el Dairy 1996, el que presenta 3,4% de seroprevalencia individual y 21% de establecimientos serologicamente positivos.

En Europa los estudios realizados muestran resultados muy diferentes entre sí, desde seroprevalencias muy bajas (Gasteiner J y col, 1999 en Austria, Bolaert F y col, 2000 en Bélgica), hasta los encontrados por Jacobsen y col (2000) en Dinamarca con 8,8% de animales seropositivos y el 86% de los establecimientos con al menos 1 animal seropositivo.

No debemos olvidar que la mayoría de estos estudios utilizaron diferentes kits de ELISA y que estas pruebas se han ido mejorando con el transcurrir de los años, aunque todavía mantienen una baja sensibilidad. Sin duda esta baja sensibilidad determina que las seroprevalencias estén subestimando la verdadera presencia de infección en las poblaciones.

Respecto a la seroprevalencia por categoría, las vacas adultas presentan casi el doble de resultados positivos que las vaquillonas (6.1% vs 3.9%). Esto se relaciona a la retardada respuesta humoral al Map.

La mayoría de los estudios que evalúan factores asociados a la presencia de la enfermedad lo hacen en base a un formulario-encuesta y a estudios serológicos.

En nuestro estudio al tiempo que se tomaban muestras para serología en los establecimientos, se relevó información concerniente a prácticas de manejo y características descriptivas y productivas de los mismos. La estrategia utilizada para identificar factores o variables asociadas a la seroprevalencia, consistió en ensamblar un estudio establecimientos casos y establecimientos controles.

El cuestionario sobre factores asociados evaluó 23 variables, las cuales fueron analizadas en forma univariada como primer aproximación al problema. A través del análisis univariado se eliminaron 18 de estas variables. Las cinco variables que mostraron asociaciones crudas y que por lo tanto fueron seleccionadas en esta instancia pasaron a ser consideradas a través de un modelo de regresión logística.

Las cinco variables consideradas en el modelo fueron:

- En el área de parto se encierran o tratan animales enfermos (OR= 3,21)
- Se utilizan nodrizas? (OR = 1,93)
- Esta área es utilizada para más de una vaca simultáneamente (OR= 5,41)
- Los terneros pre-destete se encuentran en contacto directo con las vacas? (OR=3,88)
- Los terneros posdestete comparten el pastoreo con animales adultos (OR=1,84)

El modelo de regresión logística se corrió con la variable respuesta caso-control y con las variables independientes consideradas. Se forzó dentro del modelo una variable dicotómica llamada "muestreo" a los efectos de controlar las variaciones que podrían existir por los momentos diferentes del muestreo y se incluyó la variable número de vacas en ordeño.

Solo tres variables muestran un grado de asociación menor a 0,10, lo que nos está indicando una tendencia en la asociación de estas variables con la presencia de tambos con alta serología para Map. Las variables asociadas son:

1. Muestreo (altamente significativo) que esta diferenciando entre las estrategias de muestreo utilizada y que se incluye en el modelo a los efectos de controlar por este factor que puede ser de confusión. La interpretación de esta variable no es posible ya que probablemente encierra diferentes factores tales como diferencias de momento del muestreo, estrategia de muestreo y posibles diferencias en la evolución de las pruebas de laboratorio (kits del año 2001 y 2003) y tal vez otras diferencias de manejo y estructura entre los tambos integrantes del estudio. Esta variable por su valor de OR menor a 1 es un factor asociado negativamente que está indicando que en el muestreo aleatorio hay menos riesgo que en el muestreo del 2001.

2. La variable vaca en ordeño tiene un OR < 1 lo que indica que en la medida que esta variable aumenta, el riesgo disminuye. Esta variable está indicando que a medida que el número de vacas en ordeño aumenta el riesgo para los establecimientos decrece. La variable vacas en ordeño explica mejor el modelo como variable categórica, donde la categoría de establecimientos con más de 180 vacas en ordeño tienen casi 5 veces menos probabilidad de tener paratuberculosis que los restantes.

3. La variable animales enfermos en el área de parto surge con un OR=3.28 lo que estaría indicando que los tambos que usan como manejo el área de parto como "hospital" donde colocan los animales enfermos tiene 3.28 más riesgo de tener alta seroprevalencia que aquellos que usan un área diferente.

Las 2 variables que muestran una tendencia ($p < 0.10$) a estar asociada a los establecimientos con alta serología permite planteamos como hipótesis que estos factores pueden ser relevantes en la transmisión del Map en el Uruguay. Si bien el tamaño de nuestro estudio no nos permite sacar conclusiones definitivas creemos que al menos estos 2 factores deben ser incluidos en futuros estudio para poder establecer si estamos frente a factores de riesgo para la paratuberculosis o desecharlos.

Wells S. y Wagner B., (2000), señalan sus diferencias con varios estudios de asociación de seroprevalencia con factores o variables, y manifiestan que estas diferencias pueden deberse a diferentes razones, como ser el uso de diferentes métodos de estudio, los puntos de corte para definir establecimientos como casos y la población bajo estudio. Es su estudio, al igual que el de Collins y col (1994), el de Jakobsen M. y col (2000) y el de Muskens y col (2003) encontraron asociación entre el tamaño del rodeo y la seroprevalencia. Esta variable podría estar relacionada a una



alta densidad de ganado y mayor presencia bacteriana en el medio ambiente, con mayor probabilidad de infección de los terneros. Hirts y col en 2004 encuentran que rodeos lecheros con más de 600 vacas en ordeño presentan 3,12 veces más probabilidad de ser seropositivos que los rodeos con menor número. Ellos opinan que los rodeos grandes más probablemente compran sus reemplazos por lo que especulan con que esta asociación está relacionada con el ingreso de animales infectados a los rodeos, ya que sus resultados indican que rodeos que han comprado en los últimos 5 años más del 8% de sus animales, tienen 2,5 % más probabilidad de ser clasificados como caso. Collins y col en 1994 y Goodger y col en 1996 sin embargo no encuentran asociación positiva entre el ingreso de animales de reemplazo de otros orígenes y la infección del rodeo. Estas diferencias pueden ser debidas a como se analiza esta asociación y como se define el establecimiento como caso o control. La convivencia de terneros con ganado adulto o que tengan contacto con sus heces presenta en varios estudios una asociación positiva a la presencia de la enfermedad. (Collins M. y col 1994, Goodger M.G. y Collins M.T. 1996, Obasanjo y col 1997 y Wells y Wagner 2000), mientras que en nuestro estudio los casos no presentaron diferencia con los controles respecto a esa exposición.

En lo que respecta a las variables categóricas incluidas en la encuesta, si bien el grupo de casos presenta más porcentaje de establecimientos con diarreas crónicas y con diagnóstico clínico de Paratuberculosis bovina, ninguna de las dos variables fueron estadísticamente significativas. Muskens y col en 2003 también encontraron mayor seroprevalencia, en rodeos con diagnóstico clínico de la enfermedad. Hirst y col en 2004 encuentran que establecimientos con historia de signos clínicos de la enfermedad tiene 2,27 veces más probabilidad de ser seropositivos, que los rodeos sin historia clínica de paratuberculosis.

En lo que respecta al descarte de enfermos con diarrea, si bien el grupo control realiza en mayor proporción esta práctica, tampoco la diferencia encontrada tuvo significación estadística. Respecto a las distancias que presenta el estercolero con las fuentes de agua, se encontró que la distancia con el origen del agua de bebida era mayor en los controles que en los casos ($p=0,0482$). Esta asociación está indicando que probablemente este es un factor que afecta la difusión del agente dentro del rodeo y que debería de buscarse cual es la distancia a recomendar cuando se diseñan estas facilidades en el tambo.

Goodger M.G. y Collins M.T. (1996), señalan que existe asociación entre la frecuencia con que se compran reemplazos de otros rodeos, variable que en este estudio no presenta asociación fundamentalmente debido a que la mayoría de los establecimientos crían sus propios reemplazos y por otro lado este factor no es aún considerado por los productores cuando deciden el refugio de sus animales.

CONCLUSIONES.

Como conclusión se destaca que el *Mycobacterium*

avium subsp. *paratuberculosis* está presente con alta difusión en nuestros rodeos lecheros pero con una seroprevalencia similar a la encontrada en la mayoría de los estudios realizados. La importancia de esta enfermedad es creciente a nivel internacional pudiendo convertirse en el corto plazo en un problema comercial dado que algunos países ya están exigiendo pruebas negativas para la importación de animales en pie.

Como factores asociados a la seroprevalencia en este estudio se encontró que tanto el número de vacas en ordeño y la práctica de alojar animales enfermos o en tratamiento en el área donde paren las vacas muestran una tendencia a estar asociadas. Respecto a la distancia entre el estercolero y la fuente de agua de bebida se encontró que la distancia con el origen del agua de bebida era mayor en los controles que en los casos, por lo que existe una asociación entre esta variable y la probabilidad del establecimiento de ser seropositivo.

Si bien el impacto de la enfermedad clínica se evidencia fácilmente por la baja en la producción, muerte o refugio de animales con diarreas crónicas, la enfermedad subclínica provoca también una disminución en la producción de leche que en este estudio alcanzó a 0,96 litros/vaca/día equivalentes a un 5,6 %, coincidiendo con la literatura en la que dichas pérdidas se han estimado entre 2% y 19%.

Muchos investigadores sostienen la posible relación del Map con la enfermedad de Crohn, grave enteritis crónica que afecta al ser humano, generando mayor interés y atención de la comunidad internacional en el control de la enfermedad.

En nuestros rodeos sería fundamental comenzar de inmediato a implementar medidas que permitan disminuir el riesgo de contagio de los animales jóvenes. Para ello será necesario trabajar en forma conjunta con técnicos, productores e instituciones del sector en la formulación e implementación de un Programa de Control de la enfermedad. Se debe trabajar intensamente en líneas de investigación en el área del diagnóstico, de forma de detectar lo antes posible los animales con la enfermedad subclínica. También se debe avanzar en la búsqueda de herramientas de control como el desarrollo de inmunidad por medio de vacunas.

En el área de la difusión y extensión se debe comenzar en forma urgente a crear conciencia de la importancia e impacto de la enfermedad, así como las medidas y recomendaciones para su control.

Numerosos países en el Mundo con tasas de prevalencia similares a las encontradas en este estudio como Estados Unidos, y algunos países de Europa han comenzado Programas de Control de la enfermedad.

Según estudios del NAHMS, Dairy 96, (1997) la llave para prevenir o controlar la paratuberculosis está en las prácticas de manejo. Testar los animales sirve para evaluar la extensión de la infección, identificar animales infectados, determinar cuán intenso debe ser el programa de control así como monitorear los progresos de los programas. A pesar de que de que las medidas específicas varían con cada situación particular, existe una serie de recomendaciones para cortar el ciclo de infección y la enfer-



medad en el rodeo. Estas medidas van desde el manejo de los terneros recién nacido y animales jóvenes donde indican que es el momento de más efecto en el control; controlar la contaminación con estiércol de comida y fuentes de agua; identificar y eliminar animales infectados y su estiércol y la compra de reemplazos seguros, que provengan de rodeos negativos, sin historia clínica de paratuberculosis, e incluso testar a los animales antes de introducirlos en el rodeo.

Será clave para el futuro el esclarecimiento de si existe relación con la Enfermedad de Crohn. De confirmarse esta hipótesis, dado que se ha demostrado que el Map puede resistir los procesos de pasteurización, podría significar un duro golpe para nuestro sector lechero debido al elevado nivel de predios afectados. Por este motivo, el desafío para el futuro es no esperar a que siga avanzando este agente infeccioso haciendo cada vez más difícil poder controlarlo, sino redoblar los esfuerzos y el trabajo de todos los actores involucrados, productores, veterinarios, instituciones y organizaciones del sector para revertir los efectos perjudiciales que ocasiona esta enfermedad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Boelaert F; Walravens K; Biront P; Vermeersch JP; Berkvens D; Godfroid J. (2000). Prevalence of paratuberculosis in the Belgian cattle population. *Vet Microbiol.* 77 269-281.
2. Cassamagnaghi A; Cassamagnaghi A (h). (1947). La Enfermedad de Johne, los primeros casos reconocidos en bovinos del Uruguay. *Anales de la Facultad de Veterinaria*, 5 (1) : 83-104,
3. Cetinkaya B, Erdogan H; Morgan K; (1998). Prevalence, incidence and geographical distribution of Johne's disease in cattle in England and the Welsh borders. *Veterinary Record* 143, 265-269,
4. Chiodini, R.J.(1989). Crohn's disease and mycobacterioses: a review and comparison of two disease entities. *Clin Microbiol. Rev.* 2: 90-117.
5. Chiodini, R.J.(1996). Immunology: Resistance to paratuberculosis. In *The Veterinary Clinics of North America*, Sweeney R. (ed). The W.B. Saunders Company, Philadelphia. *Food Animal Practice*, 12 (2):313-343..
6. Chiodini, R.J., Van Kruiningen H. J., Merkal R. S.(1984). Ruminant paratuberculosis Johne's disease: the current status and future prospects. *Cornell Vet.* 74:218-262
7. Cocito C., Gilot P., Coene M., De Kesel M, Poupard P., Vannuffel P. (1994). Paratuberculosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 7: 328-345.
8. 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. *Molecular and Cellular Probes* 11, 373-380.
9. Collins D.M; Hilbink F; West D; Hosie B; Cooke M; De Lisle G (1993). Investigation of *Mycobacterium paratuberculosis* in sheep by faecal culture, DNA characterisation and the polymerase chain reaction. *Vet. Rec.*, 133: 24, 599-600.
10. Collins M.T. (1996). Diagnosis of Paratuberculosis. In R.W Sweeney (ed) *Paratuberculosis (Johne's Disease)*. In *The Veterinary Clinics of North America*, Sweeney R (ed). The W.B. Saunders Company, Philadelphia. *Food Animal Practice*, 12 (2):357-371.
11. Collins MT, Sockett Dc, Goodger WJ, Conrad TA, Thomás CB, Carr D.J.(1994) Herd prevalence and geographic distribution of, and risk factors for, bovine paratuberculosis in Wisconsin. *J Am Vet Med Assoc.* 204 (4) 636-641.
12. Collins M.T., Sockett D. (1993). Accuracy and economics of the USDA-licensed enzyme-linked immunosorbent assay for bovine paratuberculosis. *J Am Vet Med Assoc.* 203, 1456-1463.
13. Collins M.T., Lisby G., Moser C., Chicks D., Christensen S., Reicheldefefer M., Hoiby M., Harms B., Thomsen O., Skibsted U., Binder V. (2000). Results of Multiple Diagnostic Tests for *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in Patients with Inflammatory Bowel Disease and in Controls. *J. Clin. Microbiol.* 38 (12) p. 4373-4381.
14. Errico F, Bermudez J.(1983). Aislamiento de *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis en bovinos en el Uruguay. *Veterinaria* 19 (83): 13-16.
15. Errico F., Rossi J., Silva M., Sallanes H. Ensayo de control de la paratuberculosis (enfermedad de Johne) en un establecimiento lechero. (1990). *Veterinaria* 26 (110):10-14.
16. Gasteiner J., Wenzl H., Fuchs K., Jark U., Baumgartner W. (1999). Serological Cross-sectional Study of Paratuberculosis in Cattle in Austria. *J. Vet. Med. B* 46, 457-466.
17. Goodger, W. J ; Collins M.T. (1996). Epidemiologic study of on-farm management practices associated with prevalence of mycobacterium paratuberculosis infections in dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc.* 208: 1877-1881.
18. Harris N.B., Barletta R.G.(2001). *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in Veterinary Medicine. *Clin Microbiol Rev.* 14(3):489-512
19. Hirst H.L., Garry F.B., Morley P.S., Salman M.D., Dinsmore R.P., Wagner B.A., McSweeney K.D., Goodell G.M. (2004). Seroprevalence of *Mycobacterium avium* subsp paratuberculosis infection among dairy cows in Colorado and herd-level risk factors for seropositivity. *J Am Vet Med Assoc.*;225(1):97-101.
20. Hosmer D.W., Lemeshow S. 2000. *Applied logistic regresión*. 2nd edition. Ed. Wiley-Interscience Publication. 373 páginas. ISBN 0-471-35632-8.
21. 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.
22. Johnson-Ifearulundu Y.J., Kaneene J.B. (1998). Management-related risk factors for *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection in Michigan, USA, dairy herds. *Prev Vet Med* 37 41-54



23. Johnson-Ifearulundu Y.J; Kaneene J.B; (1997).Epidemiology and economic impact of subclinical Johne's disease: a review. *Veterinary Bulletin* vol 67, nº 6 , 437-446,
24. Johnson-Ifearulundu YJ; Kaneene JB. (1999). Distribution and environmental risk factors for paratuberculosis in dairy cattle herds in Michigan. *AVJR* 60 (5) 589-596..
25. Johnson-Ifearulundu YJ; Kaneene JB; Sprecher Dj; Gardiner JC; Lloyd JW. (2000). The effect of subclinical Mycobacterium paratuberculosis infection on days open in Michigan USA dairy cows. *Prev. Vet. Med.* 46: 171-181.
26. Manual of standars for diagnostic test and vaccines, 4ª ed.. 2000. Officine International des Epizooties. OMS . 96.
27. Motiwala A.S., Li L., Kapur V., Sreevatsan S. (2006) Current understanding of the genetic diversity of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis *Microbes and Infection* xx p 1-13. En prensa.
28. Muskens J; Barkema HW; 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.
29. Muskens J., Elbers A. R.W.,van Weering H.J.,Noordhuizen P.T.M. (2003).Herd Management Practices Associated with Paratuberculosis Seroprevalence in Dutch Dairy Herds. *J. Vet. Med. B* 50, 372-377
30. Muskens J., Mars M.H., Elbers A.R., Van Maanen K., Bakker D. (2003). The results of using faecal culture as confirmation test of paratuberculosis-seropositive dairy cattle. *J Vet Med B Infect Dis Vet* 50 (5):231-234.
31. NAHMS 1996.(1997). Johne's Disease on U.S Dairy Operations. USDA:APHIS: VS, CEAH, National Animal Health Monitoring System, Fort Collins, Co. #N245.1097
32. 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. In Saltijeral J. (ed), *Proceedings of the XI International Congress in Animal Hygiene. ISAH 2003, 23-27 de febrero 2003. Ciudad de México.* p 493-495.
33. Núñez A. 2006. Paratuberculosis bovina en Ganado Lechero en la Cuenca Sur del país. Tesis de Maestría. MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA ORIENTAL DEL URUGUAY, FACULTAD DE VETERINARIA Programa Académico de Posgrados de la Facultad de Veterinaria.
34. Obasanjo I.O.,Grihn Y.T., Mohammed H.O. (1997) Farm factors associated with the presence of Mycobacterium paratuberculosis infection in dairy herds on the New York State Paratuberculosis Control Program. *Prev Vet Med* 32: 243-251.
35. Ott S., Wells S.J., Wagner B. Herd level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations.(1999). *Prev Vet Med.* 40, 179-192.
36. Paolicchi F., Morsella C., Verna1 A., Spath E., Martins D., Zumarraga M., Gioffre Cataldi A., Romano M.(2002). Diagnosis,epidemiology and program of control of paratuberculosis in bovine herds of Argentina. In; Juste R., Geijo M., Garrido J. (ed.) *Proceedings of the 7º International Colloquium of Paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis, Bilbao, España* P 518.
37. Piaggio J., Núñez A., Gil A., Johne's disease serological prevalence in Uruguayan dairy cows. (2002). In; Juste R., Geijo M., Garrido J. (ed.) *Proceedings of the 7º International Colloquium of Paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis, Bilbao, España.* P. 455-456.
38. Raizman E.A., Wells S.J., Godden S.M., Bey R.F., Oakes M.J., Bentley D.C, Olsen K. E. (2004). The Distribution of Mycobacterium avium ssp. Paratuberculosis in the Environment Surrounding Minnesota Dairy Farms. *J. Dairy Sci.* 87:2959-2966.
39. Sanderson, J D ; Moss M.T. (1992)de Mycobacterium Paratuberculosis DNA in Crohn's disease tissues. *Gut* 33: 890-896.
40. Stabel, J.R.(1996). An improved method for cultivation of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis from bovine fecal samples and comparision to three other methods. *J. Vet. Diagn. Invest.* 9: 375-380,
41. Stabel, J.R. (2000). Transitions in immune response to MycobacteriuMycobacterium avium subsp. paratuberculosis. *Vet Microbiol* 77: 465-473.
42. Wells S.J., Whitlock R.H., Lindeman C.J., Fyock T. (2002). Evaluation of bacteriologic culture of pooled fecal samples for detection of Mycobacterium paratuberculosis. *Am J Vet Res.*63(8):1207-11.
43. 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):1053-7
44. Wells S.J.,Godden S.M.,Lindeman C.J.,Collins J.E.(2003).Evaluation of bacteriologic culture of individual and pooled fecal samples for detection of mycobacterium paratuberculosis in dairy cattle herds.*J Am Vet Med Assoc.* ;223(7):1022-5.
45. Wells S.J.,Wagner B.A.(2000)Herd level risk factors for infection with Mycobacterium Paratuberculosis in US dairies and association between familiarity of herd manager with the disease or prior diagnosis of the disease in that herd and use of preventive measures. *J Am Vet Med Assoc* 216(9): 1450-1457.