

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**“Seroprevalencia de *Mycobacterium avium* subep
paratuberculosis en bovinos Holstein de la Comarca
Lagunera”**

POR:

HECTOR MANUEL BOBADILLA DELGADILLO

T E S I S

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO

JUNIO DE 2008

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**“Seroprevalencia de *Mycobacterium avium* subep
paratuberculosis en bovinos Holstein de la Comarca
Lagunera”**

POR:

HECTOR MANUEL BOBADILLA DELGADILLO

T E S I S

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO

JUNIO DE 2008

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

T E S I S

**“Seroprevalencia de *Mycobacterium avium* subep
paratuberculosis en bovinos Holstein de la Comarca
Lagunera”**

APROBADA POR EL COMITÉ PARTICULAR DE ASESORÍA

PRESIDENTE DEL JURADO

M.C.V. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

M.C. JOSÉ LUIS FRANCISCO SANDOVAL ELIAS

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

T E S I S

**“Seroprevalencia de *Mycobacterium avium* subep
paratuberculosis en bovinos Holstein de la Comarca
Lagunera”**

ASESORES

M.C.V. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ

M.V.Z J. GUADALUPE RODRÍGUEZ MARTÍNEZ

**“Seroprevalencia de *Mycobacterium avium* subep
paratuberculosis en bovinos Holstein de la Comarca
Lagunera”**

**TESIS ELABORADA BAJO LA SUPERVISIÓN DEL COMITÉ PARTICULAR
DE ASESORÍA Y APROBADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL TÍTULO DE:**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESIDENTE

M.V.C. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ

VOCAL

M.V.Z. J. GUADALUPE RODRÍGUEZ MARTÍNEZ

VOCAL

M.C. MA. GUADALUPE DE LA FUENTE SALCIDO

VOCAL SUPLENTE

M.V.Z. LUIS JAVIER PRADO ORTÍZ

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO

JUNIO 2008

INDICE

	Página
DEDICATORIAS	i
AGRADECIMIENTOS	v
RESUMEN	vi
I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	2
2.1 Etiología y Patogenia	2
2.2 Epidemiología	3
2.3 Transmisión y Fuentes	5
2.4 Signos	6
2.5 Lesiones	7
2.6 Diagnostico	8
2.7 Tratamiento y Prevención	9
III. JUSTIFICACIÓN	11
IV. OBJETIVOS	12
V. MATERIAL Y METODOS	13
VI. RESULTADOS	15
VII. DISCUSIÓN	16
VIII. CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS	18
IX. LITERATURA CITADA	19

DEDICATORIAS

A MI PAPA

DEMETRIO BOBADILLA SANCHEZ

A ti papa te agradezco por ser mi padre, por ser un hombre tan inteligente y comprensivo que siempre buscaste la forma de educarme, para ser quien soy, por los consejos que me diste, a ti que con tu experiencia y conocimientos te convertiste en mi ídolo, mi amigo incondicional y que a pesar de todo lo que nos a hecho caer, tu siempre sabes como levantarte con mas fuerza, gracias por soportar todos mis errores como hijo y por estar a mi lado cuando mas lo he necesitado.

*Le doy gracias a Dios por darme el papa que tengo "TE QUIERO
MUCHO PAPI"*

A MI HIJO

HECTOR MANUEL BOBADILLA TOSCANO

Para ti hijo, por ser una luz en mi vida, por darle alegría de ser padre, a ti que cuando siento que toda esta en mi contra, solo con ver tus ojitos y escuchar de tu boca la palabra mágica “PAPI” me das la fuerza para luchar contra todo, por ti es por quien debo de prepararme mas como profesionista y como persona “Te amo chaparro.”

A MI ESPOSA

CELIA SOCORRO TOSCANO CAMPOS

Para la mujer de mi vida, con todo mi amor, gracias por todo tu cariño, amor, ternura, comprensión y paciencia que tuviste conmigo, a ti que me diste la mano cuando me estaba hundiendo en la vida y me enseñaste querer, amar y por que llegaste a mi vida cuando mas te necesitaba, por darme el regalo mas hermoso que puede tener un hombre, que es la dicha de ser padre, gracias por todo, te amo y eres y serás el amor de mi vida.

A MIS ABUELITOS

RAYMUNDO BOBADILLA Y FRANCISCA YANEZ

Gracias por darme su cariño y amor de padres, por todo el apoyo incondicional que me dieron, por los valores que me forjaron como persona y como hombre, los consejos que por su experiencia siempre me fueron de gran importancia en mi vida y le doy gracias a Dios por darme unos abuelitos tan maravillosos como ustedes, los quiero mucho y a mi abuelita por ser mi madre.

A MI HERMANO

FREDY BOBADILLA DELGADILLO †

Para ti con todo mi corazón, por que fuiste un ejemplo a seguir, siempre positivo, alegre, comprensivo y por todo el apoyo que me otorgaste y por tantas aventuras que pasamos juntos, los consejos que me dabas y que tanta falta me hacen y por que siempre estarás a mi lado a pesar de que no te vea, yo se que no lo pudiste leer estarás contento por que termine mis estudios, me haces falta.

A MI HERMANA

ANAID BOBADILLA DELGADILLO.

Para ti hermana te doy las gracias por todo lo que me apoyaste en el transcurso de mis estudios, por todo el sacrificio que tuviste que pasar y por estar a lado de mi papa y cuidarlo, espero y no cambies nunca por que tenemos que estar juntos y apoyarnos para siempre.

A MIS SUEGROS

MIGUEL ANGEL TOSCANO Y EMELIA CAMPOS

Gracias por el apoyo que me otorgaron, la confianza y el cariño, por abrirme las puertas de su familia y por considerarme un miembro más de la familia.

A MIS CUÑADOS

MIGUEL Y ALEJANDRA TOSCANO

Les agradezco su amistad, apoyo, cariño que me dieron y que se en convertido como mis otros hermanos “gracias”

AGRADECIMIENTOS

ALA UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

Le doy las gracias por formarme como profesionista, darme las herramientas para enfrentarme a la vida como profesionista y como persona.

M.C.V. RAMON ALFREDO DELGADO GONZALEZ

Con todo respeto le doy las gracias por todas las enseñanzas que me brindo, por el tiempo que me dedico, gracias al cual se pudo realizar este trabajo, y sobre todo por su amistad tan valiosa.

M.V.Z. J. GUADALUPE RODRÍGUEZ MARTÍNEZ

Gracias por el apoyo y tiempo que dedico para la elaboración de este trabajo, por los conocimientos que como maestro me dio y por su amistad incondicional.

RESUMEN

La paratuberculosis es una enfermedad infecciosa entérica granulomatosa crónica de los bovinos y otros rumiantes causada por la bacteria *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map). La enfermedad tiene una distribución mundial y es diagnosticada frecuentemente en hatos lecheros, sin embargo en la Comarca Lagunera no hay estudios que indiquen la prevalencia de la enfermedad por lo cual el objetivo del estudio aquí reportado fue determinar la frecuencia de seropositividad de paratuberculosis en bovinos Holstein de la Comarca Lagunera, utilizando la técnica de ELISA. Para fines de la investigación se tomaron muestras de suero de vacas de 3 a 5 años de edad, 92 llegaron a enfermería con signos clínicos de diarrea de 7 establos lecheros, y 368 sueros fueron de vacas sanas de 20 establos. Se utilizó un paquete de diagnóstico de ELISA, disponible comercialmente, para detectar anticuerpos contra *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*. De los 92 sueros de vacas enfermas, 26 (28.3%) fueron positivas a la presencia de anticuerpos contra Map. Los siete hatos resultaron positivos a *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*, o sea, 100% de los hatos con animales con síntomas de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*, fueron detectados positivos en la prueba de ELISA. De los 368 sueros de vacas sanas 7 (1.9%) fueron positivos. Sin embargo, 6 hatos entre los veinte que no presentaban síntomas de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*, o sea 30% de los hatos sin síntomas presentaron por lo menos 1 animal positivo para *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*. Este estudio demuestra que hay una prevalencia significativa de Map en la Comarca Lagunera.

I. INTRODUCCION

La paratuberculosis o enfermedad de Johne es una enfermedad causada por *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* (*Map*), que causa grandes pérdidas económicas y es una de las enfermedades más importantes en el ganado de leche en todo el mundo (Coussens *et al.*, 2002; Jungersen *et al.*, 2002; Nielsen *et al.*, 2002; Austerman *et al.*, 2006; Collins *et al.*, 2005). Esta enfermedad causa infección crónica granulomatosa de los intestinos caracterizada por diarrea persistente y emaciación en rumiantes. (Olsen *et al.*, 2000; Whittington *et al.*, 2000; Collins *et al.*, 2000; Stratmann *et al.*, 2002).

Prácticamente todos los animales son susceptibles a la infección con este organismo, bovinos, ovejas, cabras, venados, alces, llamas, rinocerontes, conejos, bisontes, incluyendo a los primates, en humanos ha sido implicado con la enfermedad de Crohn (enteritis inflamatoria en humanos) (Wu *et al.*, 2007; Olsen *et al.*, 2000; Bull *et al.*, 2000; Whittington *et al.*, 2000; Ignasi *et al.*, 2002).

La paratuberculosis bovina es una de las mayores preocupaciones en muchos países del mundo, debido a que es responsable de grandes pérdidas económicas relacionadas con disminución de peso, producción de leche, e incremento en el índice de mastitis y desordenes reproductivos, incluyendo el aumento de costos en pruebas de diagnóstico y medidas de control (Coetsier *et al.*, 2000, Coussens *et al.*, 2002; Stabel *et al.*, 2002).

En la Comarca Lagunera la paratuberculosis ha sido reportada en los laboratorios de diagnóstico veterinario regionales, sin embargo no hay estudios de la prevalencia de la enfermedad que nos indiquen el grado de infección en los hatos lecheros, por lo tanto la finalidad del presente trabajo es investigar la prevalencia utilizando suero bovino de animales enfermos y sanos.

II. ANTECEDENTES

La paratuberculosis fue descrita en 1985 por Johne y Frothingham quienes identificaron al microorganismo con lesiones granulomatosas en los intestinos del ganado, teñidos con la tinción de alcohol ácido resistente, indicando algunos tipos de organismos mycobacteriales (Buergelt *et al.*, 2000; Stabel *et al.*, 1998). El organismo fue clasificado como un *Mycobacterium* por Twort e Ingram. Años más tarde fue caracterizado y nombrado como *Mycobacterium paratuberculosis* (Stabel *et al.*, 1998).

El agente causante de la enfermedad de Johne es una bacteria intracelular facultativa. Esta enfermedad es encontrada en todo el mundo, las pérdidas económicas promedio debido a esta enfermedad han sido calculadas en 227.00 dólares por cada vaca del hato infectado por año. Estas pérdidas económicas llegan a ser más dramáticas cuando se acoplan con un diagnóstico positivo estimando del 20% (Aho *et al.*, 2003).

Aunque *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* es el agente causal de la enfermedad de Johne del ganado y otros rumiantes también muestra algunas similitudes con la enfermedad de Crohn (severa inflamación crónica en el tracto gastrointestinal en humanos) (Rademaker *et al.*, 2007). Sin embargo esta bacteria intracelular facultativa también infecta a los animales salvajes (Bannantine *et al.*, 2003).

2.1 Etiología y Patogenia

El agente etiológico de la enfermedad de Johne es *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*), es una bacilo gram positivo ácido alcohol resistente (Thornton *et al.*, 2002, Paustian *et al.*, 2004; Speer *et al.*, 2006). Esta bacteria intracelular facultativa de crecimiento lento persiste dentro de los macrófagos en el tracto intestinal por varios años antes del inicio de la enfermedad clínica. La enfermedad clínica esta asociada con enteritis

granulomatosa limitada comúnmente en el ileon (Weiss *et al.*, 2006; Aho *et al.*, 2003).

Una vez ingerido el *Map* sobrevive y se replica dentro de los macrófagos de la pared del intestino y en los nódulos linfáticos regionales (Stabel *et al.*, 1998). El organismo es introducido por las células M de las placas de Peyer del ileon y subsecuentemente fagocitado por los *macrófagos* (Weiss *et al.*, 2006; Coussens *et al.*, 2004; Weiss *et al.*, 2002; Aho *et al.*, 2003). Después de un periodo de incubación de varios años, por lo general de 2 a 4 años, durante el cual la excreción de *Map* es intermitente, ocurre una inflamación granulomatosa difusa en el ileon, lo que conduce a una mala absorción. Y a la diarrea de los animales (Stabel *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2007).

El ganado elimina mínimas cantidades de *Map* en sus heces durante la fase subclínica de la infección y probablemente con el tiempo esta excreción puede conducir a una contaminación significativa en el ambiente y una extensión insidioso de infección a través de los hatos (Stabel *et al.*, 1998).

2.2 Epidemiología

La paratuberculosis está distribuida en todo el mundo afectando a los bovinos, ovejas, cabras, venados, alces llamas, rinocerontes, conejos, bisontes, incluyendo a los primates, en humanos ha sido implicada con la enfermedad de Crohn (enteritis inflamatoria en humanos) (Stabel *et al.*, 1998; Whittington *et al.*, 2000). Sin embargo, el *Map* también puede infectar a las especies monogástricas, aunque sigue siendo polémico, debido a esto se ha implicado como el agente causal de la enfermedad de Crohn en humanos (Coussens *et al.*, 2004).

La paratuberculosis representa significativas pérdidas económicas en la industria lechera debido a que la incidencia de esta enfermedad ha sido reportada en un 20 y hasta un 40% en los ganados lecheros de los Estados Unidos, con una pérdida aproximada de 1.5 billones de dólares por año (Stabel

et al., 2000; Pillai y Jayarao *et al.*, 2002). Estas pérdidas son debido a la disminución de la producción de leche, al sacar el ganado prematuro infectado, un incremento en la incidencia de mastitis y desordenes reproductivos (Stabel *et al.*, 2002). Sin embargo, las grandes pérdidas económicas no solo son por la baja producción de leche sino aun mas por las pérdidas de ingresos a futuro debido al temprana eliminación y posterior la muerte (Kalis *et al.*, 2000; Elzo *et al.*, 2006).

En todo el mundo la prevalencia de la infección con *Map.* puede extenderse de 3 a 4 % en hato. Sin embargo, en Inglaterra puede llegar hasta un 50% en hatos (Wu *et al.*, 2007).

Aunque *Map.* no se considera un agente zoonotico ha sido identificado en biopsia de tejido intestinal en pacientes con enfermedad de Crohn (Stabel *et al.*, 1998).

En su mayor parte los animales contraen la infección en las primeras semanas de vida a través de calostro o leche contaminada. Después de una incubación la diarrea típica no puede desarrollarse hasta una edad de 3 a 5 años. Durante el largo periodo de incubación el *Map.* es excretado intermitentemente en niveles muy bajos; al contrario los animales infectados clínicamente se caracterizan por una diarrea incurable arrojando no menos de 5^{10} bacterias de *Map.* por día manteniendo un apetito regular y una temperatura corporal normal. Debido a esto al principio el resultado clínico no es alarmante, la leche producida no es comúnmente aislada de esto animales inmediatamente, los animales clínicamente infectados introduce dentro del ambiente al microorganismo por vía rectal y dentro de la cadena de alimentos por la vía lactea (Stratmann *et al.*, 2002; Bannantine *et al.*, 2003). Las vacas infectadas pueden excretar la *Mycobacteria* en la leche no solo en la etapa clínica sino también como vacas aparentemente sanas (Nielsen *et al.*, 2002b).

2.3 Transmisión y Fuentes

La enfermedad de Johne es transmitida más comúnmente por ruta oral-fecal, por pasto, pezones, agua y el suelo contaminados con este microorganismo, aunque la ruta primaria de la infección es a través de la ingestión de materia fecal en leche o calostro contaminado con el microorganismo de *Map.* (Whittington *et al.*, 2000, Kovich *et al.*, 2006; Stabel *et al.*, 1998; Weiss *et al.*, 2004). *Map.* también se ha aislado de órganos reproductivos infectados de machos y hembras, se han aislado fetos de vacas infectadas, aunque la transmisión intrauterina del *Map.* no ha sido probada (Stabel *et al.*, 1998; Nielsen *et al.*, 2002b).

Los terneros son los más susceptibles a la infección con el *Map.* un poco después del nacimiento, es probable que los terneros lleguen a infectarse en el útero o por ingestión de la leche contaminada con materia fecal no desarrollando signos clínicos de la enfermedad hasta antes de la edad adulta (Berghaus *et al.*, 2006; Stabel *et al.*, 2002; Hill *et al.*, 2003; Weiss *et al.*, 2002; Coussens *et al.*, 2003).

El tiempo prolongado de incubación y la presencia de casos subclínicos permiten a los animales infectados arrojar grandes cantidades de bacilos en sus heces antes de su detección (Bannantine *et al.*, 2002). Clínicamente las vacas afectadas pueden arrojar 10^6 a 10^8 micobacterias en las heces, contaminando así el ambiente y extendiendo la infección a los terneros recién nacidos, la dosis infecciosa estimada es de 10^3 CFU/ animal (Wu *et al.*, 2007).

Aunque el vínculo entre *Map.* y la enfermedad de Crohn en humanos permanezca confusa, la enfermedad de Johne puede ser un potencial zoonótico de preocupación en la salud pública (Kovich *et al.*, 2006). El modo de transmisión es confusa; sin embargo, algunas evidencias sugieren que los humanos pueden llegar a infectarse por la vía de contaminación de leche (Stabel *et al.*, 2000).

2.4 Signos

Aunque el ganado usualmente llega a ser infectado desde ternero durante los primeros 6 meses de vida por ingestión de heces y leche contaminados con *Map* o por transmisión intrauterina por las madres infectadas, los signos clínicos de la enfermedad pueden no manifestarse hasta que los animales alcancen una edad de 3 a 5 años (Stabel *et al.*, 2000; Stabel *et al.*, 1998; Manning *et al.*, 2003).

La enfermedad clínica en el ganado adulto es caracterizada por diarrea profusa no tratable, pérdida de la condición corporal, edema, decremento en la producción de leche, inapetencia, infertilidad, y finalmente la muerte (Stabel *et al.*, 2007, Kalis *et al.*, 2000, Stabel *et al.*, 1998, Bernstein *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2007), durante el curso de esta enfermedad, el intestino se engrosa impidiendo la absorción de sustancias nutritivas (Stabel *et al.*, 1999). Los signos clínicos generalmente son precedidos por un periodo largo de infección subclínica en la cual el animal infectado es asintomático. (Stabel *et al.*, 2007; Elzo *et al.*, 2006).

Los síntomas son causados por la reducción de absorción de nutrientes es debido al transmural de la enteritis granulomatosa (Kalis *et al.*, 2000).

Por convección el ganado infectado con *Map.* es clasificado dentro de 1 a 4 etapas de infección y enfermedad. La Etapa 1 es periodo de la fase silenciosa de la infección que usualmente ocurre en terneros o animales jóvenes arriba de 2 años de edad, estos animales no manifiestan signos clínicos reconocibles y la infección no puede ser detectada actualmente por ninguna de las pruebas de laboratorio disponible, incluso si se aplican repetidamente. Estos animales son portadores y excretan bacterias intermitentemente, aunque debajo del umbral actual de detección. La etapa II incluye a los animales adultos portadores con la presencia de la enfermedad subclínica. Estos animales no tienen diarrea u otros signos visibles de la enfermedad, todavía ellos pueden tener disminuciones en el desempeño reproductivo. En la etapa II los animales arrojan intermitentemente una cantidad baja de organismos en su estiércol solo

el 15-25% de estos animales pueden ser detectados por una prueba de cultivo fecal. La etapa III y IV incluye a los animales con enfermedad clínica y enfermedad clínica avanzada respectivamente. Los animales en la etapa III y IV arrojan grandes números de organismo en sus heces, calostro, leche y pueden ser diagnosticados con facilidad con métodos de actuales de identificación (Barrington *et al.*, 2003).

No todo el ganado infectado demuestra la enfermedad clínica, el estrés como el parto, la lactación, deficiencias en las dietas, parásitos e infecciones concomitantes con otros patógenos pueden causar la progresión de la enfermedad subclínica a la clínica en los animales infectados (Stabel *et al.*, 2003, Stabel *et al.*, 1999). La inmunidad innata responde con neutrófilos y macrófagos en función son reducidos después del parto. Además la función de las células T y B son también suprimidas considerablemente (Stabel *et al.*, 2003).

2.5 Lesiones

Las lesiones en el intestino se desarrollan durante el periodo subclínico de la enfermedad y frecuentemente son de naturaleza granulomatosa difusa en gran parte restringida al intestino, particularmente a la región de la válvula ileocecal del intestino delgado (Coussens *et al.*, 2004; Coussens *et al.*, 2003). Durante el curso de la enfermedad el intestino se hace grueso y estriado (acanalado), rechazando la absorción propia de los nutrientes, esto es debido al gran número de macrófagos infiltrados (Stabel *et al.*, 2000; Aho *et al.*, 2003).

Las lesiones en la enfermedad experimental se desarrollan en la barrera del intestino en 1-3 meses después de la infección y se caracterizan por agregados de macrófagos, células epitelioides y células gigantes. Pocos linfocitos están presentes dentro de la infección, y no ocurre la formación de tubérculos y necrosis, que es característica de otras infecciones mycobacteriales (Weiss *et al.*, 2006; Weiss *et al.*, 2004; Weiss *et al.*, 2002).

2.6 Diagnóstico

La detección de *Map.* especialmente durante la fase subclínica, la cual es muy prolongada en la enfermedad, sigue siendo difícil debido a la intermitente excreción de *Map* y a la carencia métodos efectivos de diagnósticos (Paustian *et al.*, 2004, Stabel *et al.*, 1998).

En la paratuberculosis subclínica el agente es difícil de identificar. El cultivo bacteriológico es el método definitivo del diagnóstico, pero el tiempo necesario para el cultivo requiere de 5 a 6 semanas de incubación y de trabajo intensivo. La contaminación con hongos y otros microorganismos bacteriales es otro problema para el diagnóstico. Solo aproximadamente el 38% al 50% de *M. paratuberculosis* es detectado por cultivo fecal (Speer *et al.*, 2006; Stabel *et al.*, 1998; Berghaus *et al.*, 2006; Salgado *et al.*, 2007; Pillai y Jayarao *et al.*, 2002).

Las pruebas para el diagnóstico de paratuberculosis como la de inmunodifusión en agar gel (AGID), ELISA, y la Fijación de Complemento (FC), son relativamente fáciles de interpretar pero son menos sensibles que el cultivo fecal (Stabel *et al.*, 1998; Pillai y Jayarao *et al.*, 2002). La prueba de ELISA es más sensible que AGID, ELISA puede detectar infección subclínica más frecuentemente. Las estimaciones para la sensibilidad y especificidad de ELISA varían mucho, dependiendo de la calidad de los reactivos utilizados en las pruebas. Un mayor problema con ELISA es la variedad de antígenos usados en el desarrollo de estas pruebas, además de que la comparación entre diferentes laboratorios es complicada (Stabel *et al.*, 1998; Speer *et al.*, 2006).

ELISA en suero y el cultivo fecal son usados para evaluar la infección de *Map.* en aproximadamente 24 y 8% de operaciones respectivamente, estos métodos son caracterizados por baja sensibilidad (38 a 55%) y alta especificidad (99%) (Lombard *et al.*, 2006, Berghaus *et al.*, 2006; Stabel *et al.*, 2002).

Los problemas de especificidad son debido al alto grado de similitud que existe entre *Map* y/o; micobacterias ambientales (Paustian *et al.*, 2004).

La desventaja de las pruebas serológicas en los animales infectados es que generalmente no producen títulos de anticuerpos hasta después de las etapas de la enfermedad, estas pruebas son relativamente inefectivas en detectar la infección subclínica en vacas (Stabel *et al.*, 2002).

Las pruebas de diagnóstico actuales (ELISA para la detección de anticuerpos y el cultivo fecal), típicamente detectan solamente animales en las etapas tardías de la enfermedad después de que estos comienzan a arrojar al organismo (Austerman *et al.*, 2006).

Actualmente el método menos disponibles para la detección de *Map.*, es la prueba basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el cual tiene un alto potencial analítico de sensibilidad (Barrington *et al.*, 2003)

Un diagnóstico presuntivo de la infección mycobacterial bovina es hecha en animales muertos basándose en la histopatológica de nódulos linfáticos y muestras de tejido mostrando lesiones típicas de paratuberculosis y tinción de bacilos acidó alcohol resistente (Coetsier *et al.*, 2000).

2.7 Tratamiento y Prevención

Actualmente no hay drogas aprobadas para el tratamiento de la enfermedad de Johne en el ganado y es poco común por ejemplo donde el intento de la terapia es limitado usando agentes antimicrobiales generales (Harris y Barletta *et al.*, 2001; El-zaatari *et al.*, 1997).

No existe ninguna vacuna protectora efectiva contra la infección con *Map.* y por lo tanto el control de la enfermedad tiende a ser más embarazosa (Grewal *et al.*, 2006; Koets *et al.*, 2000). Sin embargo; la vacunación de los animales

jóvenes con cualquiera de las dos vacunas bacterina vivas o atenuadas resultan en una marcada reducción del número de animales con enfermedad clínica, pero la vacunación no previene la infección y la excreción de bacilos (Koets *et al.*, 2000). Sin embargo, es importante controlar la propagación de la enfermedad a través de la reducción de cargas patógenas dentro de los hatos infectados (Grewal *et al.*, 2006).

Uno de los desafíos para la prevención de esta enfermedad en los hatos afectados es la identificación de los animales infectados antes de que presenten los síntomas clínicos (Paustian *et al.*, 2004). Sin embargo, el control de la enfermedad de Johne ha sido obstaculizado debido a la carencia de técnicas de diagnóstico sensibles para la detección de la paratuberculosis asintomática, por el tiempo prolongado de incubación y la presencia de casos subclínicos permiten a los animales arrojar grandes cantidades de bacilos en su excremento antes de su detección (Bannantine *et al.*, 2002; Pillai y Jayarao *et al.*, 2002; El-zaatari *et al.*, 1997).

Para el control y erradicación de la paratuberculosis deben ser combinados los instrumentos de diagnóstico disponibles y los cambios de manejo de la granja (Koets *et al.*, 2000).

III. JUSTIFICACIÓN

La paratuberculosis, como enfermedad de los bovinos adultos, representa un trastorno que causa grandes pérdidas económicas, tal vez insensibles por la baja producción de leche en forma lenta, por un mayor manejo de las vacas enfermas y por el uso de antibioterapia a la cual los animales no responden, además es una enfermedad potencialmente patógena para el hombre ya que se reportan casos que producen la enfermedad de Crohn. Por tal motivo, es de gran importancia conocer la situación epidemiológica de la enfermedad en el ganado lechero de la Comarca Lagunera, para poder dar recomendaciones de control y manejo del hato infectado.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General.

Investigar la seroprevalencia de la infección producida por *Map.* en ganado adulto de la Comarca Lagunera

4.2 Objetivos Específicos

Analizar suero de bovinos Holstein, de vacas adultas, con signos clínicos de diarrea, utilizando un paquete comercial de diagnóstico de ELISA para la detección de anticuerpos contra *Map.*

Analizar suero de bovinos Holstein, de vacas adultas, aparentemente sanas, utilizando un paquete comercial de diagnóstico de ELISA para la detección de anticuerpos contra *Map.*

V. MATERIAL Y METODOS

Fase de campo.

Se tomaron muestras de suero de 92 vacas de 3 a 5 años de edad que llegaron a enfermería con signos clínicos de diarrea de 7 establos lecheros, y 368 sueros, en forma aleatoria, de vacas sanas también de 3 a 5 años de edad, de 20 establos. Los sueros se tomaron en tubos de ensayo al alto vacío sin anticoagulante y se enviaron en refrigeración al lugar de trabajo.

Fase de laboratorio.

Las muestras se trabajaron en el laboratorio de patología de la Unidad de Diagnóstico de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna, donde se procesaron para la extracción del suero, por medio de centrifugación a 2500 rpm durante 10 minutos, se separaron y se congelaron hasta su análisis. Posteriormente los sueros se pusieron a temperatura ambiente antes de ser estudiados. Se utilizó un paquete de diagnóstico de ELISA, disponible comercialmente, para detectar anticuerpos contra *Map.*, analizándose los sueros de acuerdo a las especificaciones de la prueba de diagnóstico, excepto que las muestras fueron probadas una sola vez y no por duplicado. Las 460 muestras de suero fueron probadas durante un periodo de 5 meses por el mismo operador. Se midió la densidad óptica (DO) de las muestras con un lente de 450 nm en un lector de ELISA.

Para la interpretación de los resultados, para cada muestra, la DO de la muestra del suero problema se dividió sobre la DO de la muestras del suero control positivo para determinar la relación Muestra/ Control Positivo (S/P), de acuerdo a las recomendaciones de la prueba.

Técnica de ELISA

Procedimiento de prueba

Deben mantenerse todas las muestras y reactivos a utilizarse a temperatura ambiente antes de realizar la técnica. Los reactivos deberán de mezclando homogenizar el reactivo.

- 1- Obtener la antigeno formación de platos cubiertos y registre la posición de la muestra sobre un herdchek worsheet.
- 2- Diluir la muestra en la muestra recomendada en el factor de dilución, incubar por 30 minutos a 5 horas.
- 3- Poner 100 microlitros de diluyente negativo en las paredes A1 y A2.
- 4- Poner 100 microlitros de diluyente positivo en las paredes A3 y A4.
- 5- Poner 100 microlitros de muestra de diluyente en las paredes aplicables es recomendable que las muestras de suero se corran doble pero si se aplica una sola es valido.
- 6- Incubar por 30 minutos a una temperatura ambiente.
- 7- Quitar todo el líquido de las paredes.
- 8- Lavar cuatro beses con aproximadamente 300 microlitros.
- 9- Secar bien las placas después del lavado.
- 10- Aplicar 100 microlitros de HRPO en cada una de las paredes y dejar incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.
- 11- Repetir pasos 7 y 8
- 12- Depositar 100 microlitros de TMB en cada una de las paredes.
- 13- Dejar incubar por 15 minutos a temperatura ambiente.
- 14- Aplicar 100 microlitros de solución se stop en cada una de las paredes esta es para detener la reacción.

VI. RESULTADOS

El promedio del tamaño del hato para las 27 explotaciones lecheras fue aproximadamente de 1855 cabezas, con un mínimo de 132 y un máximo de 5,984 cabezas.

De los 92 sueros de vacas enfermas, 26 (28.3%) fueron positivas a la presencia de anticuerpos contra *Map.*, en rangos de 21.4% a 36.4%. Los siete hatos donde se tomaron muestras de vacas de enfermería, o sea 100% de los hatos donde había animales con síntomas, resultaron positivos a *Map.* De los 368 sueros de vacas sanas 7 (1.9%) fueron positivos a *Map.* y 6 (30%) de los 20 hatos fueron positivos. El porcentaje de muestras positivas para la población de vacas enfermas fue de 0.22 (26/11,888) y para las vacas sanas fue de 0.01% (7/38,198). Sin embargo, el porcentaje de hatos con por lo menos un animal positivo fue de 100% en los hatos con síntomas y 30% en los hatos sin síntomas.

VII. DISCUSION

La paratuberculosis, producida por la bacteria Map., es una enfermedad crónica que afecta al ganado bovino, y el ganado lechero tiene una mayor probabilidad de infección debido al tipo de explotación intensiva (Harris y Barletta, 2001). De acuerdo a esto, es entendible que la lechería de la Comarca Lagunera sea una región con alta prevalencia de la enfermedad, sin embargo no había estudios que indicaran la frecuencia de ésta. En este estudio se realizó un análisis serológico, aunque el estado de infección del ganado no fue confirmado por métodos de detección del organismo como el cultivo fecal. Se encontró que un 30% de hatos lecheros, con animales aparentemente sanos, mostraron evidencias serológicas de MAP, similar a lo reportado por Wells y Wagner (2000), donde observaron que al menos 22% de los hatos lecheros en Estados Unidos están infectados con MAP.

El estudio se llevó a cabo mediante una prueba de ELISA, ya que existen varios paquetes de pruebas de ELISA para suero, disponibles comercialmente, con estimados de sensibilidad y especificidad en rangos de 28 a 29% y 95 a 100% respectivamente (Collins y col., 2005). Se ha reportado que la prueba de ELISA es menos sensible que el cultivo fecal, y se ha encontrado que la prueba serológica por ELISA detecta solo 45% a 75% de ganado infectado con MAP que ha sido positivo al cultivo fecal (Milner y col., 1990; Sweeney y col., 1995).

También nuestro estudio reveló un 1.9% de positividad serológica a MAP, pero los resultados han sido muy diversos al respecto. Un estudio publicado en Estados Unidos, en 1987 (Merkal y col.), reportó que la prevalencia nacional de paratuberculosis bovina en ganado lechero y de carne fue de 1.6% (2.9% en hatos lecheros y 0.8% en hatos de carne. Sin embargo en Estados lecheros como Wisconsin se reportó una prevalencia estimada de 10.8% (Braun y col., 1990). En ambos casos se realizó aislamiento de MAP a partir de linfonódulos. También en los años 1990s, la prevalencia de la enfermedad de Johne por hato en diferentes países con una importante industria lechera se calculó en aproximadamente un 10% (Sockett, 1996). En Estados Unidos, en 1996 se

reportó una aparente prevalencia para la enfermedad de Johne a nivel de animales de 3.4% utilizando una prueba de ELISA. El mismo estudio estimó la prevalencia a nivel de hato lechero en USA de entre 17 y 41% (NAHMS, 1997). En años recientes, en Bélgica (Boelaert y col., 2000), los Países Bajos (Muskens y col., 2000), y Dinamarca (Nielsen y col., 2000), la prevalencia en hatos lecheros ha sido estimada estar entre 1.2 y 50 %. Un estudio previo hecho en Canadá, usando una prueba serológica de vacas lecheras reportaron una prevalencia de 2.6% (VanLeeuwen y col., 2001). Mckenna y col. (2004), reportan en un estudio una prevalencia de MAP de 16.1% en ganado de Canadá, basado en un muestreo aleatorio de ganado de rastro, sustancialmente mas alto que la seroprevalencia estimada previamente de 2.6% realizado por VanLeeuwen y col. (2001). Esto muestra un dramático cambio en la prevalencia en un periodo de 4 años. En el Noreste de España la prevalencia de MAP fue de 3.02% en ganado lechero y de 1.03% en ganado de carne y 2.83% en animales de hatos con ganado de leche y de carne (Dieguez y col., 2007). En Korea la prevalencia estimada de MAP en un estudio de población fue del rango de 3.2 a 5.3 (Son-il Pak y col., 2003).

Actualmente las pruebas de diagnóstico usadas para la enfermedad de Johne necesitan ser mejoradas debido a sus deficiencias de sensibilidad y especificidad (Paustian *et al.*, 2004; Koets *et al.*, 2000).

VIII. CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS

De acuerdo a estos antecedentes y a los resultados obtenidos en la presente investigación, es evidente que la enfermedad de Johne se encuentra presente en la Comarca Lagunera, por lo tanto es importante tener en cuenta estos estudios que permitan ampliar los conocimientos y evaluar el impacto económico sobre la situación de la paratuberculosis en nuestro país.

Es recomendable seguir con estudios similares que nos indiquen, aparte de la prevalencia de la enfermedad, el impacto económico que repercute en la producción de leche.

IX. LITERATURA CITADA

1. Aho A.D., McNulty A.M., Coussens P.M. (2003). Enhanced Expression of Interleukin-1 β and Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Protein 1 in Ileal Tissues of Cattle Infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Infection and Immunity*. 70(11):6479-6486.
2. Austerman S.R., Stabel J.R., Palmer M.V. (2006). Evaluation of the gamma interferon ELISA in sheep subclinically infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using a whole-cell sonicate or a johnin purified-protein derivative. *J Vet Diagn Invest*. 18:189-194.
3. Bannantine J.P., Baechler E., Zhang Q., Li L., kapur V. (2002). Genome Scale Comparison of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with *Mycobacterium avium* subsp. *avium* Reveals Potential Diagnostic Sequences. *Journal of Clinical Microbiology* 40(4):1303-1310.
4. Bannantine J.P., Huntley J.F., Miltner E., Stabel J.R., Bermudez L.E. (2003). The *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* 35 kDa protein plays a role in invasion of bovine epithelial cells. *J. Microbiology*. 149:2061-2069.
5. Barrington G. M., Gay J. M., Eriks I. S., Davis W. C., Evermann J. F., Emerson C., O'Rourke J. L., Hamilton M. J., Bradway D. S. (2003). Temporal patterns of diagnostic results in serial samples from cattle with advanced paratuberculosis infections. *J Vet Diagn Invest* .15:195-200.
6. Berghaus R.D., Farver T.B., Anderson R.J., Adaska J.M., Gardner I.A. (2006). Use of age and milk production data to improve the ability of enzymelinked immunosorbent assay test results to predict *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* fecal culture status. *J Vet Diagn Invest*. 18:233-242.
7. Bernstein C.N., Wang M., Sargent M., Brant S.R., Collins M.T. (2007). Testing the Interaction between NOD-2 Status and Serological Response to *Mycobacterium paratuberculosis* in Cases of Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Clinical Microbiology* 45(3):968-971.
8. Boelaert, F., Walravens, K., Biront, P., Vermeersch, J.P., Berkvens, D. y Godfroid, J. (2000). Prevalence of paratuberculosis (Johne's disease) in the Belgian cattle population. *Vet Microbiol*. 77(3-4): 269-281.
9. Braun, R.K., Buergelt, C.D., Littell, R.C., Linda, S.B. y Simpson, J.R. (1990). Use of an enzyme-linked immunosorbent assay to estimate prevalence of paratuberculosis in cattle of Florida. *JAVMA*. 196:1251–1254.

10. Buergelt C.D., Layton A.W, Ginn P.E., Taylor M., King J.M., Habecker P.L., Mauldin E., Whitlock R., Rossiter C. y Collins M.T. (2000). The Pathology of Spontaneous Paratuberculosis in the North American Bison (*Bison bison*). *Vet Pathol.* 37:428–438.
11. Bull T.J., Hermon-Taylor J., Pavlik I., El-Zaatari F., Tizard M. (2000). Characterization of IS900 loci in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and development of multiplex PCR typing. *Microbiology.* 146:2185-2197.
12. Coetsier C., Vannuffel P., Blondeel N., Denef J., Cocito C., Gala J. (2000). Duplex PCR for Differential Identification of *Mycobacterium bovis*, *M. avium*, and *M. avium* subsp. *paratuberculosis* in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissues from Cattle. *Journal of Clinical Microbiology.* 38(8):3048-3054.
13. Collins M.T., Lisby G., Moser C., Chicks D., Christensen S., Derfer M.R., Hoiby N., Harms B.A., 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. *Journal of Clinical Microbiology.* 38(12):4373-4381.
14. Collins M.T., Wells S.J., Petrini K.R., Collins J.E., Schultz R.D., Whitlock R.H. (2005). Evaluation of Five Antibody Detection Tests for Diagnosis of Bovine Paratuberculosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.* 12(6):685-692.
15. Coussens P.M., Colvin C.J., Wiersma K., Abouzied A., Sipkovsky S. (2002). Gene Expression Profiling of Peripheral Blood Mononuclear Cells from Cattle Infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Infection and Immunity.* 70(10): 5494–5502.
16. Coussens P.M. (2004). Model for Immune Responses to *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* in Cattle. *Infection and immunity.* 72(6): 3089-3096.
17. Coussens P.M., Colvin C.J., Rosa G.J., Perez J., Elftman M.D. (2003). Evidence for a Novel Gene Expression Program in Peripheral Blood Mononuclear Cells from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-Infected Cattle. *Infection and Immunity.* 71(11):6487-6498.
18. Dieguez, F.J., Arnaiz, I., Sanjuan, M.L., Vilar, M.J., Lopez, M. y Yus, E. (2007). Prevalence of serum antibodies to *Mycobacterium avium* susp. *paratuberculosis* el cattle in Galicia (norrrthwest Spain). *Prev Vet Med.* 82(3-4): 321-326.
19. El-zaatari F.A., Naser S.A., Gram. D.Y. (1997). Characterization of a Specific *Mycobacterium paratuberculosis* Recombinant Clone Expressing 35,000-Molecular-Weight Antigen and Reactivity with Sera from Animals

with Clinical and Subclinical Johne's Disease. *Journal of Clinical Microbiology*. 35(7):1794-1799.

20. Elzo M.A., Rae D.O., Lanhart S.E., Wasdin J.G., Dixon W.P., Jones J.L. (2006). Factors associated with ELISA scores for paratuberculosis in an Angus-Brahman multibreed herd of beef cattle. *J. Anim. Sci.* 84:41-48.
21. Grant I.R., Ball H.J., Rowe M.T. (2002). Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in Bulk Raw and Commercially Pasteurized Cows' Milk from Approved Dairy Processing Establishments in the United Kingdom. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(5):2428-2435.
22. Grewal S.K., Rajeev S., Sreevatsan S., Michel F.C. (2006). Persistence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and Other Zoonotic Pathogens during Simulated Composting, Manure Packing, and Liquid Storage of Dairy Manure. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(1):565-574.
23. Harris N.B. Y Barletta R.G. (2001). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. *Clinical Microbiology Reviews*. 14(3):489-512.
24. Hill B.B., West M., Brock K.V. (2003). An estimated prevalence of Johne's disease in a subpopulation of Alabama beef cattle. *J Vet Diagn Invest*. 15:21-25.
25. Jungersen G., Huda A., Hansen J.J. y Lind P. (2002). Interpretation of the Gamma Interferon Test for Diagnosis of Subclinical Paratuberculosis in Cattle. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 9(2):453-460
26. Kalis C.H., Hesselink J.W., Barkema H.W., Collins M.T. (2000). Culture of strategically pooled bovine fecal samples as a method to screen herds for paratuberculosis. *J Vet Diagn Invest*: 12:547-551.
27. Koets A.P., Aduagna G., Janss L.L., Weering H.J., Kalis C.H., Wentink G.H., Rutten V.P., Schukken Y.H. (2000). Genetic Variation of Susceptibility to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Infection in Dairy Cattle. *J Dairy Sc*: ;83:2702-2708.
28. Kovich D.A., Wells S.J., Friendshuh K. (2006). Evaluation of the Voluntary Johne's Disease Herd Status Program as a Source of Replacement Cattle. *J. Dairy Sci*: 89:3466-3470.
29. Lombard J.E., Byrem T.M., Wagner B.A., McCluskey B.J. (2006). Comparison of milk and serum enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in dairy cattle. *J Vet Diagn Invest*. 18:448-458.
30. Manning E.J., Kucera T.E., Gates N.B., Woods L.M., Fallon-Mcknight M. (2003). Testing for *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*

infection in asymptomatic free-ranging tule elk from an infected herd. *Journal of Wildlife Diseases*. 39(2):323-328.

31. McKenna, S.L. Keefe, G.P. Barkema, H.W., McClure, J., VanLeeuwen, J.A. Hanna, P. y Sockett, D.C. (2004). Cow-Level Prevalence of Paratuberculosis in Culled Dairy Cows in Atlantic Canada and Maine. *J Dairy Sci*. 87: 3770-3777.
32. Merkal, R.S., Whipple, D.L., Sacks, J.M. y Snyder, G.R. (1987). Prevalence of *Mycobacterium paratuberculosis* in ileocecal lymph nodes of cattle culled in the United States. *JAVMA*. 190:676-680.
33. Milner, A.R., Mack, W.N., Coates, K.J., Hill, J., Hill, I. y Sheldrick, P. (1990). The sensitivity and specificity of a modified ELISA for the diagnosis of Johne's disease from a field trial in cattle. *Vet. Microbiol*. 25:193-198.
34. Muskens, J., Barkema, H.W., Russchen, E., van Maanen, K., Schukken, Y.H. y Bakker, D. (2000). Prevalence and regional distribution of paratuberculosis in dairy herds in The Netherlands. *Vet Microbiol*. 77(3-4): 253-261.
35. NAHMS (National Animal Health Monitoring System). (1997). Johne's Disease on U.S. Dairy Operations. USDA. APHIS:VS, CEAH, National Animal Health Monitoring System, Fort Collins, CO.
36. Nielsen, S.S. Thamsborg, S.M., Houe, H. y Bitsch, V. (2000). Bulk-tank milk ELISA antibodies for estimating the prevalence of paratuberculosis in Danish dairy herds. *Prev Vet Med*. 44(1-2): 1-7.
37. Nielsen S.S., Gröhn Y.T., Enevoldsen C. (2002a). Variation of the Milk Antibody Response to Paratuberculosis in Naturally Infected Dairy Cows. *J. Dairy Sci*. 85:2795-2802.
38. Nielsen S.S., Gröhn Y.T., Quaas R.L., Agger J.F. (2002b). Paratuberculosis in Dairy Cattle: Variation of the Antibody Response in Offspring Attributable to the Dam. *J. Dairy Sci*. 85:406-412.
39. Olsen I., Reitan L.J., Holstad G., Wiker H.G. (2000). Alkyl Hydroperoxide Reductases C and D Are Major Antigens Constitutively Expressed by *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*. *Infection and Immunity*. 68(2):801-808.
40. Paustian M.L., Amonsin A., Kapur V., Bannantine J.P. (2004). Characterization of Novel Coding Sequences Specific to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: Implications for Diagnosis of Johne's Disease. *Journal of Clinical Microbiology*. 42(6):2675-2681.

41. Pillai S.R. y Jayarao B.M. (2002). Application of IS900 PCR for Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Directly from Raw Milk. *J. Dairy Sci.* 85:1052-1057.
42. Rademaker J.L., Vissers M.M., Giffel M.C. (2007). Effective Heat Inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Raw Milk Contaminated with Naturally Infected Feces. *Applied and Environmental Microbiology.* 73(13):4185-4190.
43. Salgado M., Kruze J., Collins M.T. (2007). Diagnosis of paratuberculosis by fecal culture and ELISA on milk and serum samples in two types of Chilean dairy goat herds. *J Vet Diagn Invest.* 19:99-102.
44. Sockett, D.C. (1996). Johne's disease eradication and control: regulatory implications. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 12(2): 431-440.
45. Son-il Pak, Doo Kim y Mo Salman. (2003). Estimation of paratuberculosis prevalence in Dairy Cattle in a Province of Korea using an Enzyme-linked Immunosorbent Assay: Application of Bayesian Approach. *J Vet Sci.* 4(1): 51-56.
46. Speer C.A., Scott M.C., Bannantine J.P., Waters W.R., Mori Y., Whitlock R.H., Eda S. (2006). A Novel Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Infections (Johne's Disease) in Cattle. *Clinical and Vaccine Immunology.* 13(5):535-540.
47. Stabel J.R. (1998). Symposium. Biosecurity and Disease. *J Dairy Sci.* 81:283-288.
48. Stabel J.R. (2000). Symposium: Health and Safety on the dairy farm. *J. Dairy Sci.* 83:1659-1663.
49. Stabel J.R., Wells S.R. Y Wagners B.A. (2002). Relationships Between Fecal Culture, ELISA, and Bulk Tank Milk Test Results for Johne's Disease in US Dairy Herds. *J. Dairy Sci.* 85:525-531.
50. Stabel J.R., Goff J.P., Kimura K. (2003). Effects of Supplemental Energy on Metabolic and Immune Measurements in Periparturient Dairy Cows with Johne's Disease. *J. Dairy Sci.* 86:3527-3535.
51. Stabel J.R., Kimura K., Robbe-Austerman S. (2007). Augmentation of secreted and intracellular gamma interferon following johnin purified protein derivative sensitization of cows naturally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*. *J Vet Diagn Invest* 19:43-51.
52. Stratmann J., Strommenger B., Stevenson K., Gerlach G. (2002). Development of a Peptide-Mediated Capture PCR for Detection of

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* in Milk. *Journal of Clinical Microbiology*. 40(11):4244-4250.

53. Sweeney, R.W., Whitlock, R.H., Buckley, C.L. y Spencer, P.A. (1995). Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle. *J Vet Diagn Invest*. 7: 488 – 493.
54. Thornton C.G., MacLellan K.M., Stabel J.R., Carothers C., Whitlock R.H., Passen S. (2002). Application of the C18-Carboxypropylbetaine Specimen Processing Method to recovery of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from Ruminant Tissue Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 40(5):1783-1790.
55. VanLeeuwen, J.A., Keefe, G.P., Tremblay, R., Power, C. y Wichtel, J.J. (2001). Seroprevalence of infection with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, bovine leukemia virus, and bovine viral diarrhea virus in maritime Canada dairy cattle. *Can Vet J*. 42(3): 193-198.
56. Weiss D.J., Evanson O.A., Moritz A., Deng M.Q., Abrahamsen M. S. (2002). Differential Responses of Bovine Macrophages to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. *Infection and immunity*. 70(10):5556-5561.
57. Weiss D.J., Evanson O.A., Deng M., Abrahamsen M.S. (2004). Gene Expression and Antimicrobial Activity of Bovine Macrophages in Response to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Pathol*. 41:326–337.
58. Weiss D.J., Evanson O.A., Souza C.D. (2006). Mucosal Immune Response in Cattle with Subclinical Johne's Disease. *Vet Pathol*. 43:127-135.
59. Wells, S.J. y Wagner, B.A. 2000. Herd-level risk factors for infection with *Mycobacterium paratuberculosis* in US dairies and association between familiarity of the herd manager with the disease or prior diagnosis of the disease and use of preventive measures. *J. Am. Vet. Med. Assoc*. 216:1450–1457.
60. Whittington R.J., Hope A.F., Marshall D.J., Taragel C.A., Marsh I. (2000). Molecular Epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: IS900 Restriction Fragment Length Polymorphism and IS1311 Polymorphism Analyses of Isolates from Animals and a Human in Australia. *Journal of Clinical Microbiology*. 38(9):3240-3248.
61. Wu C., Livesey M., Schmoller S.K., Manning E.J., Steinberg H., Davis W.C., Hamilton M.J., Yalaat A.M. (2007). Invasion and Persistence of

Mycobacterium avium subsp. *Paratuberculosis* during Early Stages of Johne's Disease in Calves. *Infection and Immunity*. 75(5):2110-2119.