



2006



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA ORIENTAL DEL
URUGUAY
FACULTAD DE VETERINARIA**

Programa Académico de Posgrados de la Facultad de Veterinaria
(PPFV)

**“Paratuberculosis bovina en Ganado Lechero en la Cuenca
Sur del país”**

AUTOR

Dr. Alvaro Núñez Alesandre

Laboratorio del Departamento de
Patología y Clínica de Rumiantes y Suinos
Facultad de Veterinaria

Director de Tesis: Dr. Andres Gil

TESIS DE MAESTRIA EN SALUD ANIMAL

INDICE

	PAGINA
1. RESUMEN - SUMMARY	3
2. INTRODUCCIÓN	4
3. ANTECEDENTES	7
3.1. LA ENFERMEDAD	7
3.2. EL AGENTE ETIOLÓGICO	8
3.3. RESPUESTA INMUNE	10
3.4. LA TRASMISIÓN	13
3.5. SEROPREVALENCIA	14
3.6. FACTORES ASOCIADOS	15
3.7. DIAGNOSTICO	19
3.7.1. IDENTIFICACIÓN DEL AGENTE	19
3.7.1.1.IDENTIFICACIÓN MICROSCÓPICA	19
3.7.1.2.CULTIVO DE HECES Y LECHE	19
3.7.1.3.TÉCNICAS MOLECULARES	20
3.7.2. TEST BASADOS EN LA DETERMINACIÓN DE LA INMUNIDAD CELULAR	21
3.7.3. TEST SEROLOGICOS	22
3.8. POSIBLE RELACIÓN ENTRE PARATUBERCULOSIS y LA ENFERMEDAD DE CROHN	23
4. OBJETIVOS	25
4.1. OBJETIVO GENERAL	25
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
5. MATERIALES Y METODOS	25
6. RESULTADOS	29
7. DISCUSIÓN	38
8. CONCLUSIONES	41
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
10. ANEXOS	53

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, debilidad, pérdida de peso, hipoproteinemia y muerte. Actualmente se la asocia con una enteritis en humanos, enfermedad de Crohn, habiéndose aislado el *Map* de biopsias de intestino de pacientes con esa enfermedad. 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 corespondiente a si en el área de parto encierran o tratan animales enfermos presentaba una tendencia a estar asociada a la seroprevalencia. 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.

SUMMARY

Paratuberculosis, or Johne's Disease, is a chronic intestinal disease caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, (*Map*), and characterized in cattle by chronic diarrhea, weakness, lost of weight, hipoproteinemia and death. In some reports is also associated with humans enteritis, Crohn's disease, being even the *Map* isolated of intestine biopsies of patients. The seroprevalencia can be associated to several factors: environmental conditions, taken care with calves, pregnant heifers management, and manure management. A cross sectional study was conducted to determine the *Map* dairy herd seroprevalence in Florida and Colonia, and evaluate associations with farm management practices. To evaluate this association a cases and controls study and a logistic regression model was made. The estimation seroprevalence projected to the population under study was of $5.6\% \pm 1,3$ and $70,2\% \pm 8,1$ of farms with at list one seropositive bovine. By a multi-variate logistic regression model of the results were evaluated and was that the variable herd size and if use calving area to sick o treat animals have increase possibility of being seropositive that those that don't make that management practice. The other variable that had positive association with the seroprevalence was the distance of manure to drink water source. It's emphasized the high farms number with at least 1 seropositive animal, whereas the seroprevalence is similar to the found in most of the studies in the world.

2. 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 (Oficina Internacional de Epizootias).

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 termino 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. (Chiadini, 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. (Chiadini, 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, Nordlund K.V.. y col.⁹¹). 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 (Chiadini, R.J. y col. 1984¹⁷; Chiadini, R.J.1989; Sanderson, J.D. y col. 1992; Thompson D.E. (1994); 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 antecedente 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. Estudio posteriores de Errico 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 periodos de cinco años a partir de muestras patológicas con lesiones granulomatosas se destaca que el 21% eran del grupo *M.avium*..

Errico 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) determinaron la seroprevalencia en rodeos lecheros de la cuenca lechera más importante de Uruguay. No se han realizado en Uruguay estudios epidemiológicos que analizaran factores de riesgo y prácticas de manejo asociados a la infección con *Map*.

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 *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; Shin S.J. y col, 2004; Strommenger B. y col, 2001). 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 practicas de manejo con la presencia de la enfermedad. Los estudios sobre estas asociaciones utilizan una encuesta con la que se obtienen información sobre practicas 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; Wells S.J. y Wagner B.A. 2000).

3. ANTECEDENTES

3.1. La enfermedad

La Paratuberculosis, también conocida como Enfermedad de Johne es una enteritis granulomatosa de los rumiantes, producida por una bacteria: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, y caracterizada clínicamente en los bovinos por producir diarrea crónica, debilidad, perdida de peso, hipoproteinemia y muerte. Es una de las enfermedades más frecuentes del ganado lechero. Los terneros se contagian en los primeros meses de vida, pero no evidencian la enfermedad hasta que son adultos.(Chiodini, R.J.y col 1984;Stabel, J R.1996;Whitlock R.y Buergelt C.1996). 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 *Map* de biopsias de intestino de pacientes con esa enfermedad (Chamberlin W. y col. 2001, Chiodini, R.J., Rossiter C.1996). La transmisión ocurre normalmente por contaminación oral-fecal .Algunos animales aparecen como capaces de evolucionar de manera de no presentar la enfermedad, pero otros, se enferman en forma crónica. De estos, unos pocos desarrollan signos clínicos, luego de un período largo de incubación que puede ir de dos a cinco años. Los signos clínicos más característicos son perdida de peso, debilidad, disminución de la producción, diarrea crónica y en algunos casos muerte en estado de caquexia (Chiodini, R.J.y col 1984;Stabel, J.R.1998;Whitlock R.y Buergelt C.1996).

La enfermedad se describe en otros rumiantes, 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 R. y col. 1999 ; Sergeant E.S. y col, 2002 ; Sergeant E.S y col. 2003). Estudios de Paolicchi F 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 E. y col 2005, reportan el primer estudio sobre infección con *Map* en conejos y ciervos en zonas cercanas a los rodeos lecheros en Minnesota.

Los hallazgos patológicos se centran a nivel intestinal, donde los cambios macroscópicos afectan principalmente la porción terminal del ileon, pero también se pueden observar en yeyuno. El ileon se observa engrosado, edematoso, la mucosa se encuentra corrugada, con distensión linfática en la superficie serosa así como se pueden observar los ganglios linfáticos agrandados y edematosos. El proceso inflamatorio caracterizado histopatológicamente por agregado de macrófagos,

linfocitos y granulocitos neutrófilos, se encuentra principalmente en folículos linfoides de las placas de Peyer de yeyuno e ileon, pero también se pueden encontrar granulomas en áreas interfoliculares y en las vellosidades. (Chiodini, R.J. y col 1984; Huda A. y Jensen H.E. 2003; Sigurðardóttir O. y col. 2004). La bacteria ingresa al organismo a través de la mucosa del intestino, penetrando las células M en la cúpula epitelial que cubre las placas de Peyer. Las micobacterias son fagocitadas por los macrófagos subepiteliales e intraepiteliales donde se multiplican siendo su lesión inicial un discreto y no encapsulado granuloma en la pared del intestino y en los ganglios linfáticos. Las placas de Peyer alcanzan el mayor grado de desarrollo cerca del nacimiento, y progresivamente van desapareciendo, aunque pueden persistir en el adulto en el yeyuno y la válvula ileo-cecal. Esta lesión inicial 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. Se pierde la vellosidad y la pared intestinal 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 hipoproteïnemia y edema por disminución de la presión osmótica. La enfermedad 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. Según Whitlock y Buergelt, 1996 la presentación de la enfermedad refleja la realidad de que en un rodeo infectado existen más de 15 animales subclínicos por cada enfermo clínico. A medida que progresa la enfermedad, los animales afectados aparecen letárgicos, emaciados, débiles y con edema submandibular debido a la hipoproteïnemia. 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 R.H. y Buergelt C. 1996; Huda A. y Jensen H.E. 2003 ; Sigurðardóttir O. y col. 2004).

El tratamiento con antibióticos es ineficaz y económicamente impracticable con las drogas que se conocen actualmente. La vacunación en ovinos, practicada en algunos países no elimina la infección pero si retarda la manifestación clínica de la enfermedad y disminuye la gravedad (Emery D.L. y Whittington R.J. 2004). En bovinos, la vacunación reduce el número de eliminadores fecales de *Map* y reduce el número de bovinos infectados en un rodeo pero al igual que en ovinos no reduce el número de animales enfermos. (Muskens J y col. 2002).

3.2. El agente etiológico

El agente etiológico de la Paratuberculosis bovina es el *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, (*Map*), bacteria gram positiva, ácido alcohol resistente, intracelular facultativo, 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; Lane S.J. y col. 1995; Schwartz B. y De Voss. J. 2001).

El *Map* forma parte de un gran grupo de micobacterias altamente relacionadas conocidas como *Mycobacterium avium complex*, *Mac*. Las *Mac* pueden ser subclasificadas como *Mycobacterium avium* subsp. *Avium* (*Maa*), *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* (Más), y *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*). Para estudiar la diversidad del complejo *Mycobacterium avium* se han realizado estudios fenotípicos y genéticos. Fundamentalmente esta subdivisión se basa en estudios de DNA y análisis numéricos taxonómicos, que analizan un panel de propiedades fenotípicas que puede dividir a las tres subespecies. Sin embargo el desarrollo de técnicas moleculares ha permitido realizar estudios genéticos, a partir de los cuales se han establecido relaciones taxonómicas y evolutivas a pesar de que cada uno de los genes, 16S, 23S y 5S así como su regiones intergenes están altamente conservadas en el *M. avium complex*. Algunos estudios se ha enfocado en el estudio del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) y la amplificación de los fragmentos del polimorfismo (AFLP), una adaptación del PCR convencional basado en la utilización de técnicas de fingerprinting, para establecer la diversidad genética así como establecer parentescos entre las cepas y realizar estudios de epidemiología molecular (Cocito C. y col. 1994; Harris N.B. y Barletta R.G. 2001; Motiwala A.S. y col 2003; O'Shea B. y col 2004; Motiwala A.S. y col. 2006).

La repetición de secuencias cortas (SSR) o las repeticiones en número de las variables en tandem, (VNTR), es una herramienta útil para diferenciar subtipos de Micobacterias así como para discriminar las cepas epidemiológica y geográficamente y ha sido utilizado por Romano y col. en 2005 para estudiar epidemiológicamente las cepas de América de Sur. (Amonsin A. y col . 2004¹ ; Motiwala A.S. y col. 2006; Romano M.I y col. 2005).

Mediante la utilización de RFLP IS900 y gel - electroforesis en campo pulsatil (PFGE) una adaptación de la anterior pero las enzimas de restricción que utiliza genera fragmentos de alto peso molecular, se han caracterizado genéticamente los aislamientos de *Map* en dos tipos, el Tipo I y el Tipo II. El tipo I, comprende las cepas de muy lento crecimiento, mayormente pigmentadas, uniformes y lisas, obtenidas principalmente de ovinos y otros pequeños rumiantes. La tipo II comprende las cepas de lento crecimiento, no pigmentadas, no uniformes

y rugosas. Ambos tipos pueden ser diferenciados por la secuencia de inserción IS1311.(Dohmann K. y col. 2003 ; O'Shea B. y col. 2003).

El análisis de los genes de las micobacterias resulta en la división de los genes en dos clusters separados, el correspondiente a las micobacterias de crecimiento rápido, representadas por las cepas ambientales no patógenas y las micobacterias de lento crecimiento, entre las que se encuentran la mayoría de las patógenas. Tanto el *Map* como el *Maa* tienen una inserción inusual de aproximadamente 16 nucleótidos en el rRNA 23S, que puede encontrarse también en otras micobacterias, pero que aparece como variable entre las micobacterias. En el *M.Phlei* esta secuencia presenta cuatro pares de bases adicionales. Como subespecie, el *Map* se diferencia del *Maa* y del *Mas* por su dependencia de mycobactin y genotípicamente por la presencia de múltiples copias de la secuencia de inserción IS900 y la ISMav2 (Strommenger B.y col 2001 ;Shin S.J. y col. 2003), mientras que que el *Maa* presenta la IS901 y la IS1110 y el *Mas* presenta la IS902, todas pertenecientes a la familia IS110. D.M.Collins y col. en 1997 señalan que solo el *Map* presenta la IS900 y la ISMav2 mientras que todas las demás Micobacterias presentan la IS1245, otra característica más que podría diferenciar al *Map* del resto del *Mac*.. Se han descubierto dos secuencias más de esta familia, la IS1547 del *Mycobacterium tuberculosis* y la IS1626 del *Maa* y del *M.intracellulare*. Las secuencias de inserción son elementos pequeños, que contienen genes relacionados con las funciones de transposición que pueden insertarse dentro y entre genomas de procariontes generando mutaciones y reacomodamientos genéticos. Todas estas secuencias menos la IS1626 se encuentran en sus respectivos genomas en número de 10 a 20 copias. La IS900 se encuentra entre 14 y 18 veces en el genoma del *Map* mientras que de la ISMav2 se encuentran 3 copias. Recientemente se describen dos IS más del grupo *Mac*, la IS1245 y la IS1311 (Whittington R. y col 1998; Motiwala A.S.y col 2006). La IS 1626 es la más parecida a la IS900, con un 82% de homología, mientras que entre la IS900 y la IS901 y la IS902 existe una homología de 60% .El tamaño del genoma de *Map* ha sido estimado en 5 Mb. Comparándolo con otras Micobacterias, es similar al del *M.avium* ,es levemente mayor al *M.tuberculosis* y al *M.bovis* y bastante mayor que el del *M.leprae*.(Pavlik I. y col. 2000 ;Harris N.B.y Barletta R.G.2001; Bhide M. y col 2006³).

Gioffre y col en 2006 encuentran una proteína, la Lpp34 en la membrana bacteriana, que es específica del complejo *Mac* y podría tener importancia como antígeno en futuros ensayos de inmuno-diagnóstico.

3.3. La respuesta Inmune al *Map*.

El *Map*, patógeno intracelular, muy cercano al *M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.leprae*, y especialmente el *M.avium* se caracteriza al igual que los otros por infectar macrófagos donde sobreviven y evaden la respuesta inmune. 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. 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.

El huésped normalmente se infecta con el *Map* siendo terneros, vía ingestión de material fecal, leche o calostro, siendo posible también la transmisión transplacentaria. Una vez ingresado al organismo, el *Map* penetra la superficie de la

mucosa gastrointestinal donde es fagocitada por macrófagos. Se cree que las células M sirven como puerta de entrada para el *Map* al sistema linfático. A las células M les faltan microvellosidades, enzimas digestivas y mucosidad de la superficie proporcionando al microorganismo una condición apta para adherirse. Los microorganismos vivos cruzan la célula M por transcitosis y penetran por el lado basolateral de la célula siendo fagocitados por macrófagos o células dendríticas. Luego, los microorganismos pueden permanecer intactos dentro de la célula fagocíticas o pueden procesarse y ser presentados al linfocito T. (Chiodini, R.J. y Davis W. 1993; Stabel, J.R. 2000; Coussens P. 2001; Coussens P. 2004; Sigurðardóttir O. 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. Cuando el macrófago infectado se activa, producirá interleukina-1 (IL-1), un mensajero celular que activa las células T. Como consecuencia los linfocitos T activados producen IL-2 que resulta en la expansión clonal específica de células citolíticas CD8+ y T helper CD4+. Mientras se activan las células T, los macrófagos presentan al antígeno asociado con moléculas MHC de clase II a las células CD4+. Antígenos asociados con moléculas de MHC de clase I son presentados a las células CD8+. La población de linfocitos T helper puede ser dividida en dos subpoblaciones, T helper CD4+ tipo 1 que produce IL-2, TNF- β e IFN- γ , citoquinas que dirigen la función inmune mediada por células. En contraste la subpoblación T helper tipo 2 de linfocitos es responsable de la inducción de la función inmune humoral vía citoquinas IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. (Chiodini, R.J. 1996; Stabel, J.R. 2000).

La respuesta inmune del huésped a las infecciones micobacteriales en general tiende a ser paradójica, con una relación inversa entre la respuesta celular T y la magnitud de la enfermedad. Para obtener una respuesta inmune eficaz a un microorganismo intracelular, los linfocitos T deben ser capaces de reclutar las células apropiadas y liberar las citoquinas apropiadas para el desarrollo de un granuloma para contener la infección y aumentar al máximo la actividad bactericida. La presencia de macrófagos activados sólo, sin los mecanismos de reclutamiento y la formación del granuloma, no es suficiente para controlar la infección. Igualmente, los linfocitos estimulados y sus factores solubles no tienen efecto directo en las bacterias intracelulares. La formación de un granuloma, además de la activación del macrófago por los linfocitos T antígeno-estimulados, es necesaria para el establecimiento de una inmunidad celular eficaz. La infección con el *Map* parece perturbar la respuesta de las células T, particularmente durante las últimas fases de la enfermedad. Durante la fase subclínica temprana de infección, 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 micobacteriales. (Chiodini, R.J. 1996; Stabel, J.R. 2000)

Chiodini y Davis 1993, demostraron que la respuesta proliferativa de células mononucleares de sangre periférica al *Map* es mediada por las células T CD8+ y T $\gamma\delta$ en terneros con infección natural y vacunados durante los períodos tempranos

de exposición del antígeno, seguido por una transición gradual a actividad celular T CD4+ en las respuestas tardías. Para evaluar el mecanismo ellos demostraron en una serie de experimentos in vitro que la proliferación de CD4+ fue dependiente de la presencia de células T $\gamma\delta$ y a su vez esa proliferación de células T $\gamma\delta$ fue bloqueada por la presencia de células CD8+. Estos datos sugieren que la inmunidad del huésped al *Map* puede ser dependiente de señales cruzadas entre las poblaciones celulares T CD8+ y T $\gamma\delta$ y la interacción subsecuente de ellos con las células T CD4+. Aunque las células T $\gamma\delta$ comprenden sólo 1-5% de linfocitos T circulantes en humanos, constituyen más de 80% de la población total de linfocitos T en los terneros menores de 6 meses, declinando progresivamente a aproximadamente 5% en el bovino adulto. El predominio de las células T $\gamma\delta$ en el ternero podría correlacionarse con la latencia de la enfermedad observada en animales jóvenes infectados con el *Map*. Sin embargo la declinación de T $\gamma\delta$ y el incremento de la resistencia en animales mayores no está establecido con claridad. Podría ser el reflejo de la que la concentración relativa en el intestino no se acompañe con precisión con la tasa de leucocitos en sangre. Los linfocitos T $\gamma\delta$ bovinos se presentan preferencialmente en piel, bazo e intestino, por lo que su proporción relativa en intestino puede no cambiar, o cambiar en forma inversamente proporcional a la sangre. (Coussens P. 2001)

También se han considerado las interacciones entre los macrófagos y los linfocitos T o B dado que el mycobacterium es un patógeno intracelular. Se acepta ampliamente que las micobacterias incluso el *Map* pueden sobrevivir y replicarse dentro del macrófago del huésped, manteniendo de este modo un estado de infección subclínica durante muchos años. 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. El porcentaje de células B en la fracción aislada de células mononucleares de sangre periférica de bovinos naturalmente infectadas con el *Map* era significativamente más alto para los animales con signos clínicos de enfermedad comparada con bovinos controles con la enfermedad subclínica. Además, la habilidad de las células B de proliferar a una preparación antigénica de *Map* estaba reducida en los animales con la enfermedad clínica a pesar de la buena respuesta proliferativa de células T al estímulo de ConA. Una explicación probable es que la presentación de antígeno a la célula de T esté cancelada. Alternativamente, las células B pueden ser que no puedan responder presentado antígeno en las fases clínicas de enfermedad debido a anergia celular T y/o B. La respuesta inmunitaria humoral no es suficiente para el control de la enfermedad. 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 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 T CD4+ o por T $\gamma\delta$ pero 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, J.R. 2000;Coussens P. 2001; Coussens P. 2004)

3.4. La Transmisión.

La ruta de infección es fecal-oral. El *Map* es un microorganismo que se encuentra fundamentalmente en tracto intestinal, ganglios linfáticos mesentéricos de los bovinos infectados, pudiendo diseminarse en casos clínicos avanzados a otros órganos como ser útero, ubre, ganglios supramamarios, órganos sexuales del toro. La bacteria ingresa al organismo a través de la mucosa del intestino, penetrando las células M en la cúpula epitelial que cubre las placas de Peyer. Las micobacterias son fagocitadas por los macrófagos subepiteliales e intraepiteliales donde se multiplican. La transmisión transplacental fue descrita por primera vez en 1935. Entre el 20 y 40% de los fetos de vacas infectadas que presentan signos clínicos se contagian en útero. Sin embargo la mayoría del rodeo infectado no manifiestan la enfermedad clínica, aunque pueden ser grandes eliminadores fecales y contaminadores del medio ambiente. Estos animales asintomáticos pueden transmitir in útero la enfermedad pero con menos frecuencia que los enfermos clínicamente. (Sweeney R.1996).

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, materia fecal por largo tiempo. Estudios de muestras ambientales de áreas críticas, como ser efluentes de los tambos, área de parto y área de cría de los terneros, han revelado que el microorganismo se encuentra viable y por lo tanto es una fuente de infección muy importante para los terneros.(Sweeney R.1996). El *Map* puede ser ingerido por terneros tanto en la ración, agua, pezones contaminados y leche. El bovino y otros rumiantes se exponen al *Map* en los primeros meses de vida, incluso hay evidencias de que el *Map* puede atravesar la placenta y establecer infecciones uterinas (Sweeney R.1996 ;Whitlock R.H.y Buergelt C.1996). La naturaleza intracelular del *Map* sobretodo en los macrófagos explican esta transmisión. La presencia de macrófagos infectados en calostro y leche ha sido sugerida como fuente de infección para los terneros. Se ha sugerido que vacas infectadas eliminan 50 ufc/50ml de leche, así como mediante sondas de DNA se ha detectado presencia de DNA de *Mycobacterium* en leche. También se han identificado *Map* viables en leche pasteurizada mediante la técnica de incubación, lo que llevó a que se realizaran diferentes estudios relacionando la viabilidad y la pasteurización láctea, resultando que la técnica usual de 72° durante 15" presenta una población residual de *M.Paratuberculosis* que permanece viable.(Grant I. y col. 1999; Stabel, J. R.2000). Sweeney R. en 1996 indica otras posibilidades de transmisión, como ser el semen de toros infectados estando discutida la posibilidad de que los embriones puedan ser participes en la transmisión del *Map*.

3.5. Seroprevalencia en el mundo

La Paratuberculosis bovina es una enfermedad que se encuentra distribuida mundialmente.

La mayoría de los estudios de seroprevalencia han sido realizados en rodeos lecheros, y utilizan la prueba de enzyme linked immunoassay, ELISA, utilizando el kit comercial de IDEXX Lab (HerdChek M.pt.) que detecta la presencia de anticuerpos contra *M.Paratuberculosis* en suero o plasma. (Braun R.Ky col.1990, Dargaz y col, 2001, 2004)

Estudios en algunos países presentan resultados de seroprevalencia baja, como Austria donde un estudio transversal encuentra un 2% de animales seropositivos, resaltando la mayor seroprevalencia en bovinos entre 5 y 7 años de edad (Gasteiner J.y col. 1999). Diferentes estudios en Estados Unidos muestran que la enfermedad está presente en los rodeos lecheros. Ensayos como el realizado por Collins M.T.y col,1994, en el estado de Wisconsin donde en un muestreo aleatorio transversal de 158 rodeos y 4990 animales testeados encuentra una seroprevalencia aparente de 7,2%, con un 50% de los rodeos con al menos 1 animal positivo. Johnson-Ifearegulu Y.J y Kaneene J.B (1999), encontraron en el estado de Michigan un 6,9% de bovinos serológicamente positivos, con un 66% de establecimientos con más de 1 animal reaccionante. Wells S.J. y Wagner B. (2000) en un estudio sobre factores de riesgo asociados al estatus serológico de la enfermedad en más de 1000 rodeos lecheros, encontraron que 3,4% de los animales y el 21,6% de los rodeos estaban infectados con *Map*. Otro estudio, esta vez realizado en el estado de Colorado, por Hirst H.L. y col. (2004), presentan un 4,12% de vacas adultas seropositivas de las 10280 testadas, con un 2,65% de prevalencia dentro de los rodeos. Los resultados de seroprevalencia señalados anteriormente contrastan con el encontrado en 1990 por Braun K. y col, que reportan en el estado de Florida un 17,1% de seropositividad. Estudios del NAHMS, (1997) muestran una seroprevalencia ajustada para *Map* en rodeos lecheros de más de 30 animales en producción de 3,4%, con un 21% de establecimientos seropositivos. Thorne J.y Hardin L. (1997), reportan un 8% de seroprevalencia aparente en ganado lechero, que ajustado por sensibilidad y especificidad de la prueba da 16% con un 47% de establecimientos positivos en el estado de Missouri

Otros estudios en Europa muestran resultados variables, Cetinkaya B.y col, (1998) mediante la utilización de un cuestionario postal estudiaron la prevalencia de la Paratuberculosis en ganado lechero en Inglaterra, por lo que la estimación es en base a lo reportado en los cuestionarios, con un 17,4% de rodeos que indican tener la enfermedad; Muskens J.y col. (2000) en Holanda, presentan resultados de seroprevalencia de 2,5% con un 55% de los rodeos con 1 o más animales reaccionantes positivos. En Bélgica, Boelaert F. y col, (2000), presentan una seroprevalencia individual de 0,87%, con un 18% de establecimientos con animales seropositivos. Jakobsen M.B.y col (2000), en Dinamarca encuentra valores individuales más altos, 8,8%, pero con 19 de 22 establecimientos testeados con al menos 1 animal seropositivo.

Sorensen y col en 2003, en Alberta, Canadá, realizaron un estudio serológico y por medio de pool de cultivos de heces, encontrando el 7% de seroprevalencia con un 20% de rodeos seropositivos.

En Argentina, Paolicchi F.y col (2002) presentan resultados de seroprevalencia real en diferentes regiones del país, siendo la Provincia de Buenos Aires la que presenta resultados más altos, 26,5% en ganado de carne y 56% en

ganado lechero, mientras que en el resto de Provincias testeadas la seroprevalencia oscila entre 0% y 7%.

Dragas y col en 2001 realizaron un estudio de seroprevalencia en ganado de carne, encontrando un 0,4% de seroprevalencia con un 7,9% de establecimientos seropositivos. Roussel y col en 2005 también en ganado de carne en el estado de Texas encuentran una seroprevalencia de 3% pero encuentran 50 de los 115 rodeos testados con al menos 1 animal seropositivo, lo que representa el 43%.

3.6. Factores asociados.

Como medida preventiva primaria, un establecimiento libre de paratuberculosis debe evitar el ingreso de animales infectados, manteniendo el rodeo cerrado, o tomando precauciones en el ingreso de animales al rodeo, ya sea testándolos de que estén libres de la enfermedad o que provengan rodeos libres. En rodeos lecheros con paratuberculosis la prevalencia dentro del mismo puede ser asociada a varios factores que pueden ir desde condiciones ambientales, cuidados con el ternero recién nacido y en crecimiento, manejo de vaquillonas preñadas, hasta la prácticas de manejo y eliminación que se realizan con el estiércol.(Goodger, W.J y Collins M.T. 1996;Johnson-Ifearulundu Y.J.y Kaneene J.B.1998; Wells S.J.,Wagner B.A.2000).

Varios estudios indican que el mayor riesgo de transmisión es durante la lactancia y primeros meses de vida. La predominante presentación subclínica de la enfermedad hace que sea difícil establecer medidas de control para la misma lo mismo que establecer el impacto en la producción que pueda tener la enfermedad. Las pérdidas atribuibles a la Paratuberculosis clínica pueden ser: disminución de la producción láctea, intervalo nacimiento-destete más largo, pérdidas de peso, disminución de la expectativa de vida, pérdida de potencial genético, infertilidad y aumento de incidencia de mastitis. El riesgo potencia 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 sintomatología clínica.(Goodger, W. y Collins M.T.1996; Johnson-Ifearulundu Y.J.y Kaneene J.B.1998; Muskens J. y col 2003 ; Wells S.J.,Wagner B.A.2000).

Existen numerosos estudios que asocian factores y prácticas de manejo con la presencia ya sea subclínica o clínica de la enfermedad. Los estudios sobre estos factores utilizan como forma de recolectar la información un cuestionario-encuesta con el que se obtienen información sobre prácticas de manejo, antecedentes sanitarios, datos productivos y reproductivos. Información sobre tamaño del rodeo, producción de leche, (diaria, mensual, y anual), ingresos de animales, número de refugos, tamaño del establecimiento, distribución de los potreros, rotación de las pasturas, manejo de los efluentes del tambo, medidas de higiene en el tambo, formas de eliminación de heces, uso de potreros solo para pariciones o compartidos, uso de potreros para vacas enfermas, tiempo de permanencia del ternero con su madre, uso de pool de calostro, uso de pool de leche, número de empleados dedicados a la cría de terneros, si los mismos son exclusivos para esa tarea o comparten tareas en cuidado de animales adultos (Johnson-Ifearulundu Y.J. y Kaneene J.B.1998; Johnson-Ifearulundu YJ y Kaneene J.B.1999). Factores no relacionados al manejo, tales como el clima y el suelo pueden influenciar la supervivencia del *Map*. lo que podría indicar que los factores asociados al riesgo pueden variar geográficamente (Muskens J . 2003).

Collins M.T y col. (1994), en base a un cuestionario para relevar prácticas de manejo y el estudio de seroprevalencia por la prueba de ELISA, identifican 3 factores como asociados a la presencia de seropositividad en rodeos lecheros que son: tamaño del rodeo, hospedaje del ternero post-destete, y localización geográfica. Goodger M.G. y Collins M.T. (1996), realizaron un estudio epidemiológico asociando prácticas de manejo y seroprevalencia, destacando como factores a tener en cuenta y ser priorizados en programas de control para limitar la presencia del *Map*, a las condiciones ambientales, a los cuidados en el nacimiento y en la recría de los terneros, al manejo de las vaquillonas, y al manejo del estiércol y efluentes. Señalen que la posibilidad de un rodeo de estar infectados está directamente relacionado con la frecuencia con que se compran reemplazos de otros rodeos y que la identificación de factores fuertemente asociados a altas prevalencias aparentes, pueden ser de utilidad a fin de priorizar los pasos a dar a fin de establecer programas de control de la enfermedad pero que identificar factores con baja asociación puede resultar de igual importancia. En cuanto a los resultados económicos resulta también importante eliminar practicas de manejo ineficaces y no solo reducir la prevalencia de la enfermedad.

Johnson-Ifearulundu Y.J. y Kaneene J.B. (1998) en un estudio donde el 55% de los rodeos presentaban resultados positivos, incluyeron para el análisis univariado 97 factores de riesgo, pero el modelo multivariado final solo rescató cinco factores como asociados al estatus de rodeo infectado que son: antecedentes de animales positivos en los últimos tres años, agrupamiento de grandes densidades de animales en áreas donde la limpieza y el retiro de el estiércol es infrecuente o incompleto y el lavado de la ubre antes de que los terneros mamen, que los consideran como factores de riesgo de infección, mientras que el lavado de las instalaciones de alojamiento de los terneros y la aplicación de cal en pasturas e instalaciones que cambiaría el pH del ambiente, reduciendo la habilidad del *Map* de competir con otros microorganismos por el hierro disponible, aparecen como asociados con reducción de los casos clínicos. Podrían considerarse como factores protectores. De esos factores solo uno aparece directamente relacionado a la introducción o presencia de un animal infectado en el rodeo, que es la historia de animales positivos en el rodeo en los últimos tres años. Los otros cuatro factores estarían íntimamente asociados a la transmisión de la infección dentro del rodeo.

Obasanjo I.O y col. (1997) utilizando la metodología del cuestionario y la prevalencia de infectados con *Map* por cultivo de heces y ELISA, y mediante un estudio de regresión logística univariada identifica factores como asociados a la presencia de infección por *Map*. concluyendo que rodeos sin diagnóstico clínico de la enfermedad tienden a ser negativos; que el incremento de casos clínicos en el año previo, se asoció positivamente con el cultivo de heces; que la exposición de terneros a heces de animales adultos igual, y establecimientos que no refugan los positivos rápidamente tienen más posibilidades de ser positivos que aquellos que eliminan los animales positivos inmediatamente a su identificación.

Wells S.J. y Wagner B. (2000) evaluaron la asociación entre la seroprevalencia, las prácticas de manejo y el conocimiento previo de la enfermedad por los granjeros o el diagnóstico anterior de la enfermedad en los rodeos en más de 1000 tambos. En el 32% de los establecimientos estudiados no era rutina la limpieza de los pezones previo a la recolección del calostro, el 16% utiliza rutinariamente el área de parto como sitio para tratar a los animales enfermos, en el 12% de los tambos el equipo que se utiliza para limpiar el estiércol al menos semanalmente se utiliza para manejar el alimento de los animales jóvenes; las terneras se alimentan y

abreван con adultos en un 25% de los tambos, y las vacas próximas al parto se alojan en el mismo lugar que las vacas lactando en el 54,6% de los rodeos lecheros. Para el estudio multivariado se incluyeron 5 factores: número de vacas en el tambo, en la región, el porcentaje de vacas nacidas en otros rodeos, uso de alojamiento grupal para vacas próximas y uso de alojamiento grupal para terneros previo al destete. Tambos con más del 25 % de vacas nacidas en otros sitios presentan 2,1 veces más posibilidades de ser positivos que los que crían sus propios reemplazos. Alojamientos grupales para vacas próximas y terneros sin destetar están positivamente con el estatus de infección del rodeo (Odds ratio= 1,5) y luego de ajustar el modelo con otras variables, los rodeos más grandes tienen más probabilidad de ser infectados. Establecimientos con encargados familiarizados con la enfermedad con diagnóstico previo de la misma tienen más probabilidad de ser positivos que aquellos en los que están familiarizados pero sin diagnóstico previo o los que no están familiarizados.

Muskens J. y col.(2003) en base a seleccionar establecimientos seropositivos y seronegativos a la prueba de ELISA, y una encuesta basada en cuatro puntos: características generales del establecimiento, variables de manejo asociadas a la transmisión del *Map.*, higiene de las instalaciones, y variables en el manejo de la alimentación de los terneros realizaron un estudio univariado para estimar diferencias. Las variables con nivel de significancia $P < 0,30$, fueron incluidos para el estudio multivariado. El tamaño del rodeo fue el único factor de riesgo asociado a la seroprevalencia que se encontró en el análisis multivariado. La presencia de casos clínicos fue mayor en el grupo seropositivo que en seronegativo. La acidez del suelo no presentó diferencias entre los grupos a diferencia de lo encontrado por Johnson-Ifearegundun y Kaneene (1999), que señalan que existe mayor prevalencia en regiones con suelos ácidos ricos en hierro. Tampoco hubo diferencias significativas entre los dos grupos en la higiene de las instalaciones, lo mismo que el tiempo de permanencia con la madre.

Hendrick y col (2005) describen que los animales positivos ya sea a cultivo de heces o ELISA, tienen mayor posibilidad de ser descartadas o eliminadas del rodeo que las negativas.

Hirst y col (2004) toman el dato de ingreso de animales al rodeo en los últimos cinco años y calculan la tasa de ingreso. Mediante un análisis de regresión logística, determinan la asociación del número de animales o la tasa de ingreso con el estatus serológico del rodeo y encuentran una correlación positiva entre la tasa de ingreso y la seroprevalencia positiva y entre el tamaño del rodeo y la seropositividad. También señalan que bovinos de rodeos de más de 600 vacas en ordeño tienen 3,12 veces más probabilidad de ser seropositivas que en rodeos menores en tamaño, del mismo modo bovinos de rodeos con historia clínica de la enfermedad tiene 2,27 más posibilidades de ser reaccionante positivo que en rodeos sin historia de enfermedad

Chi J. y col, (2002) realizaron una evaluación en 90 rodeos lecheros de Canadá, y sobre 27 prácticas de manejo analizadas, encontraron que la introducción de nuevos animales es el único factor de manejo asociado con prevalencias altas de partuberculosis

Berghaus R.D y col (2005), trabajan con la información obtenida en el estudio del National Animal Health Monitoring system (NAHMS) en 2002 (Dairy 2002) que se realizó en 21 estados de Estados Unidos, representando el 83% de las operaciones lecheras y el 87% del ganado lechero. Se realizó una evaluación de riesgo en paratuberculosis, en 815 tambos, donde se evaluaron practicas de manejo

que pueden ser importantes en la transmisión del *Map*. y para estimar la prevalencia dentro de los rodeos. El estudio se basó en un cuestionario-encuesta en el cual el encuestador asignaba un valor o score a la mayoría de los ítem en base a su observación subjetiva. Para estimar la prevalencia se utilizó la prueba de ELISA y el cultivo de heces. Las preguntas del cuestionario comenzaban sobre signos clínicos compatibles con paratuberculosis, historia de la enfermedad en el establecimiento, resultados de test diagnósticos en el último año. El resto de las preguntas evaluaban prácticas de manejo y áreas específicas del establecimiento como ser área de parto, cría de terneros pre y posdestete, cría de vaquillonas y vacas adultas. A mayor score, mayor riesgo percibido por el encuestador. Mediante la utilización de un programa estadístico, y el método de análisis factorial se analizaron las variables de riesgo. La extracción del factor inicial fue realizada utilizando el método del componente principal. Variables con valores propios mayores o iguales a 1 fueron retenidos para realizar la evaluación de riesgo, utilizando en el modelo final de regresión logística multivariado 11 factores, que explican el 65% de variación de las 38 variables inicialmente tomadas. El análisis factorial demostró que muchas de las variables incluidas en el cuestionario de evaluación de riesgo están estrechamente relacionadas.

Carpenter y col (2004) desarrollaron un modelo de simulación simple para estimar el riesgo de introducción del *Map* en un rodeo, asociado a la compra de hembras de reemplazo. Para testar el ganado se utilizó la prueba de ELISA o combinado ELISA y cultivo de heces. Para la simulación la utilizaron el programa @RISK. Concluyen que introducir animales testados tiene un beneficio mínimo si los animales se compran de un rodeo conocido con baja prevalencia y que testar los animales es una posibilidad cierta de poder tener rodeos libres de *Map*.

Las razones por las cuales los diferentes estudios encuentran distintas variables asociadas a la enfermedad se podría deber a varios factores, que pueden ir desde la utilización de diferentes metodologías, hasta como cada estudio define la positividad del rodeo y la población bajo estudio. En cuanto a metodologías no es lo mismo un estudio que evalúe factores de riesgo dentro de rodeos infectados que evaluar entre diferentes rodeos (Wells S.J. y Wagner B.A. 2000).

Collins M.T. en 2002 realizó un estudio para la interpretación de la prueba de ELISA utilizando la razón de probabilidad (Likelihood ratios, LR). La interpretación tradicional de la prueba de ELISA es dicotómica, positivo o negativo basado en un punto de corte definido en base a la sensibilidad (Se) y especificidad (Es) de la prueba. El LR., deriva de la estimación de la Se y la Es. La aplicación de este método lleva a la creación de 5 categorías de interpretación del resultados de ELISA. Este esquema disminuye efectivamente el punto de corte para la identificación de animales con alto riesgo, a un valor S/P mayor o igual a 0,10, (el punto de corte para el productor del kit es 0,25).

Naugle A.L. y col. 2004 en base a un relevamiento realizado por un cuestionario enviado por correo señalan que participar de un programa de testeo en paratuberculosis esta asociada con la adopción de medidas de manejo para el control de la enfermedad. Productores que opinan que sus rodeos están libres de Paratuberculosis no piensan que es innecesario adoptar medidas de manejo para prevenir o controlar la misma.

3.7. DIAGNÓSTICO.

Las técnicas de diagnóstico que pueden ser utilizadas son influenciadas por el estado evolutivos de la enfermedad en el animal, y la prevalencia en los rodeos. Numerosas técnicas de diagnóstico han sido desarrolladas buscando la detección del agente causal, pero este hecho es muy variable, dependiendo de la sensibilidad y especificidad de cada prueba. Tomar medidas de control así como disminuir la diseminación de la misma dependerá de la posibilidad de detectar la infección lo más temprano posible. La detección de estados subclínicos no es simple, la respuesta inmune es débil o ausente, con ausencia de anticuerpos y la detección de la inmunidad celular es la forma de poder diagnosticar estados tempranos de la enfermedad. En estados clínicos de la enfermedad son detectables la respuesta humoral y el *Map* es detectable en cultivos de heces

3.7.1. IDENTIFICACIÓN DEL AGENTE

3.7.1.1. IDENTIFICACIÓN MICROSCÓPICA.

La identificación microscópica del agente en frotis de materia fecal y tejidos como intestino y ganglios linfáticos utilizando la tinción de Ziehl Nielsen, puede ser realizada visualizándose agregados de bacilos ácido alcohol resistentes en grupos de tres o cuatro. Es una técnica de muy baja sensibilidad en la etapa subclínica de la enfermedad adquiriendo más relevancia en estados clínicos avanzados. El éxito de esta técnica depende del número de bacterias presentes en la muestra y de la experiencia del bacteriólogo. En etapas tempranas de la infección la positividad es baja, pero aumenta en estados avanzados y con síntomas clínicos. Sin embargo esta técnica no distingue *Map* de otras micobacterias, por lo que su uso práctico no es lo recomendado. Solo el 25 al 35% de las muestras en que se aísla el microorganismo, se identifica por microscopia directa. (Cocito y col. 1994; Thoen C. y Haagsma J. 1996)

3.7.1.2. CULTIVO DE HECES y LECHE.

El cultivo bacteriológico a partir de heces o de tejidos ha sido por muchos años el test más utilizado para detección del agente. Es el método más confiable y específico, pero tiene la desventaja de ser poco sensible, de requerir entre 10 y 12 semanas de incubación y comúnmente resultar contaminado por estas razones se han desarrollado procedimientos que llevan a reducir la contaminación tanto de bacterias como de hongos basados en la utilización del medio de Herrold y antibióticos. Se describen dos medios utilizados clásicamente para el aislamiento, el de Lowenstein-Janssen que utiliza ácido oxálico y NaOH para descontaminar la muestra y el Herrold's egg yolk medium que utiliza hexadecylpyridinium (HPC) para descontaminar. Ambos utilizan Mycobactina. La mayoría de los Laboratorios utilizan el medio de Herrold, el que puede ser preparado en el mismo o puede ser comprado a una empresa comercial. Tanto la concentración selectiva como la descontaminación son críticas para la sensibilidad del test. El HPC es el más utilizado y aceptado como el menos peligroso para el *Map* y el más eficiente para eliminar otras micobacterias de la muestra. Una desventaja del cultivo 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. Se considera que la especificidad del método es 100%, por lo se lo puede considerar el test standard o de oro. Respecto a la sensibilidad, se ha mejorado en base a modificaciones de la técnica, tales como la centrifugación y el aumento en volumen de 1 a 2 gramos Otra alternativa para aislamiento es empleando un sistema conocido como BACTEC, un medio líquido que contiene un nutriente marcado con un radioisotopo (Palmitato + $^{14}\text{CO}_2$). El crecimiento del *Map* en este medio es detectado por con un equipo, BACTEC 460, que detecta la liberación del $^{14}\text{CO}_2$ del palmitato debido al metabolismo bacteriano. Combinada con una concentración de la muestra por filtración, el sistema BACTEC detecta muestras positivas más rápido, y tiene mayor sensibilidad. Otros métodos han sido desarrollados para el aislamiento del *Map*, el sistema MGIT, que utiliza tecnología fluorométrica para indicar crecimiento, con la misma capacidad de detección y con las ventajas respecto al BACTEC que no es un sistema radiactivo y puede leerse manualmente con un transiluminador UV y el sistema MB/BacT, también un sistema no radiactivo, que se incuba en una estufa de cultivo especial, que monitorea cada 10 minutos los cambios en la producción de CO_2 , basado en la reflexión de la luz por un sensor colocado en la base de la botella que contiene el medio.(Chiodini, R.J. y col.1984;Collins M.T.1996; Stabel, J.R.1996;Stabel, J.R.1998; McDonald W.L. y col 1999 ;Eamens G.J.y col. 2000; Muskens J. y col; Stich R.W.y col 2004).

3.7.1.3. TÉCNICAS MOLECULARES

El advenimiento de pruebas de diagnóstico molecular para el *Map* han permitido que un microorganismo fastidioso sea más rápidamente identificado tanto en muestras de materia fecal como en leche. La estrategia requiere la identificación de secuencias de DNA solo del *Map*, siendo las primeras herramientas el análisis de hibridación, pero el desarrollo del test de la Reaccion en cadena de la Polimerasa (PCR) posibilitó tener 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 tanto en heces como en leche, 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*. Las secuencias de inserción o elementos genéticos móviles son pequeños segmentos de DNA, capaces insertarse dentro y entre genomas de procariontes pudiendo generar mutaciones. La primera secuencia conocida es la IS900, descrita hace ya 15 años. Como subespecie, el *Map* se diferencia genotípicamente del *Maa* y del *Más* por la presencia de múltiples copias de la secuencia de inserción IS900 y la ISMav2 La IS900 presenta entre 14 y 18 copias en el genoma del *Map*, por lo que es un buen blanco para buscar su presencia. El primer PCR desarrollado fue basado en la IS900, realizándose primers para esa secuencia, pero algunos autores usando esos primers amplificaron productos de PCR de Micobacterias ambientales relacionados con la IS900, por lo que existe la posibilidad de obtener resultados falsos positivos.(Moreira A.R., y col, 1999, Gasteiner J, y col. 2000; Giese S.B.y Ahrens P. 2000; Garrido J.M., y col 2000, Harris N.B. y Barletta R.G.2001 ;Strommenger B.y col 2001 ;Shin S.J. y col. 2003). Existen variantes variante del PCR como ser el Multiplex PCR (MPIL), que requiere cantidades mínimas de DNA, el Nested PCR, PCR en tiempo real, Otras técnicas de Biología Molecular se han descrito, y se emplean actualmente, pero utilizadas

fundamentalmente para caracterizar las cepas y realizar estudios de Epidemiología molecular. Una de ellas es el RFLP (polimorfismo en el largo de los fragmentos de restricción), que se realiza digiriendo el DNA con enzimas de restricción y separando los fragmentos por electroforesis. PFGE (secuenciación y electroforesis en campos pulsados, que es una adaptación del RFLP, que utiliza otras enzimas de restricción que corta los fragmentos de DNA de mayor peso molecular; RAPDS, (amplificación al azar de del DNA). El análisis de las secuencias repetidas dentro del genoma puede ser también útil para diferenciar entre los diferentes subtipos, VNTR (numero variable en tandem), SSR (Secuencias cortas repetidas) o MIRU. (Motiwalla A.S. 2006; Romano M.I 2005).

3.7.2. TEST BASADOS EN LA DETERMINACIÓN DE LA INMUNIDAD CELULAR:

El hecho de que la inmunidad mediada por células predomina en la fase subclínica de infección del *Map* ha llevado a evaluar varios ensayos como herramientas de diagnóstico con el objetivo de la detección precoz de la enfermedad. Actualmente se cuenta con dos pruebas disponibles para medir la inmunidad mediada por células en el bovino. La prueba cutánea intradérmica y la prueba de ELISA para detección de IFN γ . La prueba cutánea intradérmica está basada sobre la medida in-vivo de la respuesta 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 proliferación de linfocitos en respuesta a los antígenos es otra medida de la función inmune célula-mediada y se ha evaluado como una herramienta para el diagnóstico de paratuberculosis. La prueba intradérmica comparada utiliza dos tipos de inóculos: Purificado Proteico Bovis (PPB) (1mg/ml) y Purificado Proteico Avium (PPA) (2.500 UI). Se aplica 0.1 ml en forma intradérmica respectivamente, a nivel de la tabla del cuello del bovino. Luego de haber medido el espesor de piel con un cutímetro o calibre se inocula la tuberculina bovis a unos 10 cm de la porción superior del cuello y la aviar a 12 cm por debajo del punto de inoculación de la bovis. La lectura se realiza a las 72 h. pos-inoculación, registrándose el incremento del grosor de la piel en cada punto de inoculación. La prueba se considera positiva a *Map* si el Purificado Proteico Aviar inoculado presenta un engrosamiento o pápula en la piel mayor entre 2 y 5 mm. (Chiodini, R.Jy col.1984; Kalis C.H.J y col ; Dunn J.R y col. 2005).

Kalis y col. en 2003, manifiestan que las pruebas basadas en medir la respuesta celular pueden ser muy útiles en programas de control de la enfermedad siendo muy beneficioso poder refugar animales antes de que comiencen a eliminar *Map* por heces. También se ha desarrollado un kit de ELISA para determinar IFN γ en linfocitos sensibilizados, incubados durante 18 hs. con el antígeno específico (Stabel, J. R; Stabel, J. R y Whitlock R H. 2001). El test IFN γ es una prueba rápida de inmunidad mediada por células para la detección de paratuberculosis y tuberculosis. Generalmente animales infectados con Mycobacterias presentan linfocitos en su circulación que pueden reconocer antígenos específicos de Mycobacterias. Parte de este proceso de reconocimiento incluye la secreción de determinadas citoquinas las cuales están involucradas en la respuesta inmune del huésped. Los linfocitos previamente estimulados por la infección con Mycobacterium paratuberculosis pueden ser estimulados posteriormente in Vitro con un antígeno (derivado proteico purificado) extraído del Mycobacterium. La

estimulación de linfocitos T es posteriormente detectado con anticuerpos monoclonales por medio de un test de ELISA sándwich. Los linfocitos de animales no infectados al ser estimulados por el antígeno no liberaran IFN γ pudiendo de esta forma diferenciarse de los anteriores. 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 tuberculosis y la paratuberculosis bovina. (Dunn J.R y col. 2005; Gwozdz J.M.; Stabel, J.R y Whitlock R.H. 2001). Según Huda y col,(2003) (2004) este test es más útil para detectar animales jóvenes, entre 1 y 2 años que han sido expuestos al *Map* que los test que detectan respuesta humoral. Jungersen y col, (2002), señalan que que el test de IFN γ brinda una muy buena información en animales jóvenes, entre 16 y 20 meses, lo que permitiría evaluar las medidas preventivas adoptadas.

3.7.3. TEST SEROLÓGICOS:

Las pruebas serológicas utilizadas para la detección de anticuerpos contra *Map* son la Fijación de Complemento (FC), Inmunodifusión en gel agar (IDGA) y ELISA. La respuesta inmune en base a anticuerpos ocurre en forma tardía, por lo tanto estos test no son recomendados para ser utilizados en las fases subclínicas de la enfermedad. Estos test son rápidos, económicos y posibilitan la realización de estudios a gran escala, por ejemplo en programas de control de la enfermedad. La prueba de Fijación de Complemento se usa desde inicios del siglo 20, y presenta buena sensibilidad en casos clínicos y algunos autores indican que en Europa la recomiendan como prueba para confirmar casos clínicos de paratuberculosis. (Kalis C.H. y col. 2002)

Ferreira y col, 2002, estudiaron la utilización de la IDGA como test para el diagnóstico de Paratuberculosis comparándolo en un ensayo que incluyó 48 muestras con 3 diferentes kits de ELISA, encontrando que presenta una sensibilidad de 57% y una especificidad de 92,5%.

La prueba de ELISA es una prueba rápida de llevar a cabo más sensible y específica que la FC y la IDGA y es la de preferencia para estudios de rodeos. A partir de la pre.-absorción de los sueros con *Mycobacterium phlei* la especificidad del test se incrementó.(Yokomizo Y. y col. 1983; Collins M.T., y Sockett D.1993; Harris N.B. y Barletta R.G. 2001)

Estudios realizados por Dargaz D. y col (2001; 2004; Bottcher J. y Gangl A, 2004) señalan que el kit comercial Idexx para detección de anticuerpos contra *Map* presenta una sensibilidad 50%, y una especificidad de 96,8%, por lo tanto solo el 50% de los animales verdaderamente infectados son detectados, mientras que el 96% de los animales sanos son clasificados como negativos por el test. Según Withlock y col, (2000) la sensibilidad de la prueba ELISA relativa al test de oro, el cultivo de heces es de 87% en animales clínicamente enfermos, 75% en animales eliminadores fecales de *Map* en grandes cantidades 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 número 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). Wells y col (2002) señala que el ELISA detecta anticuerpos circulantes y el cultivo bacteriológico detecta microorganismo en heces, por lo que no debe sorprender que los dos test no presenten acuerdo en animales individuales y señalan que el ELISA es el test más

conveniente y más utilizado como prueba de tamiz para analizar un gran número de animales.

McKenna y col en 2005 y 2006 evaluaron tres diferentes kits comerciales de ELISA encontrando un desacuerdo entre los tres.

Hirst y col, (2002), señalan que no existe repetibilidad de la prueba de ELISA cuando un animal es retestado más adelante en el tiempo. Señalan que valores altos de S/P probablemente repitan el resultado. Animales clasificados como positivos con S/P de 0,40 o 0,70 tiene mayor probabilidad de repetir el resultado que aquellos positivos con S/P de 0,25.

Paolicchi F y col (2003), señalan que la prueba de ELISA de absorción 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 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 hacerse estudios en más animales

Algunos estudios tratan sobre la utilización de la prueba ELISA en leche. (Nielsen S. y col 2002; Stabel J.R.y Goff J.P.2004; Collins M.T y col 2005 ;Hardin y col, en 1996 compararon la prueba de ELISA en suero con leche, encontrando una baja correlación entre ambas, mientras que Hendrick y col en 2005⁵⁴ en un estudio en el que comparan el ELISA en leche , en suero y con el cultivo de heces encuentran una mala correlación entre ambos ELISA, pero una buena asociación entre el ELISA en leche y el cultivo de heces. Klausen y col, 2003⁷³ evalúan la prueba de ELISA en suero y leche, encontrando diferencias entre los resultados de ambas, pero 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. Billman y col. (1992), comparan la capacidad de la prueba de ELISA de absorción para anticuerpo y dos test para detección de IFN γ y concluyen que esta última prueba es tiene buena sensibilidad y especificidad para detectar animales en todos los estados de infección mientras que el ELISA de absorción detecta solo animales en estados avanzados de la enfermedad pero con una alta especificidad, lo que la hace una herramienta útil para confirmar el estatus de rodeos libres de paratuberculosis.

3.8. POSIBLE RELACIÓN ENTRE PARATUBERCULOSIS Y LA ENFERMEDAD DE CROHN.

La enfermedad de Crohn es una afección de los humanos, que se caracteriza por un proceso inflamatorio crónico intestinal, que afecta más comúnmente íleon y colon. Es una enfermedad que afecta seriamente la calidad de vida del paciente que fue descrita con claridad en 1932 por Crohn, Ginsburg y Oppenheimer, habiendo sido anteriormente encontrada en pacientes en Escocia.. Estos casos fueron llamados granuloma no específico. En la década de los 80, la enfermedad fue reconocida afectando otras porciones del tracto digestivo, como ser boca, esófago, estómago y otros tejidos como la piel, músculo y hueso. Su etiología es incierta, y fundamentalmente se la asocia con un origen autoinmune, aunque numerosos estudios recientes la asocian a la paratuberculosis (Chiodini R.J,1989). Chamberlin W. y coll. 2001, señalan que los avances tecnológicos en el diagnóstico, con el desarrollo de técnicas moleculares, han permitido la identificación o el aislamiento del *Map* en mayor proporción de tejidos con enfermedad de Crohn que en controles

y entre el 35 y 40% de los pacientes con enfermedad de Crohn presentan *Map*, detectados por aislamiento o por hibridación in situ. Sechi y col en 2005, detectan por PCR y cultivo que la mayoría de los pacientes con Crohn, en la isla de Sardinia, están infectados con *Map*. Nacer y col en 2004, detectan *Map* viable en sangre periférica de una proporción importante de pacientes con enfermedad de Crohn. Sin embargo Kanazawa y col en 1999 realizan un estudio en 13 pacientes con enfermedad de Crohn. Utilizando la técnica de PCR anidado para la IS900, no detectan *Map*, por lo que sugieren que el *Map* no participa en la patogénesis de la enfermedad de Crohn.

Ellingson J. y col. 2003 por la técnica de PCR no detectan la secuencia de inserción IS900 en pacientes con enfermedad de Crohn, y concluyen que en esos tejidos y por medio de esa técnica no es posible asociar al *Map* con la enfermedad de Crohn. Estudios en Uruguay realizados por Iade y col. 2005 describen las características clínicas y evolutivas de pacientes con enfermedad de Crohn, destacando que se presenta fundamentalmente en adolescentes y adultos jóvenes, con un predominio de lesiones en yeyuno, ileon, pero con un mayor compromiso del colon que lo esperado.

Greenstein R. en 2003 opina que a pesar de que se considera a la enfermedad de Crohn como de origen autoinmune, existen evidencias crecientes de que su etiología puede ser infecciosa. Opina que el *Map*, se ha encontrado en leche de animales domésticos, no se elimina totalmente en los procesos estándares de pasteurización e incluso ha sido identificado en leche de dos mujeres enfermas de Crohn.

4 . OBJETIVOS

4.1. 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.

4.2. 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.

5. 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 nexos 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. En este último departamento se trabajó a través del Centro Veterinario el cual conformó 5 grupos de profesionales que compartieron las responsabilidades y el trabajo de campo. En el departamento de Colonia se trabajó con un solo profesional quien colaboró con las actividades de campo realizadas allí.

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 (Anexo 1) incluyó preguntas sobre características físicas y prácticas de manejo general del establecimiento como ser:

1. número de animales: totales, en ordeño, secas, otros animales,
2. si recría en el propio establecimiento o utiliza un campo de recría común a varios productores,
3. producción lechera diaria, mensual
4. calidad de la leche,
5. destino de la producción,
6. manejo de efluentes,
7. antecedentes de casos clínicos y de diagnóstico de la enfermedad,
8. sistema de incorporación de los reemplazos,
9. estrategia para eliminación de animales o refugio.

También se realizó un cuestionario estructurado en base a preguntas cerradas ej. (Si/No) donde se buscó evaluar practicas 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 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 muestrearon 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 del coágulo, y fue trasvasado por duplicado a viales tipo eppendorf de 1,5 ml. Posteriormente se identificaron, rotularon y se 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 Oficina Internacional de Epizootias (OIE) y los procedimientos del proveedor del kit diagnóstico.

Para la detección de anticuerpos contra la Paratuberculosis se utilizó la técnica de ELISA (enzyme linked immunoassay). 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. El test es un ELISA en fase sólida donde las reacciones cruzadas son removidas en un paso de absorción donde antígenos de *Mycobacterium phlei* son incluidos en el reactivo para hacer la dilución de la muestra.⁽¹³⁴⁾ Utilizando una microplaca de ELISA, antígenos de *Map* son adsorbidos a la misma. Las muestras son diluidas en el reactivo de dilución, colocadas en el pocillo de la microplaca, si existen anticuerpos específicos se formara un complejo que permanecerá luego de los lavados indicados. Utilizando un anti-anticuerpo conjugado con peroxidasa (HRPO), y posteriormente un sustrato enzimático se revelará la reacción, siendo la tasa de conversión del sustrato proporcional a la cantidad de inmunoglobulinas ligadas. Por lo tanto el color desarrollado por la reacción es proporcional a la cantidad de anticuerpos de la muestra. La densidad óptica es medida a 650 nm en un lector de placas Multiskan II, de Labsystem. 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 OR (odds ratio). Para factores con más de dos categorías en escala ordinal se utilizaron pruebas de Chi cuadrado de homogeneidad y de tendencia con los procedimientos de Mantel-Haenszel. 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 y Lemeshow⁵⁸.

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.

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.

RESULTADOS

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.

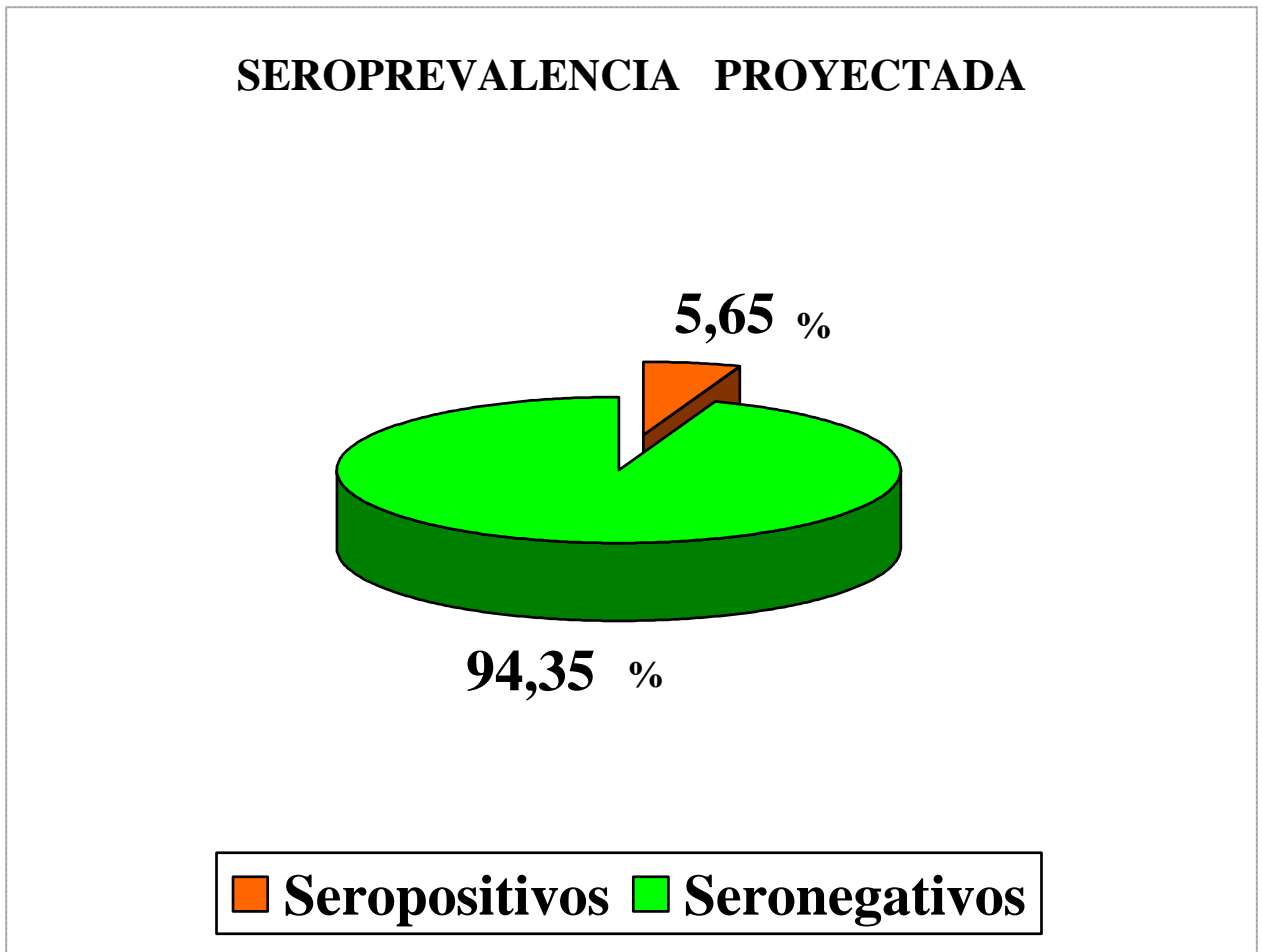


Gráfico N° 1: Seroprevalencia de Paratuberculosis bovina en rodeos lecheros de los departamentos de Colonia y Florida.

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)

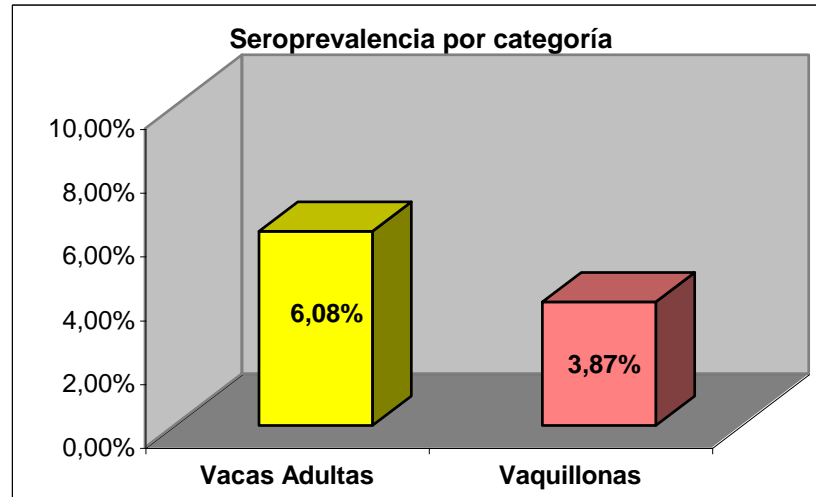


Gráfico N° 2: Seroprevalencia de paratuberculosis bovina en vacas adultas y vaquillonas en los departamentos de Florida y Colonia.

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)

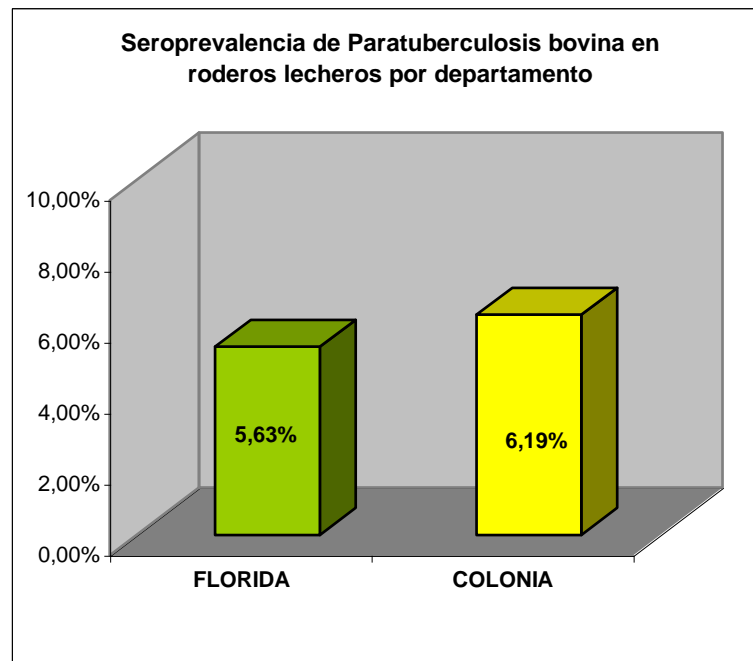


Gráfico N° 3: Seroprevalencia de Paratuberculosis bovina por departamento

Estudio de seroprevalencia a nivel de establecimientos

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

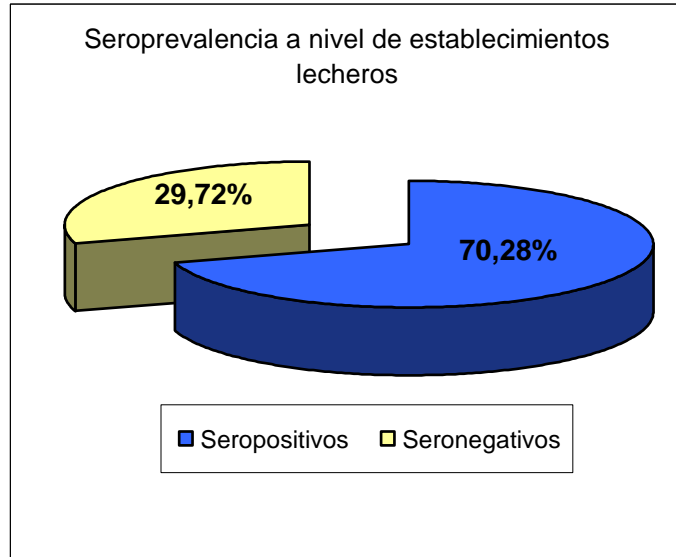


Gráfico N° 4: Seroprevalencia de Paratuberculosis bovina a nivel de establecimientos lecheros en los departamentos de Florida y Colonia

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 serológicamente 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).

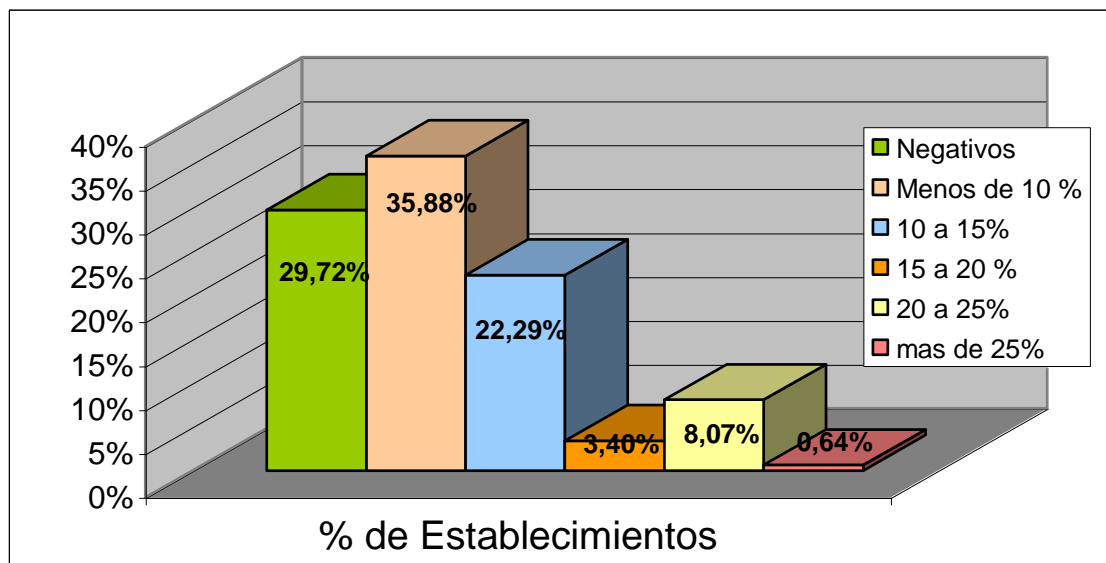


Gráfico N° 5: Estratificación de los rodeos lecheros estudiados según la seroprevalencia que presentan.

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.(Gráfico N° 6).

Estratificación de establecimientos

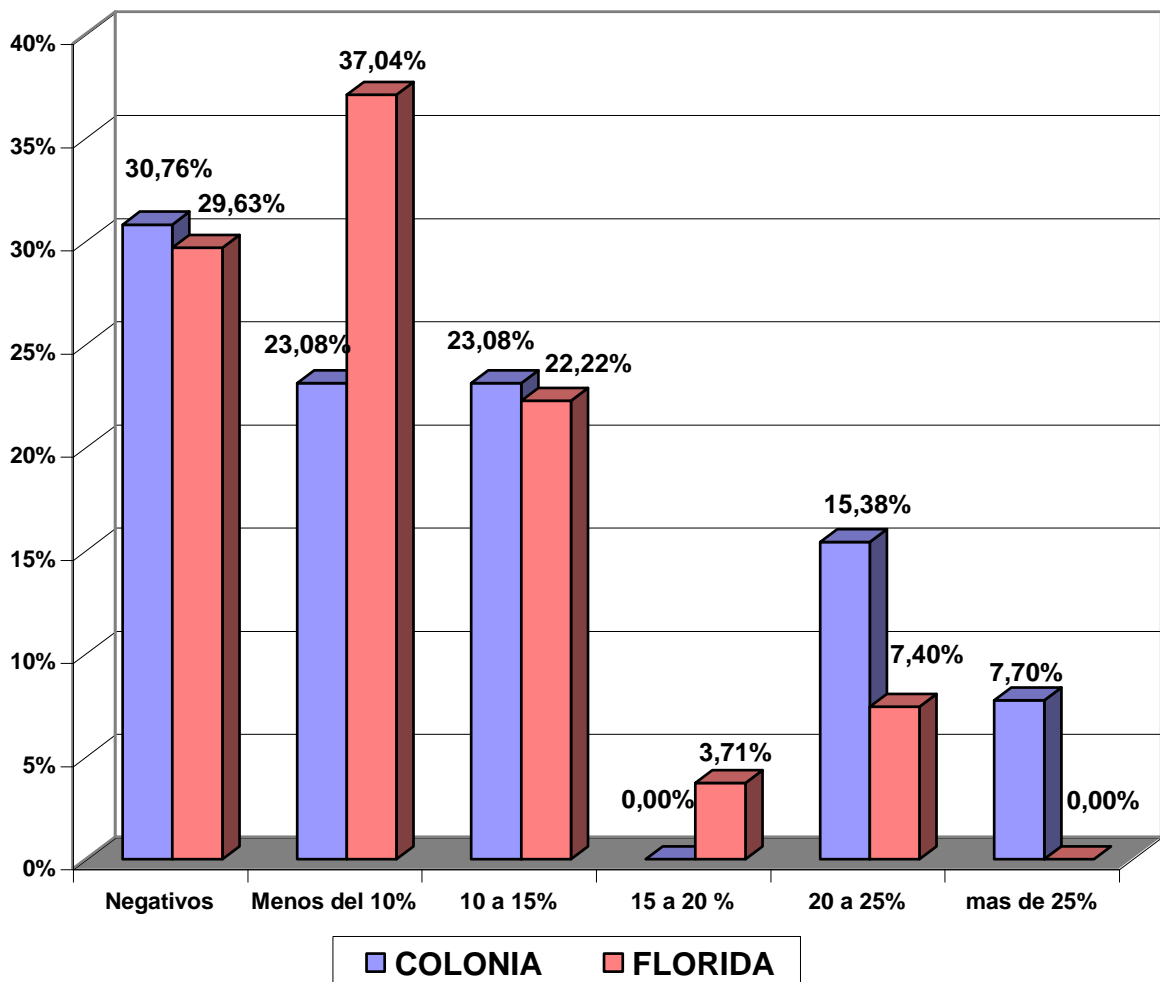


Gráfico N° 6 : Estratificación de los rodeos lecheros de Colonia y Florida según la seroprevalencia que presentan.

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.

	Freq.	Porcent
Control	40	43,48
Caso	52	56,52
Total	92	100

Análisis Univariado

El estudio individual que detalla la asociación de cada variable en forma aislada con la presencia de casos se muestra en la tabla N° II. 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)

Tabla N° II: Estudio univariado

nombre	variable	OR	signif
Frec. obs. AP	r1_9	.6333333	.3358934
Estiercol en AP	r1_2	.6696429	.3860851
Contam. Ubres	r1_8	.7179487	.4988359
Empl. contacto con vacas	r1_10	.7589286	.6581554
Enfermos PT en AP	r1_5	.8292683	.8551136
Nacim. fuera AP	r1_3	.9478022	.9095675
+ 3 Horas	r1_6	1.2	.8986015
Nodrizas	r1_7	1.935484	.2355237
Enfermos en AP	r1_4	3.214286	.0382557
varias vacas en AP	r1_1	5.419355	.1025742
Pool Calostro	r2_1	.75	.5316377
Contam. estiercol	r2_4	1.101449	.8340591
Pool Leche	r2_2	1.225806	.7850404
Contacto adultos	r2_3	3.882353	.0830908
Contam. estiercol	r3_2	1.5	.4131761
Cerca de adultos	r3_1	1.583333	.3291725
Pastoreo c/adultos	r3_3	1.846154	.2166594
Cerca de adultos	r4_1	.7703349	.5715151
Pastoreo c/adultos	r4_2	.952381	.9155098
Contam. galpones	r5_2	.8461539	.8440632
Contam. comederos	r5_1	.9916667	.9854994
Acceso estercolero	r5_3	1.774194	.3097956

Análisis Multivariado

El modelo de regresión logística se corrió con la variable respuesta caso-control y con las variables independientes: r1_7, r1_4, r1_1, r2_3 y r3_3. 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 r1_4.

La variable independiente seleccionada r1_4 corresponde a si se 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 $p=0,081$. (Tabla N° III)

Tabla N° III: Regresión logística.

Regresión Logística		Número de obs	=	75	
		LR chi2 (3)	=	24.29	
		Prob > chi2	=	0.0000	
Log likelihood = -39.299268		Pseudo R2	=	0.2361	
casos	Odds Ratio	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
Muestreo	.1199305	.0719586	-3.53	0.000	.0370004 .3887342
vacas_ord	.9943992	.0030789	-1.81	0.070	.9883829 1.000452
r1_4	3.281778	2.231876	1.75	0.081	.8654119 12.44502

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. (Tabla N° IV)

Tabla N° IV.:Remplazos: diferencia entre casos y controles.

Remplazos			
casos	Propios	Compra	Total
Control	35	5	40
	40.23	5.75	45.98
Caso	40	7	47
	45.98	8.05	54.02
Total	75	12	87
	86.21	13.79	100.00
Fisher's exact =			1.000

A pesar de que un 53,33% de los casos presentaban diarrea crónica, no hubo diferencia significativa con el grupo 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*. (Tabla N° V)

Tabla N° V: Diarrea crónica : diferencia entre casos y controles.

Diarrea Crónica			
casos	No	Si	Total
Control	25	15	40
	62.50	37.50	100.00
Caso	21	24	45
	46.67	53.33	100.00
Total	46	39	85
	54.12	45.88	100.00
Fisher's exact =			0.191

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. (Tabla N° VI)

Tabla N° VI: Diagnóstico clínico de Paratuberculosis bovina: Diferencia entre casos y controles

Diagnostico Clínico de Paratuberculosis			
casos	No	Si	Total
Control	36 92.31	3 7.69	39 100.00
Caso	39 84.78	7 15.22	46 100.00
Total	75 88.24	10 11.76	85 100.00
Fisher's exact =			0.331

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. (Tabla N° VII).

Tabla N° VII: Descarte por diarrea: Diferencia entre casos y controles

Descarte por Diarrea			
casos	No refuga	Refuga	Total
Control	27 71.05	11 28.95	38 100.00
Caso	37 80.43	9 19.57	46 100.00
Total	64 76.19	20 23.81	84 100.00
Fisher's exact =			0.441

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. (Tabla N° VIII) . 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, $p=0,0482$.

Tabla N° VIII: Distancias de estercolero y fuentes de agua: diferencias entre grupos

	stad.	Dist est-sala	Dist est-agua limp.	Dist est-agua beb
Control	media	177.4138	319.8889	352.5769
	es	54.95387	98.5894	103.5408
	N	29	27	26
Caso	media	115.7742	122.6774	132.1071
	es	21.67768	25.71692	25.98017
	N	31	31	28

En lo que respecta a la producción lechera, se encontro 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, $p= 0,13$. (Tabla N° XIV)

Tabla N° IX: Diferencia entre casos y controles en litros de leche.

test leche		p= 0,13				
Grupo	Obs	Media	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf.]	
Control	39	16.94872	.5053008	3.155603	15.92579	17.97165
Caso	40	16.00250	.3664887	2.317878	15.26121	16.74379
comb.	79	16.46962	.3134979	2.78643	15.84549	17.09375
dif		.94621	.6242138		-.2988309	2.191267

7. 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 26). 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 serologicamente 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 si, desde seroprevalencias muy bajas (Gasteiner J y col, 1999 en Austria, Bolaert F y col, 2000 en Belgica), 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 esten 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:

-r1_4 = En el área de parto se encierran o tratan animales enfermos (OR= 3,21)

-r1_7 = Se utilizan nodrizas? (OR = 1,93)

-r1_1 = Esta área es utilizada para más de una vaca simultáneamente (OR= 5,41)

-r2_3 = Los terneros pre-destete se encuentran en contacto directo con las vacas? (OR=3,88)

-r3_3 = 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: r1_7, r1_4, r1_1, r2_3 y r3_3. 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 está 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.

3. La variable r1_4 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 plantearnos 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 y col 1996, Obasanjo y col 1997 y Wells y Wagner en el 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.

8. 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 refugo 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)⁸⁶ 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 que de que las medidas específicas varían con cada situación particular, existe una serie de recomendaciones para cortar el ciclo de infección y la enfermedad 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 efectivo 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 y animales afectados. Por este motivo, sumado a las pérdidas directas que ocasiona el *Map*, 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, instituciones y organizaciones del sector para revertir los efectos perjudiciales que ocasiona esta enfermedad.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Amonsin A., Li L.L., Zhang Q., Bannantine J.P., Motiwala A.S., Sreevatsan S., Kapur V. (2004). Multilocus Short Sequence Repeat Sequencing Approach for Differentiating among *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Strains. *J of Clinic Microbiol* 42 (4): 1694–1702.
2. Berghaus R. D., Lombard J., Gardner I.A., Farver T. (2005). Factor analysis of a Johne's disease risk assessment questionnaire with evaluation of factor scores and a subset of original questions as predictors of observed clinical paratuberculosis. *Preventive Veterinary Medicine* 72 291–309.
3. Bhide M., Chakurkar E., Tkacikova L., Barbuddhe S., Novak M., Mikula I. (2006). IS900-PCR-based detection and characterization of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from buffy coat of cattle and sheep. *Vet Microbiol.* 112 33–41.
4. Billman-Jacobe H., Carrigan M., Cockram F., Corner L.A., Gill I.J., Hill J.F., Jessep T., Milner A.R., Wood P.R. (1992). A comparison of the interferon gamma assay with the absorbed ELISA for the diagnosis of Johne's disease in cattle. *Aust Vet J* 69: 25-28..
5. 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.
6. Bottcher J., Gangl A. (2004). *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis*. Combined Serological Testing and Classification of Individual Animals and Herds. *J. Vet. Med. B* 51, 443–448.
7. Braun R.K., Buergelt C.D., Litell R.C. (1990). Use an enzyme like immunosorbent assay to estimate prevalence of paratuberculosis in cattle of Florida. *J Am Vet Med Assoc* 196: 1251-1254.
8. Carpenter T., Gardner I., Collins M.T., Whitlock R. (2004). Effects of prevalence and testing by enzyme-linked immunosorbent assay and fecal culture on the risk of introduction of *Mycobacterium avium ssp. Paratuberculosis*-infected cows into dairy herds. *J Vet. Diagn. Invest.* 16:31-38.
9. 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,
10. 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,
11. Chamberlin W., Graham D., Hulten K, El-Zimaity M., Schwartz M., Naser S., Shafran I., El-Zaatari A. (2001). Review article: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* as one cause of Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*; 15: 337-346.
12. Chi J., VanLeeuwen J., Weersink A., Keefe G. (2002). Management factors related to seroprevalences to bovine viral-diarrhoea virus, bovine-leukosis virus, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, and *Neospora caninum* in dairy herds in the Canadian Maritimes. *Prev. Vet. Med.* 55 57–68
13. Chiodini, R.J.(1989). Crohn's disease and mycobacterioses: a review and comparison of two disease entities. *Clin Microbiol. Rev.* 2: 90-117.
14. 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..

15. Chiadini, 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. *Microb. Pathog.* 14:355–347.
16. Chiadini, R.J., Rossiter C. (1996). Paratuberculosis : A Potential Zoonosis ? In *The Veterinary Clinics of North America*, Sweeney R. (ed). The W.B. Saunders Company, Philadelphia . *Food Animal Practice* ,12 (2):457-468.
17. Chiadini, 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
18. Cocito C., Gilot P., Coene M., De Kesel M, Poupart P., Vannuffel P. (1994). Paratuberculosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 7: 328-345.
19. 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.
20. 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.
21. Collins M.T., Wells S.J., Petrini K.R., Collins J.E., Schultz R., Whitlock R.H. (2005). Evaluation of Five Antibody Detection Tests for Diagnosis of Bovine Paratuberculosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12 (6) 685–692.
22. 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.
23. Collins M.T. (1997). *Mycobacterium paratuberculosis*: A potential Food-Borne Pathogen?. *J. Dairy Sci.* 80: 3445-3448.
24. Collins M.T. (2002). Interpretation of a Commercial Bovine Paratuberculosis Enzyme-Linked Immunosorbent Assay by Using Likelihood Ratios. *Clin. Diagn. Lab Immunol.*, 9 (6) p. 1367–1371.
25. Collins MT, Sockett Dc, Goodger WJ, Conrad TA, Thomás CB, Carr D.J. (1994) Herd prevalence and geohrafic distribution of, and risk factors for, bovine paratuberculosis in Wisconsin. *J Am Vet Med Assoc.* 204 (4) 636-641.
26. 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.
27. 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 Diagnostic Tests for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Patients with Inflammatory Bowel Disease and in Controls . *J. Clin. Microbiol.* 38 (12) p. 4373–4381.
28. Coussens P. (2001). *Mycobacterium paratuberculosis* and the bovine immune system. *Anim. Health Res. Rev.* 2: 141-161.
29. Coussens P. (2004). Model for Immune Response to *Mycobacterium avium* ssp. *Paratuberculosis* in cattle. *Infect. Immun.* 72 (6) : 3089-3096.
30. Crossley B., Zagmutt-Vergara F., Fyock T., Whitlock R., Gardner I. (2005). Fecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by dairy cows . *Vet. Microbiol.* ;107(3-4):257-63.

31. 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.* Apr 1;218(7):1163-1166.
32. Dargatz D.A., Byrum B.A., Collins M.T., Goyal S.M., Hietala S.K., Jacobson R.H., Koprál C.A., Martin B.M., McCluskey B.J., Tewari D. (2004). A multilaboratory evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay test for the detection of antibodies against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cattle. *J Vet Diagn Invest.* 16 (6):509-14.
33. Dargatz D.A., Byrum B.A., Hennager S.G., Barber L.K., Koprál C.A., Wagner B.A., Wells S.J. (2001). Prevalence of antibodies against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* among beef cow-calf herds. *J Am Vet Med Assoc.*; 219(4):497-501.
34. Dohmann K., Strommenger B., Stevenson K., de Juan L., Stratmann J., Kapur V., Bull T., Gerlach G.F (2003). Characterization of Genetic Differences between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Type I and Type II Isolates. *J of Clinic Microbiol* 41, (11): 5215–5223.
35. 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(3):429-35.
36. Eamens GJ, Whittington RJ, Marsh IB, et al. (2000). Comparative sensitivity of various fecal culture methods and ELISA in dairy cattle herds with endemic Johne's disease. *Vet. Microbiol.* 77 357-367.
37. Ellingson J., Cheville J., MD, Brees D., Miller J., Cheville N. (2003). Absence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* Components from Crohn's Disease Intestinal Biopsy Tissues. *Clin. Med. & Res.* 1, (3): 217-226.
38. Emery DL, Whittington RJ. (2004). An evaluation of mycophage therapy, chemotherapy and vaccination for control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. *Vet Microbiol.* Dec 9;104(3-4):143-55.
39. Enoe C., Georgiadis M.P., Johnson W.O. (2000). Estimation of sensitivity and specificity of diagnostic test and disease prevalence when the true disease is unknown. *Prev. Vet. Med.* 45, 61-81.
40. Errico F, Bermudez J. (1983). Aislamiento de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en bovinos en el Uruguay. *Veterinaria* 19 (83): 13-16.
41. 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.
42. Ferreira R., Fonseca L.S, Lilenbaum W. (2002). Agar gel immunodiffusion test (AGID) evaluation for detection of bovine paratuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil *Letters in Applied Microbiology* , 35, (3): 173-175.
43. Garrido J.M., Cortabarraria N., Oguiza J.A., Aduriz G., Juste R.A. (2000) Use of a PCR method on fecal samples for diagnosis of sheep paratuberculosis. *Vet Microbiol.* 77 : 379-386.
44. 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.

45. 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.
46. Giese SB, Ahrens P. (2000) Detection of *Mycobacterium avium* subsp. Paratuberculosis in milk from clinically affected cows by PCR and culture. *Vet Microbiol.* 77 291-297.
47. Gioffre A., Zumarraga M., Meikle V., Morsella C., Bigi F., Alito A., Caimi K., Santangelo P., Paolicchi F., Romano M., Cataldi A. (2006). Lpp24, a novel putative Lipoprotein from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* *J. Vet. Med. B* 53, 34–41
48. 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.
49. Grant I.R., Ball H.J., Rowe M.T. (1999). Effect of higher pasteurization temperatures, and longer holding times at 72°C, on the inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* milk. *Letters in Applied Microbiol.* 28, 461-465.
50. Greenstein R. J. (2003). Is Crohn's disease caused by a mycobacterium? Comparisons with leprosy, tuberculosis, and Johne's disease. *The Lancet, Infectious Diseases* 3 : 507-514.
51. 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 (11) : 779-783.
52. Hardin L., Garrett T. (1996). Comparison of milk with serum ELISA for the detection of paratuberculosis in dairy cows. *J Am Vet Med Assoc.* 209 (1) :120-122.
53. Harris N.B., Barletta R.G. (2001). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. *Clin Microbiol Rev.* 14(3):489-512
54. Hendrick S., Duffield T., Kelton D., Leslie K., Lissemore K., Archambault M. (2005). Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay performed on milk and serum samples for detection of paratuberculosis in lactating dairy cows. *J Am Vet Med Assoc* 226 (3) 424-428.
55. Hendrick S.H., Kelton D.F., Leslie K.E., Lissemore K.D., Archambault M., Duffield T.F. (2005) Effect of paratuberculosis on culling, milk production, and milk quality in dairy herds. *J Am Vet Med Assoc.*;227(8):1302-8.
56. 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.
57. Hirst H.L., Garry F.B., Salman M.D. (2002). Assessment of test results when using a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of paratuberculosis in repeated samples collected from adult dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc.* 220 (11) : 1685-1689.
58. Hosmer D.W., Lemeshow S. (2000). Applied logistic regression. 2nd edition. Ed. Wiley-Interscience Publication. 373 páginas. ISBN 0-471-35632-8.

59. Huda A., 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.* Nov;129(4):259-67.
60. 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 (1-2):43-53.
61. Huda A., Lind P., Christoffersen A.B., Jungersen G.(2003) Analysis of repeated tests for interferon-gamma (IFN-gamma) response and faecal excretion for diagnosis of subclinical paratuberculosis in Danish cattle. *Vet Immunol Immunopathol.*;94(3-4):95-103.
62. Iade B., Bianchi C., Espíndola F. (2005). Características clínicas de presentación y evolutivas de una cohorte de 48 pacientes con enfermedad de Crohn en Uruguay. *Rev Med Uruguay*; 21: 303-307.
63. 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.
64. 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
65. 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,
66. Johnson-Ifearulundu YJ; Kaneene JB. (1999). Distribution and environmental risk factors for paratuberculosis in dairy cattle herds in Michigan. *AVJR* 60 (5) 589-596..
67. 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.
68. Jungersen G. Huda A., Hansen J. J., Lind P. (2002). Interpretation of the Gamma Interferon Test for Diagnosis of Subclinical Paratuberculosis in Cattle .*Clin Diagn Lab Immunol.* 9: 453–460
69. Kalis C.H., Barkema H.W., Hesselink J.W, van Maanen C., 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(3):219-224.
70. Kalis C.H.J., Collins M.T., Barkemad H.W., Hesselink J.W. (2004). Certification of herds as free of *Mycobacterium paratuberculosis* infection: actual pooled faecal results versus certification model predictions. *Prev. Vet. Med* 65: 189-204.
71. Kalis C.H.J., Collins M.T., Hesselink J.W., Barkemad H.W. (2003) Specificity of two tests for the early diagnosis of bovine paratuberculosis based on cell-mediated immunity: the Johnin skin test and the gamma interferon assay.*Vet. Microbiol* 97:73–86
72. Kanazawa K.,Haga Y.,Funakoshi O.,Nakajima H., Munakata A. (1999). Absence of *Mycobacterium paratuberculosis* DNA in intestinal tissues from Crohn´s disease by nested polymerase chain reaction. *J Gastroenterol* 34:200-206.
73. Klausen J., Hudab A., Ekeroth., Ahrens P. (2003) Evaluation of serum and milk ELISAs for paratuberculosis in Danish dairy cattle . *Prev Vet Med* 58 171–178.

74. 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
75. Manual of standards for diagnostic test and vaccines, 4^a ed.. 2000. Officine International des Epizooties. OMS . 96.
76. McDonald W.L., Ridge S.E., Hope A.F., Condrón R.J. (1999). Evaluation of diagnostic test for Johne's disease in young cattle. Aust. Vet. Journal. 77 2, 113-119.
77. McKenna S.L.B., Barkema H.W., Keefe G.P., Sockett D.C. (2006). Agreement between three ELISAs for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy cattle. Vet Microbiol, en prensa.
78. McKenna S.L.B., Keefe G.P., Barkema H.W., Sockett D.C. (2005). Evaluation of three ELISAs for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using tissue and fecal culture as comparison standards. Vet Microbiol 110 ,105–111.
79. Moreira A.R., Paolicchi F., Morsella C., Zumarraga M., Cataldi A., Bigi F., Alito A., Overdium P., van Soelingen D., Romano M.I. (1999). Distribution of IS900 restriction fragment length polymorphism types among animal *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from Argentine and Europe. Vet Microbiol 70, 251-259.
80. 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.
81. Motiwala A.S., Strother M., Amonsin A., Byrum B., Naser S., Stabel J.R., Shulaw W., Bannantine J.P., Kapur V., Sreevatsan S. (2003). Molecular Epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: Evidence for Limited Strain Diversity, Strain Sharing, and Identification of Unique Targets for Diagnosis. J of Clinic Microbiol 41 (5): 2015-2026.
82. 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.
83. 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
84. 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.
85. 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.
86. 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
87. NAHMS 2002. 2005. Johne's Disease on U.S. Dairy Operations USDA:APHIS:VS: CEAH, National Animal Health Monitoring System, Fort Collins, CO
88. Naser S.A., Ghobrial G., Romero C., Valentine J.F. (2004) Culture of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from the blood of patients with Crohn's disease. The Lancet ; 364: 1039-1044.
89. Naugle A.L., Saville W.J., Shulaw W.P., Wittum T.E., Love B.E., Dodaro S.J., McPhail I.L. (2004). Comparison of management practices between Ohio, USA

- dairy farms participating in whole-herd Johne's disease testing programs and those not participating. *Prev Vet Med* 65 77–92.
90. Nielsen S.S., Grohn Y.T., Enevoldsen C. (2002). Variation of the milk antibody response to Paratuberculosis in natural infected dairy cows. *J Dairy Sci.* 85:2795-2802.
 91. 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..
 92. 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.
 93. Obasanjo I.O., Griihn 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.
 94. O'Shea B., Khare S., Bliss K., Klein P., Ficht T. A, Adams L.G., Rice-Ficht A.C. (2004). Amplified Fragment Length Polymorphism Reveals Genomic Variability among *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Isolates. *J of Clinic Microbiol* 42 (8): 3600–3606.
 95. 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.
 96. Paolicchi F., Morsella C., Vernal 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.
 97. Paolicchi F., Zumarraga M., Gioffre A., Zamorano P., Morsella C., Vernal 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. B* 50, 20–26
 98. 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 B* 48: 313-320.
 99. Pavlik I., Svastova, P., Bartl J., Dvorska L., Rychlik, I. (2000). Relationship between IS901 in the *Mycobacterium avium* complex strains isolated from birds, animals, humans, and the environment and virulence for poultry. *Clin Diagn Lab Immunol* 7, 212–217.
 100. 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.
 101. 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.

102. Raizman E.A., Wells S.J., Jordan P.A., DelGiudice G.D., Bey R.R (2005) *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from free-ranging deer and rabbits surrounding Minnesota dairy herds. *Can J Vet Res.*;69(1):32-8.
103. Romano M.I., Amadio A., Bigi F., Klepp L., Etchehoury I., Noto Llana M., Morsella C., Paolicchi F., Pavlik I., Bartos M., Leão S. C., Cataldi A. (2005). Further analysis of VNTR and MIRU in the genome of *Mycobacterium avium* complex, and application to molecular epidemiology of isolates from South America. *Vet Microbiol.* 110: 221-237.
104. Roussel A.J., Libal M.C., Whitlock R.L., Hairgrove T.B., Barling K.S., Thompson J.A. (2005). Prevalence of and risk factors for paratuberculosis in purebred beef cattle. *J Am Vet Med Assoc.*;226(5):773-8.
105. Sanderson, J D ; Moss M.T. (1992) de *Mycobacterium Paratuberculosis* DNA in Crohn`s disease tissues. *Gut* 33: 890-896.
106. Schwartz B.D., De Voss J.J. (2001). Structure and absolute configuration of mycobactin J. *Tetrahedron Letters* 42 3653–3655.
107. Sechi L.A., Scanu A.M., Mollicotti P., Cannas S., Mura M., Dettori G., Fadda G., Zanetti S. (2005). Detection and Isolation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from intestinal mucosal biopsies of patients with and without Crohn's disease in Sardinia. *Am J Gastroenterol.*;100(7):1529-36.
108. Sergeant E.S., Marshall D.J., Eamens G.J., Kearns C., 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.* Dec 12;61(4):235-48.
109. Sergeant E.S., Whittington R.J., More S.J. (2002). Sensitivity and specificity of pooled faecal culture and serology as flock-screening tests for detection of ovine *paratuberculosis* in Australia. *Prev Vet Med.*;52(3-4):199-211.
110. 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.
111. 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.
112. Sorensen O., Rawluk S., Wu J., Manninen K., Ollis G. (2003) *Mycobacterium paratuberculosis* in dairy herds in Alberta. *Can Vet J.* 44(3):221-226.
113. Stabel, J R. (1996). An improved method for cultivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from bovine fecal samples and comparison to three other methods. *J. Vet. Diagn. Invest.* 9: 375-380,
114. Stabel, J. R. (2000). Johne`s Disease and milk: Do consumers need to worry? *J Dairy Sci.* 83:1659-1663.
115. Stabel, J. R: Production of γ interferon by peripheral blood mononuclear cells: an important diagnostic tool for detection of subclinical *paratuberculosis* . *J. Vet. Diagn. Invest.* 8, 345-350.
116. Stabel, J.R. (1998). Symposium: Biosecurity and disease. Johne`s Disease: A Hidden Threat. In *J., Dairy Sci.* 81: 283-288,
117. Stabel, J.R. (2000). Transitions in immune response to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Microbiol* 77: 465-473.

118. Stabel J.R., Goff J.P.(2004). Efficacy of immunologic assays for the detection of Johne's disease in dairy cows fed additional energy during the periparturient period. *Vet Diagn Invest.* 16(5):412-20.
119. Stabel, J. R; Whitlock R H. (2001). An evaluation of a modified interferon γ assay for detection of paratuberculosis in dairy herds. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 79, 69-81.
120. Stich R.W.,Byrum B.,Love B.,Theus N., Barber L., Shulaw W. (2004). Evaluation of an automated system for non-radiometric detection of *Mycobacterium avium* paratuberculosis in bovine feces *Journal of Microbiological Methods* 56 267– 275.
121. 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 Microbiology Letters*, 196 (1), 31-37.
122. Sweeney R. (1996). Transmission of Paratuberculosis. In *The Veterinary Clinics of North America*, Sweeney R (ed).The W.B. Saunders Company, Philadelphia .*Food Animal Practice* ,12 (2) :305-312.
123. Thoen C.O; Haagsma J. (1996). Molecular technique in the diagnosis and control of paratuberculosis in cattle. *J Am Vet Med Assoc* 209(4): 734-737,
124. Thompson D.E. (1994). The rol of mycobacteria in Crohns disease. *J. Med. Microbiol.* 41: 74-94.
125. Thorne J.G., Hardin L.E. (1997) . Estimated prevalence of paratuberculosis in Missouri, USA cattle *Prev Vet Med* 31 5 1-57.
126. 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.
127. 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
128. Wells S.J.,Godden S.M., Whitlock R.H.,Collins J.E.(2002)Interpretation of the serum ELISA for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* fecal shedding in dairy cattle herds. In; Juste R., Geijo M., Garrido J. (ed.) *Proceedings of the 7º International Colloquium of Paratuberculosis*. International Association for Paratuberculosis, Bilbao, España.
129. 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.
130. 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.
131. Whittington R.,Marsh I.,Choy E., Cousins D. (1998) Polymorphisms in IS 1311, an insertion sequence common to *Mycobacterium avium* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, can be used to distinguish between and within these species. *Mol Cell Prob* 12, 349–358

132. Whitlock R.H., Wells S.J., Sweeney R.W., Van Tiern J. (2000). ELISA and fecal culture for paratuberculosis :sensitivty and specifity of each method. *Vet Microbio* 77 387-398.
133. Whitlock R.H., Buergelt C. (1996). Preclinical and clinical manifestation of paratuberculosis. In *The Veterinary Clinics of North America*, Sweeney R (ed).The W.B. Saunders Company, Philadelphia .*Food Animal Practice* ,12 (2): 345-356.
134. Yokomizo Y., Merkal R.S., Lyle P. (1983). Enzime-linked inmunosorbent assay for detection of bovine inmunoglobulin G1 antibody to a protoplasmic antigen of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* . *Am.J Vet. Res*; 44: 2205-2207.

ANEXO 1
Formulario para Análisis de Factores asociados

PARATUBERCULOSIS FORMULARIO y EVALUACION DE RIESGO
1) Informacion General del Establecimiento

Fecha			
-------	--	--	--

Departamento		Paraje	
Nombre Establecimiento			
Propietario			
DICOSE			
Nombre Entrevistado			
Relacion con establecimiento			
Telefono		Años del Tambo	
Veterinario del Establecimiento			

2) Informacion General del RODEO

Nº total de Bovinos			
Vacas			
Vaquillonas			
Terneros			
Toros			
Vacas en ordeño			

Otros Animales		
Ovinos		
Caprinos		
Equinos		
Caninos		
Aves		

Fuente de remplazos	Propia	
	Comprados	

Campo de recria	Si	
	No	

3) Informacion de Producción

Producción de Leche			
Total Litros de leche por dia			
Células somáticas			
Recuento bacteriano			

Destino de la producción	
Planta Procesadora	
En el Establecimiento	

4) Informacion Sanitaria e Higiene

Diarreas Crónicas	Si	
	No	

	SI	No
Diagnóstico Clínico de PT		
Diagnóstico Laboratorio de PT		
Otras Enfermedades, Cuál		

Distancias en mts.	Estercolero a sala de ordeño	
	Estercoleros a fuente de agua del tambo	
	Estercolero a fuente agua de bebida	

**Formulario para evaluación de prácticas de manejo
Paratuberculosis en Bovinos
(Marcar la opción que corresponde)**

I: Área de Parto

1. Esta área es utilizada para más de una vaca simultáneamente?

Si	
NO	

2. Existe estiércol en área de parto?

Si	
No	

3. Los terneros nacen en otras áreas que no sean parideras?

Si	
No	

4. En el área de parto se encierran o tratan animales enfermos?

Si	
No	

5. En el área de parto se encierran o tratan animales con Paratuberculosis clínica o sospechosos ?

Si	
No	

6. Los terneros permanecen más de tres horas con su madre.

Si	
No	

7. Se utilizan nodrizas?

Si	
No	

8. Existe contaminación con estiércol en las ubres?

Si	
NO	

9. El área observada es diariamente entre las 6 am y las 6 pm

Si	
No	

10. Tiene empleados que tengan en contacto directo con terneros pre-destete y vacas adultas?

Si	
No	

Terneros Pre-Destete

1. Utiliza pool de calostro?

Si	
No	

2. Utiliza pool de leche ?

Si	
No	

3. Los terneros pre-destete se encuentran en contacto directo con las vacas?

Si	
No	

4. Existe contaminación con estiércol en leche, comida , agua de bebida o en el área de cría de terneros pre destete.

Si	
No	

III: Post – Destete

1. Los terneros post-destete se encuentran alojados cerca de los animales adultos?

Si	
No	

2. Existe contaminación con estiércol en comida, agua de bebida o en el área de cría de terneros post-destete?

Si	
No	

3. Los terneros posdestete comparten la alimentación, el agua de bebida o el alojamiento con los animales adultos?

Si	
No	

4. Los terneros posdestete comparten el pastoreo con animales adultos?

Si	
No	

IV: Cría de Vaquillonas

1. Se alojan las vaquillonas cerca de los animales adultos?

Si	
No	

2. Las vaquillonas comparten el pastoreo con animales adultos?

Si	
No	

V. Vacas Adultas

1. Existe contaminación con estiércol en comederos o bebederos?

Si	
No	

2. Existe contaminación con estiércol de animales adultos en galpones donde guarda los alimentos o el equipamiento para distribuir comida?

Si	
No	

3. Las vacas adultas tiene acceso al estercolero?

Si	
No	