

Comparación de tres métodos de diagnóstico de Paratuberculosis bovina en rebaños lecheros infectados

Comparison of three different methods for the diagnosis of bovine Paratuberculosis in infected dairy herds

J. P. SOTO, M.V.; J. KRUZE, M.V., PhD.; S. LEIVA, B.M. M.Sc.

Instituto de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Casilla 167, Valdivia, Chile
(jkruze@uach.cl)

SUMMARY

The sensitivity and specificity of the direct microscopic examination of faeces (Ziehl Neelsen stain), faecal culture (Modified Herrold's Medium) and a serological test (ELISA) used for the diagnosis of bovine Paratuberculosis was compared in 250 asymptomatic animals from 14 infected dairy herds. All faecal samples were simultaneously examined by the two bacteriological methods and the isolated cultures identified by PCR technology. The serological diagnosis was performed using a commercial kit of an ELISA test (IDEXX) with a photometric reader at 620 nm and a cut off of OD 0.25. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*) was isolated in 71.4% (10) of herds and 16.0% (40) of animals. No positive samples were found when examined by the Ziehl Neelsen method, although a doubtful result was recorded in 35 (14.0%) faecal samples, 6 (17.0%) of which were also culture positive (κ : 0.013). The serological test detected 8.0% (20) of positive reactors with a sensitivity of 96.7% and a specificity of 32.5% (κ : 0.366). These results show the advantage of using simultaneously both faecal culture and serology for the diagnosis of infected but asymptomatic animals and the uselessness of the direct microscopic examination of faeces as diagnostic method of Paratuberculosis in subclinically infected animals.

Palabras claves: Paratuberculosis, diagnóstico, baciloscopia, cultivo, ELISA.

Key words: Paratuberculosis, diagnosis, bacilloscopy, culture, ELISA.

INTRODUCCION

La Paratuberculosis bovina es una enfermedad crónica e incurable que afecta los intestinos y que produce cuantiosas pérdidas económicas por menor producción, eliminación prematura de animales infectados, menor valor comercial de canales y elevados costos de los programas de control (Gilmour, 1985; Blood y col., 1992; Hutchinson, 1996; Collins, 1999). Las principales formas de adquirir la enfermedad son a través de la ingestión de material fecal, leche, o calostro contaminados con *Mycobacterium*

avium subsp. *paratuberculosis* (*Map*), siendo la ingestión de fecas de animales infectados la forma más común de infección, afectando en mayor medida a los terneros, en especial los menores de 6 meses, que son los más susceptibles a contraer la enfermedad. La principal forma de transmisión de la infección en los rebaños infectados es a través de la excreción del agente por la leche y las fecas. En consecuencia, cuando los terneros se crían en forma natural con la madre la probabilidad de infección por la ingestión de leche es mayor (Sweeney, 1996; Stabel, 1998).

Esta enfermedad tiene una alta prevalencia en muchos países (Riemann y Abbas, 1983; Gilmour, 1985; Stabel, 1998) y actualmente

existe gran preocupación entre los productores de ganado bovino en el sur de Chile por confirmar su diagnóstico (Kruze y col., 2001). Aunque en Chile no existen antecedentes oficiales sobre prevalencia de Paratuberculosis bovina, es posible sospechar que existe un elevado porcentaje de rebaños infectados, especialmente rebaños lecheros. Datos no publicados del Servicio Agrícola y Ganadero (S.A.G.), Ministerio de Agricultura¹, revelan que en 1996 un monitoreo realizado en la V, VI, VII y Región Metropolitana detectó un 36.9% de rebaños positivos de un total de 84 examinados, y 2.8% de animales positivos de un total de 1855 examinados con ELISA (IDEXX, USA). Por otro lado, datos no publicados recopilados en el Laboratorio de Bacteriología de Cooprinsem, Osorno², revelan que en 1999 se diagnosticó la enfermedad empleando la prueba de ELISA (SVANOVA, Suecia) en el 52.2% de 23 rebaños lecheros localizados principalmente en la provincia de Osorno, con una prevalencia individual de 16.3% de animales positivos. Finalmente, es importante señalar que en los últimos 10 años el Laboratorio de Diagnóstico del Instituto de Microbiología, Universidad Austral de Chile, registra 138 exámenes baciloscópicos de fecas con un 24.7% de muestras positivas a la tinción de Ziehl Neelsen, porcentaje elevado si se considera la baja sensibilidad de este método para detectar animales infectados.

La base del control de esta enfermedad es la identificación y eliminación de los animales infectados, sin embargo, el carácter subclínico de la enfermedad y la baja sensibilidad de los métodos de laboratorio dificultan el diagnóstico, no existiendo, hasta el momento, ningún método 100% seguro para detectar a todos los animales infectados, especialmente los jóvenes (Riemann y Abbas, 1983; Collins, 1996; Collins, 1999; Kalis y col., 1999). El objetivo del presente trabajo fue comparar tres métodos de diagnóstico de laboratorio en animales asintomáticos provenientes de rebaños lecheros infectados, con

la finalidad de encontrar el más apropiado para el control de la enfermedad.

MATERIAL Y METODOS

Rebaños. Se seleccionaron 14 rebaños lecheros con antecedentes clínicos, serológicos o bacteriológicos de Paratuberculosis ubicados en las provincias de Valdivia y Osorno (X Región, Chile).

Muestras. En cada rebaño se recolectó simultáneamente una muestra de fecas y una muestra de sangre de un número representativo de animales asintomáticos (aproximadamente 10%), hasta completar un total de 250; además, se anotó el número de partos de cada uno de los animales muestreados en base a los registros disponibles en el predio. Las muestras fecales se obtuvieron por vía rectal mediante una manga de palpación rectal limpia y seca y fueron transportadas inmediatamente al laboratorio para su procesamiento dentro de 96 h (Whipple y col., 1991). Las muestras de sangre se obtuvieron por punción de la vena coxígea en tubos venojet estériles en cantidad aproximada de 5 ml por animal, las cuales fueron transportadas al laboratorio y, después de separar el suero, congeladas a -20°C hasta su procesamiento.

Diagnóstico bacteriológico. Las muestras de fecas fueron examinadas simultáneamente mediante cultivo en Medio de Herrold Modificado de acuerdo al procedimiento descrito previamente (Soto y col., 2002) y por baciloscopía mediante la técnica de Ziehl Neelsen (Carter, 1990). La identidad de las cepas aisladas fue confirmada en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Bioquímica, Universidad Austral de Chile (Dra. Ana María Zarraga, Proyecto Fondef D99I1096), mediante la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction), basado en la amplificación del elemento de inserción IS900 específico para *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Green y col., 1986), utilizando los partidores específicos P90⁺ (5'-GAAGGGTGTTCGGGGCCGTCGCTTAGG-3') y P91⁺ (5'-GGCGTTGAGGTCGATCGCCACGTTGAC-3').

¹O. Muñoz, (Q.E.P.D.), S.A.G., Enero 2000 (com. pers.).

²B. León, Cooprinsem, Osorno, Enero 2000 (com. pers.).

Diagnóstico serológico. La detección de anticuerpos séricos contra *Map* se realizó mediante la técnica de inmunoenzimo ensayo (ELISA), empleando un kit comercial (IDEXX Laboratories, Inc., USA), de acuerdo al procedimiento descrito por Jark y col. (1997), utilizando un lector fotométrico a 620 nm. Para la interpretación de los resultados se consideraron como reaccionantes positivos aquellas muestras con relación densidad óptica (DO) muestra/control positivos igual o superior a 0.25.

Análisis estadístico. Para determinar el tamaño muestral (250) se consideró una prevalencia de la Paratuberculosis bovina de 20.0%, empleando un nivel de confianza de un 95.0% y un porcentaje de error de un 5.0%, de acuerdo con la metodología descrita por Lwanga y Lemeshow (1991). Para establecer la concordancia entre pruebas se utilizó la prueba de *kappa* (Martin y col., 1987), interpretándose de acuerdo a la escala de referencia propuesta por Landis y Koch (1977). Para determinar la

sensibilidad y especificidad de las pruebas se utilizó el programa computacional Win Episcopo 2.0, empleando como referencia el trabajo de Smith (1995). Todos los análisis fueron hechos con un nivel de confianza del 95%.

RESULTADOS

En 10 (71.4%) de los 14 rebaños y en 40 (16.0%) de las 250 muestras se aisló *Mycobacterium* de las fecas, confirmándose en todas ellas la identidad del agente etiológico por PCR; el porcentaje de animales *Map* positivos por rebaño fluctuó entre 5.0 % y 66.7 % (Cuadro 1).

El análisis de los resultados bacteriológicos, según grupos de edad, demostró que el mayor porcentaje de cultivos positivos (22.3%) se obtuvo en animales entre 3-5 partos (Cuadro 2). Esto también queda de manifiesto al analizar la distribución por rebaño de los 40 animales positivos, ya que en el 50% de los rebaños con animales infectados hubo mayor número de muestras positivas al cultivo en animales de 3-5 partos (Cuadro 3).

CUADRO 1. Número y porcentaje de muestras de fecas positivas al aislamiento de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* distribuidos por rebaño.
Number and percentage of faecal samples positive for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy herds.

Rebaño	Nº Muestras analizadas	Muestras positivas	
		Nº	%
1	14	0	0.0 %
2	15	1	6.7 %
3	15	1	6.7 %
4	16	1	6.2 %
5	22	0	0.0 %
6	18	1	5.6 %
7	18	0	0.0 %
8	15	8	53.3 %
9	15	10	66.7 %
10	20	5	25.0 %
11	20	2	10.0 %
12	20	1	5.0 %
13	22	10	45.5 %
14	20	0	0.0 %
Total	250	40	16.0 %

CUADRO 2. Distribución de animales positivos al cultivo bacteriológico en relación al total de animales muestreados y categoría de edad.

Distribution of animals with positive culture in relation to ranges of age.

Animales	Nº Partos		
	< 3	3-5	> 5
Examinados	93	103	54
Positivos	12	23	5
Porcentaje	13.0	22.3	9.2

CUADRO 3. Distribución de los animales positivos al cultivo bacteriológico por categoría de edad y por rebaño.

Distribution of animals with positive culture in relation to age and infected herd.

Rebaño	Nº Partos			Total
	< 3	3-5	> 5	
2	1	0	0	1
3	1	0	0	1
4	1	0	0	1
6	0	1	0	1
8	4	4	0	8
9	4	3	3	10
10	0	3	2	5
11	0	2	0	2
12	0	1	0	1
13	1	9	0	10
Total	12	23	5	40
Porcentaje	30.0	57.5	12.5	100

De las 250 muestras analizadas, 35 (14.0%) resultaron sospechosas (+/-) al examen microscópico directo, de las cuales sólo 6 (17.0%) correspondieron a muestras positivas al cultivo fecal, equivalente al 15% de los cultivos *Map* positivo (Cuadro 4). Los resultados del análisis estadístico revelaron que el examen microscópico directo tuvo una sensibilidad de un 15.0% y una especificidad de 86.2%. La prueba de kappa demostró que no existe concordancia entre el examen microscópico directo y el cultivo fecal (prueba de oro), encontrándose un valor de kappa de sólo 0.013 (Cuadro 5).

CUADRO 4. Resultados de los exámenes microscópicos directos (Ziehl Neelsen) de las muestras de fecas positivas al cultivo bacteriológico. Results of the directed microscopic examination (Ziehl Neelsen Method) of faecal samples positive to the bacteriological culture.

Muestra Fecal Nº	Ziehl Neelsen	Muestra Fecal Nº	Ziehl Neelsen
22	-	147	-
39	-	148	-
58	-	157	+/-
85	-	159	-
121	-	162	-
122	-	165	-
123	-	166	+/-
124	-	176	+/-
125	-	183	-
126	-	202	+/-
127	-	209	-
129	-	217	-
134	-	220	-
136	-	221	-
139	-	223	+/-
142	-	224	-
143	-	225	-
144	-	228	+/-
145	-	229	-
146	-	230	-
Total +/-	0	Total +/-	6
%	0.0	%	15.0

CUADRO 5. Análisis de sensibilidad, especificidad y concordancia del examen microscópico directo de fecas empleando el cultivo fecal como prueba de oro. Sensitivity, specificity and agreement analysis between Ziehl Neelsen Method and faecal culture (golden test).

Z.N.	Cultivo de fecas		
	+	-	Total
+/-	6 ^a	29 ^b	35
-	34 ^c	181 ^d	215
Total	40	210	250
Sensibilidad : $a / (a + c) \times 100 = 15.0 \%$			
Especificidad : $d / (b + d) \times 100 = 86.2 \%$			
Concordancia : <i>Kappa</i> = 0.013			

Z.N. = Examen Microscópico Directo (tinción de Ziehl Neelsen).

De los 250 animales examinados, la prueba de ELISA fue capaz de detectar 20 reaccionantes positivos a *Map*, equivalentes al 8.0% de las muestras analizadas (Cuadro 7). De los 10 rebaños que presentaron animales positivos al cultivo fecal, 7 tuvieron también animales positivos a la prueba de ELISA, detectando el cultivo fecal una mayor cantidad de animales infectados en 5 de estos 7 rebaños (Cuadro 6). A pesar de que el ELISA detectó un menor número de animales infectados, fue capaz, al igual que el cultivo fecal, de detectar animales infectados en las 3 categorías de edad estudiadas (Cuadro 7).

El análisis estadístico demostró que la prueba de ELISA utilizada fue altamente específica (96.7%), pero poco sensible (32.5%) para la detección de anticuerpos contra *Map* en los animales examinados, en tanto que la concordancia de esta prueba con el cultivo fecal fue mediana, con un valor de $kappa = 0.366$ (Cuadro 8).

DISCUSION

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la Paratuberculosis bovina se encuentra ampliamente distribuida en los rebaños lecheros del sur de Chile al aislarse el agente causal en 10 de los 14 rebaños (71.4%) y en 40 (16.0%) de los animales examinados (Cuadro 1). Es conocida la existencia de factores que afectan la capacidad de detección de la infección por medio del cultivo fecal (excreción intermitente y en escaso número del agente causal por las fecas y contaminación de los cultivos por agentes microbiológicos, especialmente hongos), por lo que es altamente probable que los niveles de infección en los rebaños examinados sea mayor a la reportada en este trabajo (Collins y Sockett, 1993, Collins, 1996, Stabel, 1998).

Aunque en el presente estudio la mayoría de los animales que resultaron positivos al cultivo

CUADRO 6. Número de animales con resultados positivos al cultivo bacteriológico y examen serológico distribuidos por rebaño.
Number of cultural and serological positive animals in relation to the infected herds.

Rebaño N°	N° muestras examinadas	Muestras Positivas	
		Cultivo	ELISA
3	15	1	1
8	15	8	5
9	15	10	4
10	20	5	4
11	20	2	1
12	20	1	1
13	22	10	2

CUADRO 7. Resultados de las pruebas serológicas de ELISA de 250 animales provenientes de 14 rebaños infectados con *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* distribuidos por categoría de edad.
Serological results (ELISA Test) against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* of 250 animals from 14 infected dairy herds in relation to ranges of age.

	N° Partos			Total
	< 3	3-5	> 5	
ELISA (+)	3	14	3	20 (8.0%)
Examinados	93	103	54	250 (100.0%)

CUADRO 8. Resultados del análisis de sensibilidad, especificidad y concordancia de la prueba de ELISA en relación al cultivo fecal.

Sensitivity, specificity and agreement analysis between ELISA Test and fecal culture.

ELISA	Cultivo de fecas		
	+	-	Total
+	13 ^a	7 ^b	20
-	27 ^c	203 ^d	230
Total	40	210	250
Sensibilidad : $a / (a + c) \times 100 = 32.5 \%$			
Especificidad : $d / (b + d) \times 100 = 96.7 \%$			
Concordancia : $Kappa = 0.366$			

de fecas pertenecían al grupo etéreo de 3-5 partos, también fue posible obtener aislamiento en un importante número de animales con menos de dos partos (Cuadro 2 y Cuadro 3), lo que demuestra la eficiencia del método de aislamiento empleado. La gran cantidad de animales jóvenes que resultaron positivos al cultivo fecal podría explicarse por el grado de exposición de los animales susceptibles en los rebaños infectados, ya que el mayor número de animales jóvenes positivos al cultivo provenía de los rebaños con mayor número de animales infectados; esto permite sospechar que en estos rebaños existiría una alta prevalencia de la enfermedad y, por lo tanto, un alto riesgo de infección, especialmente de los animales jóvenes que son los más susceptibles. Por otro lado, al existir una alta prevalencia también es posible la transmisión vertical de madre a feto vía intrauterina y a través del calostro en los terneros (Sweeney, 1996).

El examen microscópico directo demostró ser un método diagnóstico poco confiable, ya que en ningún frotis fue posible observar la morfología típica de *Map*, registrándose sólo 35 resultados dudosos (+/-), de los cuales sólo 6 fueron simultáneamente positivos al cultivo fecal (Cuadro 4). Esto demuestra la escasa capacidad de esta técnica para detectar animales infectados subclínicamente de manera certera, debido a que es posible observar otros bacilos ácido alcohol resistentes en las fecas de animales sanos. Por

lo tanto, su presencia en las fecas no puede utilizarse como criterio definitivo para clasificar a un animal como infectado con *Map*. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Zimmer y col. (1999), quienes encontraron un 8.8% de resultados falsos positivos al examen microscópico directo comparado con el cultivo fecal y PCR. Una situación similar es reportada por Merkal (1971), quien encontró bacilos ácido alcohol resistentes en el 76.0% de muestras fecales de animales sanos. Esta escasa capacidad del examen microscópico de fecas para diagnosticar la Paratuberculosis bovina en animales asintomáticos queda demostrada por la baja sensibilidad alcanzada en el presente estudio, la que sólo llegó al 15.0%, porcentaje similar al descrito por Zimmer y col. (1999), con apenas una especificidad diagnóstica de un 86.2% (Cuadro 5). Aunque estos resultados pudieran ser considerados aceptables debido a que corresponden a una población de animales clínicamente sanos, la nula concordancia de estos resultados con el cultivo fecal ($kappa = 0.013$), confirma lo poco confiable que es el frotis de fecas teñido con el método de Ziehl Neelsen para el diagnóstico de la Paratuberculosis bovina (Cuadro 5).

La prueba de ELISA utilizada en este estudio demostró ser eficaz en el diagnóstico de la Paratuberculosis bovina al detectar 20 (8.0%) animales reaccionantes positivos (Cuadro 7), sin embargo, como era de esperar, el cultivo fecal fue notoriamente superior a esta prueba serológica ya que detectó el doble (16.0%) de animales positivos a la enfermedad (Cuadro 1). La diferencia encontrada entre el cultivo fecal y el ELISA concuerda con Whitlock y col. (2000), quienes manifiestan que al utilizar simultáneamente, en rebaños infectados, el cultivo fecal y la prueba de ELISA para el diagnóstico de la Paratuberculosis bovina, generalmente el cultivo fecal detecta más del doble de animales positivos.

La marcada diferencia entre el cultivo fecal y el ELISA en la detección de muestras positivas podría deberse a que al momento del estudio la mayor parte de los animales se encontraba en una etapa inicial de la enfermedad, eliminando

cantidades pequeñas de la bacteria, pero aún sin presencia de anticuerpos, o con una cantidad muy baja, insuficiente para desencadenar una reacción positiva a la prueba de ELISA. Esto coincidiría con lo expresado por Sweeney y col. (1995) y Whitlock y col. (2000), quienes afirman que los animales en estados tempranos de la enfermedad, aún si excretaran la bacteria en sus fecas, no necesariamente pueden ser detectados por la prueba de ELISA, ya que pueden pasar varios meses, o años, antes de que el nivel de anticuerpos circulantes sea suficiente para desencadenar una reacción positiva, permaneciendo la respuesta humoral bajo el límite de detección de las pruebas serológicas actualmente disponibles.

De los 10 rebaños en que se encontraron animales positivos (ya sea al cultivo fecal o a la prueba de ELISA), en 7 hubo animales positivos a las dos pruebas simultáneamente, coincidiendo plenamente, ambas pruebas, en que los predios 8, 9, 10 y 13 son los más infectados (Cuadro 6).

Aunque cuantitativamente hubo diferencias entre el cultivo fecal y la prueba de ELISA, esta prueba, al igual que el cultivo, detectó animales infectados en todas las categorías de edades (Cuadro 7); esto demuestra la utilidad de las pruebas serológicas de ELISA para el diagnóstico de la enfermedad, ya que a pesar de no ser capaces de detectar a todos los animales infectados, entregan una imagen clara de la magnitud de la enfermedad en un rebaño.

Los resultados serológicos obtenidos podrían interpretarse como poco favorables para la prueba de ELISA por haber detectado una menor cantidad de animales infectados; sin embargo, el análisis estadístico demostró que esta prueba tuvo un 32.5% de sensibilidad y 96.7% de especificidad con una mediana concordancia ($kappa = 0.37$) respecto del cultivo fecal (Cuadro 8). Estos resultados se ajustan bastante a lo expresado por algunos autores, quienes manifiestan que la sensibilidad de la prueba de ELISA, en promedio, es de un 45% con valores extremos de un 15% y 87% para animales con enfermedad subclínica con baja eliminación fecal y enfermos clínicos, respectivamente, con una especificidad diagnóstica promedio de 99%

(Sweeney y col., 1995; Stabel, 1998; Gasteiner y col., 2000).

El hecho de que sólo haya habido una mediana concordancia ($kappa = 0.37$) entre ELISA y cultivo fecal podría deberse a que la totalidad de los animales estaban clínicamente sanos y que la mayoría de los 40 animales que resultaron positivos al cultivo fecal presentó un bajo número de colonias en el medio de cultivo. Estas situaciones disminuyen la capacidad diagnóstica de las pruebas de ELISA, lo que explicaría que ambas pruebas sólo coincidieron en el diagnóstico positivo de 13 muestras (Cuadro 8). El análisis estadístico también reveló que hubo 7 muestras que sólo resultaron positivas al ELISA, situación que podría interpretarse como falsos positivos; sin embargo, la alta especificidad lograda por esta prueba permite asegurar que esta posibilidad sea en verdad poco probable (Cuadro 8). Estos resultados demuestran que al utilizar dos o más pruebas en forma simultánea para el diagnóstico de la Paratuberculosis bovina, es posible detectar una mayor cantidad de animales infectados de una sola vez, disminuyendo de esta forma el tiempo necesario para controlar y erradicar la enfermedad de un rebaño.

Los resultados obtenidos permiten concluir que mediante el uso simultáneo del cultivo fecal y la prueba de ELISA es posible detectar un mayor número de animales infectados, disminuyendo el tiempo necesario para controlar y erradicar la enfermedad. Además, debido a la baja sensibilidad y especificidad, el examen microscópico directo de fecas (tinción de Ziehl Neelsen) no debería usarse como método de diagnóstico de Paratuberculosis en animales asintomáticos.

RESUMEN

Se comparó la sensibilidad y especificidad del examen microscópico directo de fecas (tinción de Ziehl Neelsen), cultivo de fecas (Medio de Herrold Modificado) y un método serológico (ELISA) para el diagnóstico de Paratuberculosis bovina en 250 animales clínicamente sanos provenientes de 14 rebaños

infectados. Las muestras de fecas fueron examinadas simultáneamente mediante cultivo y baciloscopia y las cepas aisladas fueron identificadas mediante la técnica de PCR. Para el diagnóstico serológico se utilizó un kit comercial de ELISA (IDEXX), utilizando un lector fotométrico a 620 nm con un punto de corte de DO 0.25. El 71.4% (10) de los rebaños y 16.0% (40) de las muestras resultaron positivos al cultivo. Al examen microscópico directo sólo se obtuvieron resultados sospechosos en 35 muestras (14.0%), de las cuales sólo 6 (17.0%) correspondieron a muestras positivas al cultivo ($kappa$: 0.013). El examen serológico detectó un 8.0% (20) de animales reaccionantes, con una sensibilidad de 32.5% y especificidad de 96.7% ($kappa$: 0.366). Los resultados obtenidos demuestran la conveniencia de utilizar simultáneamente cultivo de fecas y serología para la detección de animales infectados subclínicamente y la inconveniencia de usar el examen microscópico directo como método de diagnóstico de Paratuberculosis en animales asintomáticos.

BIBLIOGRAFIA

- BLOOD, D. C., O. M. RADOSTITS, J. H. ARUNDEL, C. C. GAY. 1992. Enfermedades causadas por bacterias (IV). En: Medicina Veterinaria, Vol.1, capítulo 19, D.C.Blood y O.M.Radostits (eds.), 7ª ed. Nueva Editorial Interamericana, Atlapampa D.F. México. Pp. 851.
- CARTER, G. R. 1990. Staining Procedures. In: Diagnostic Procedures in Veterinary Bacteriology and Mycology. G. R.Carter and J. R. Cole, Jr. (eds.). 5th ed. Academic Press, Inc., San Diego, USA. Pp. 620.
- COLLINS, M. T. 1996. Diagnosis of Paratuberculosis. *Vet. Clin. North Amer. Food Anim. Pract.* 12: 357-371.
- COLLINS, M. T. 1999. Johne's Disease for busy veterinarians. School of Veterinary Medicine, University of Wisconsin, Madison, USA. Pp. 6.
- COLLINS, M. T., D. C. SOCKETT. 1993. Accuracy and economics of the USDA-licensed enzyme-linked immunosorbent assay for bovine paratuberculosis. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 203: 1456-1463. (original no disponible). Citado por Whitlock y col. 2000. *Vet. Microbiol.* 77: 387-398.
- GREEN, E. P., M. TIZARD, M. MOSS, J. THOMPSON, D. J. WINTERBOURNE, J. J. McFADDEN, J. HERMON-TAYLOR. 1989. Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Nucl. Acids Res.* 17: 9063-9073.
- GASTEINER, J., M. AWAD-MASALMET, W. BAUMGARTNER. 2000. *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* infection in cattle in Austria, diagnosis with culture, PCR and ELISA. *Vet. Microbiol.* 77: 339-349.
- GILMOUR, N. J. L. 1985. *Mycobacterium paratuberculosis*. In: Handbuch der Bakteriellen Infektionen bei Tieren. Tomo V, H. Blobel y T. Schliber (eds.). Ed. Gustav Fisher, Jena, Alemania. Pp. 658.
- HUTCHINSON, L. J. 1996. Economic Impact of Paratuberculosis. *Vet. Clin. North Amer. Food Anim. Pract.* 12: 373-381.
- JARK, U.; I. RINGENA; B. FRANZ; M. BEYERBACH; G. F. GERLACH. 1997. Development of an ELISA technique for serodiagnosis of bovine paratuberculosis. *Vet. Microbiol.* 57: 189-198.
- KALIS, C. H., W. HESSELINK, E. W. BARKEMA, M. T. COLLINS, I. J. VISSER. 1999. Factors influencing the isolation of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* from bovine fecal samples. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11: 345-351.
- KRUIZE, J., J. P. SOTO, S. LEIVA. 2001. Diagnóstico bacteriológico y serológico de Paratuberculosis bovina en rebaños lecheros del sur de Chile. Proc. XXIV Reunión anual SOCHIPA. Santiago, Chile. Pp. 532-533.
- LANDIS, J. R., G. G. KOCH. 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 33: 159-174.
- LWANGA, S. K., S. LEMESHOW. 1991. Determinación del tamaño de las muestras en los estudios sanitarios. Organización Mundial de la Salud. Ginebra, Suiza.
- MARTIN, S. W., A. H. MEEK, P. WILLERB. 1987. Veterinary Epidemiology, Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA. Pp. 343.
- MERKAL, R. S. 1971. Diagnostic methods for detection of paratuberculosis. Proc. 74th Annual Mtg. U.S. Animal Health Assoc. 620-623. (original no disponible). Citado por Gilmour 1985. Gustav Fisher, Jena, Alemania. Pp. 658.
- RIEMMANN, H. P., B. ABBAS. 1983. Diagnosis and Control of Bovine Paratuberculosis (Johne's Disease). *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 27: 481-506.

- SMITH, R. D. 1995. Veterinary Clinical Epidemiology. A problem-Oriented Approach. 2nd ed. Chapter 3: Evaluation of Diagnostic Tests. Pp. 31-52. CRC Press, Inc., Florida, USA. Pp 279.
- SOTO, J. P., J. KRUIZE, S. LEIVA. 2002. Aislamiento de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* de fecas en rebaños lecheros infectados mediante el Método de Cornell Modificado. *Arch. Med. Vet.* 34: 275-282.
- STABEL, J. R. 1998. Johne's Disease: A Hidden Threat. Symposium: Biosecurity and Disease. *J. Dairy. Sci* 81: 283-288.
- SWEENEY, R. W. 1996. Transmission of Paratuberculosis. *Vet. Clin. North Amer. Food. Anim. Pract.* 12: 305-312.
- SWEENEY, R.W.; R.H. WHITLOCK; C.L. BUCKLEY; P.A. SPENCER. 1995. Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbant assay for the diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7: 488-493.
- WHIPPLE, D. L., D. R. CALLIHAM, J. L. JARNAGIN. 1991. Cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal specimens and a suggested standardized procedure. *J. Vet. Diagn. Invest.* 3: 368-373.
- WHITLOCK, R. H., S. J. WELLS., R. H. SWEENEY, J. VAN TIEM. 2000. ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. *Vet. Microbiol.* 77: 387-398.
- ZIMMER, K., K. G. DRAGER., W. KLAWONN., R. G. HESS. 1999. Contribution to the Diagnosis of Johne's Disease in Cattle. Comparative Studies on the Validity of Ziehl-Neelsen Staining, Faecal Culture and a Commercially Available DNA-Probe Test in Detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in Faeces from cattle. *J. Vet. Med.* 46: 137-140.

