

Abanico Veterinario. Janeiro-Dezembro 2021; 11:1-13. <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2021.5>
Artigo Original. Recebido: 28/08/2020. Aceito: 15/01/2021. Publicado: 30/01/2021. Chave:2020-74.

Identificação de *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculose* e sua soroprevalência em rebanhos de ovelhas de Aguascalientes

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* identification and seroprevalence in sheep flocks in Aguascalientes

Pallás-Guzmán Gabriel¹ ID, Quezada-Tristán Teófilo¹ ID, Chávez-Gris Gilberto² ID, Maldonado-Castro Edith² ID, Chávez-González Leticia¹ ID, García-Munguía Carlos^{*3} ID

¹Centro de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma de Aguascalientes. Av Universidad 940, col. Ciudad Universitaria, CP 20131, Aguascalientes, Aguascalientes. México. ²Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (CEIEPAA), UNAM. Carretera Federal Tequisquiapan a, Ezequiel Montes Km 8.5, CP 76790, Tequisquiapan, Querétaro, México. ^{3*}Autor para la correspondência: García-Munguía Carlos, Departamento de Veterinaria y Zootecnia, Universidad de Guanajuato. Carretera Irapuato-Silao km 9, CP 36500 Irapuato, Guanajuato, México. cagamu@hotmail.com, gepallas@correo.uaa.mx, tequezada@correo.uaa.mx, gris@unam.mx, edithmc@unam.mx, lchavezglz@hotmail.com

RESUMO

Com o objetivo de identificar a presença da Paratuberculose (PTB), doença infecciosa causada pelo *Mycobacterium avium* ssp *paratuberculosis* (MAP), em ovinos, por meio de estudos patológicos, cultura bacteriana e PCR *IS900*, além de estimar a soroprevalência de MAP. O presente estudo transversal foi realizado em 16 rebanhos diferentes com soro de 2.415 animais adultos e analisado por Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Foram utilizados nove ovinos com sinais clínicos sugestivos de PTB, dos quais foram obtidas amostras para realização de estudos de identificação; obtenção de 51,3% dos animais soropositivos para MAP (1239/2415), em 100% dos rebanhos (16/16); isolamento bacteriano e sua identificação por PCR *IS900* em cinco dos nove casos encontrados (5/9) correspondendo a 31,25% dos rebanhos (5/16). Conformando a presença de *Mycobacterium avium* ssp *paratuberculosis*, bem como uma alta frequência de animais soropositivos para MAP em rebanhos de Aguascalientes.

Palavras-chave: Paratuberculose, ovinos, soroprevalência, *Mycobacterium*

ABSTRACT

With the objective of identifying the presence of Paratuberculosis (PTB), an infectious disease caused by *Mycobacterium avium* ssp *paratuberculosis* (MAP), in sheep, through pathological studies, bacterial culture and *IS900* PCR, as well as estimating seroprevalence to MAP. The present cross-sectional study, was conducted in 16 different flocks, with the serum of 2415 adult sheeps, and analyzed by Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA); nine sheep were used with clinical signs suggestive of PTB, from which samples were obtained for the identification studies; obtaining 51.3% of animals seropositive to MAP (1239/2415), in 100% of the herds (16/16). Bacterial isolation and its identification by PCR *IS900* were founded in five of the nine cases (5/9) corresponding to 31.25% of the herds (5/16). Confirming the presence of *Mycobacterium avium* ssp *paratuberculosis*, and a high frequency of seropositive animals to MAP in flocks of Aguascalientes.

Keywords: Paratuberculosis, sheep, seroprevalence, *Mycobacterium*.

INTRODUÇÃO

A paratuberculose (PTB) ou doença de Johne (JD), é uma doença infecciosa crônica que causa enterite granulomatosa em ruminantes e eventualmente em outras espécies, com ampla distribuição mundial; causada por *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculose* (MAP) (Coelho *et al.*, 2010). Classificada pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) como doença transmissível, com impacto socioeconômico e de saúde pública, sugerindo a participação da MAP na doença de Crohn em humanos (OIE, 2017; Balseiro *et al.*, 2019; Gioffré *et al.*, 2015). Foram descritas três cepas diferentes de MAP: tipo I (Ovinos), tipo II (Bovinos) e tipo III (Bisón ou intermediário), de acordo com sua preferência por infectar diferentes espécies de ruminantes e seus diferentes requisitos para o isolamento bacteriano (Begg o Whittington, 2010; Windsor, 2015). A doença é caracterizada por sinais de emagrecimento progressivo, edema submandibular e, eventualmente, morte dos animais. A principal via de infecção é fecal-oral, com período de incubação que varia dum a quatro anos, razão pela qual os sinais da doença podem ser observados a partir dum ano de vida (Chávez *et al.*, 2004), uma vez que a PAM entra no intestino, aloja-se em macrófagos, constituindo uma infecção granulomatosa onde podem ser observadas quantidades variáveis de bactérias (Begg o Whittington, 2010; Windsor, 2015). O diagnóstico, a prevalência e o impacto da doença são escassos e inconclusivos tanto na América Latina quanto no México (Chávez *et al.*, 2004; Begg o Whittington, 2010; Fernández *et al.*, 2014).

No México, foi detectada a presença de PTB em ovinos em vários estados do país, como San Luis Potosí, Guanajuato, Querétaro, Cidade do México, Estado do México e Veracruz (Estévez *et al.*, 2006). Particularmente, no Estado de Aguascalientes, a atividade ovinocultura, como em outros estados do país, cresceu desde 1990 em mais de 100%, com uma produção de carne de aproximadamente 612 toneladas em 2018, sendo a área do Vale composta dos municípios de Aguascalientes, San Francisco de los Romo, Rincón de Romos, Jesús María, Pabellón de Arteaga e Asientos, onde se concentram 85% da produção de carne ovina e da atividade pecuária do Estado em geral (SIAP, 2018).

É muito importante destacar que nesta região não há registros do diagnóstico e identificação das doenças que podem afetar os rebanhos ovinos e os efeitos adversos que podem causar na produtividade. Pois bem, no Estado de Aguascalientes existem casos não quantificados de animais adultos com emagrecimento e mortalidade progressivos, porém, não se faz o diagnóstico e é impossível determinar se há PTB.

Portanto, o objetivo deste trabalho é identificar a presença de MAP através de estudos patológicos, cultura e PCR em ovinos com quadro clínico sugestivo de PTB, bem como determinar a soroprevalência contra MAP por meio de ELISA em rebanhos ovinos de Aguascalientes Vale.

MATERIAL E MÉTODOS

Design de estudo

Este estudo transversal descritivo foi realizado no Estado de Aguascalientes, México, com os rebanhos e animais de estudo selecionados de acordo com o método não probabilístico "por conveniência" (Trusfield, 2018). Desta forma, foram selecionados 16 rebanhos ovinos com populações variando entre 60 e 340 indivíduos, perfazendo uma população total de estudo de 2.415 animais (Figura 1 e Tabela 1), onde o rebanho era obrigado a apresentar sinais clínicos de emagrecimento progressivo crônico sugestivo PTB em pelo menos um espécime com mais de um ano; considerando cada rebanho como uma unidade experimental.

Amostragem

Soro sanguíneo. 5 mL de sangue foram obtidos por punção venosa da jugular, que foi coletado em tubos sem aditivo para obtenção de soro; posteriormente as amostras foram armazenadas a -20 °C até a sua utilização no teste ELISA.

ELISA. Os soros obtidos anteriormente foram analisados por meio do ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) utilizando o antígeno protoplasmático PPA3 (Allied, Mo.), que possui especificidade de 75% e sensibilidade de 64% de acordo com o protocolo de [García \(1992\)](#).

Obtenção de amostras para estudo histopatológico e isolamento de PAM. Tomando Timoney (1988) como referência e observando a evolução clínica dos animais e as características epidemiológicas dos 9 rebanhos, foi estabelecido um diagnóstico presuntivo em 9 animais; que apresentavam sinais de emagrecimento progressivo, pelos ou lã pilosa, edema submandibular, lesões e fezes soltas. Assim, entendendo que 56,25% dos rebanhos do estudo apresentaram pelo menos um caso sugestivo ao PTB. Posteriormente, os 9 animais foram sacrificados com overdose de pentobarbital sódico ([NOM-033-SAG/ZOO-2014](#)) de acordo com as diretrizes estabelecidas no "Comitê de Ética para Uso de Animais no Ensino e Pesquisa da Universidade Autônoma de Aguascalientes".

A confirmação desses casos foi realizada por necropsia e identificação das lesões, afastando-se assim a presença de possíveis lesões sugestivas de diagnósticos diferenciais de pseudotuberculose (*Corynebacterium pseudotuberculosis*), alterações digestivas pela presença de corpos estranhos, neoplasias, pneumonias crônicas e graves parasitosis ([Straub, 2004](#); [Windsor, 2014](#)).

Em seguida, foram retiradas amostras de secções intestinais de íleo e jejuno, que mostraram espessamento da mucosa intestinal sugerindo lesões associadas à paratuberculose; Esses cortes foram fixados em formalina tamponada (pH 7,6) para posterior processamento histológico, utilizando-se as colorações de Hematoxilina-Eosina (HE) e Ziehl-Neelsen (ZN), esta última para demonstrar a presença de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) ([Estévez, 2006](#)). Da mesma forma, amostras para isolamento

bacteriano foram obtidas de seções de 30 cm do íleo e jejuno que apresentavam lesões sugestivas de PTB (Chávez *et al.*, 2004; Dennis *et al.*, 2011), sendo depositadas em recipientes plásticos estéreis para sua conservação a -20°C até o seu processamento em laboratório.

Cultura bacteriana do intestino. Por sua vez, amostras retiradas do intestino foram raspadas da mucosa intestinal com bisturi estéril, processando-as para descontaminação e concentração de micobactérias, conforme metodologia descrita por Sánchez o Guerrero, 2006. Posteriormente, o material da interface obtida foi inoculado nos meios de cultura Löwentein-Jensen (L-Jm) com micobactina, colocar três a oito gotas de cada uma das amostras, distribuindo-as por toda a superfície do meio. De cada amostra, dois tubos diferentes foram inoculados com meio L-Jm, um contendo micobactina e o segundo sem micobactina. Posteriormente foram incubados a 37 °C, mantendo-os em posição inclinada e sem umidade. O crescimento bacteriano foi verificado a cada quatro semanas até a semana doze, o meio onde nenhum crescimento foi observado, continuou em incubação até a semana 40 (De Juan *et al.*, 2006; Whittington, 2010).

PCR IS900. A identificação molecular foi realizada a partir do crescimento das colônias de MAP, por meio de PCR de ponto final, utilizando os iniciadores IS900P3N (5'-GGG TGT GGC GTT TTC CTT CG-3 ') e IS900P5N (5'-ATTCGCGCCACCGCCACG-3') (Chávez *et al.*, 2004).

Estimativa de soroprevalência. A prevalência foi estimada com base na proporção de animais positivos no teste ELISA, em relação à população total de animais adultos de cada um dos rebanhos. As informações geradas no estudo foram avaliadas e contrastadas por meio de testes de Estatística Descritiva, utilizando “Análise para uma variável”, com o apoio do pacote “Statgraphics Centurion XV”™ (Fernández *et al.*, 2002).

RESULTADOS

Soroprevalência. A porcentagem média de soroprevalência dos 16 rebanhos foi de 51,3%, com valor mínimo de 4,8% e valor máximo de 91,33% com intervalo de confiança de 95,0% para a média de: [32,7173, 62,3415]. Os resultados de soroprevalência individuais para cada rebanho estão descritos na Tabela 1. Nos dezesseis rebanhos em que foram realizados os testes ELISA (PPA-3), foram identificados casos positivos, obtendo-se uma soroprevalência calculada em “nível de rebanho” 100% (Tabela 1).

Estudo anatomopatológico. Nos 9 animais necropsiados apresentavam emagrecimento, lã ou pelos com pelos, edema submandibular (Figura 1), presença de ascite, degeneração gordurosa, além de aparente espessamento da mucosa intestinal no íleo e jejuno (Figura 2), além do aumento do tamanho dos linfonodos mesentéricos e de sua

fusão, não encontrando evidências de alterações ou lesões sugestivas de outra etiologia diferencial para os casos de TBP. Através do estudo histopatológico, foi possível observar em 8 dos 9 animais estudados (88,8%), a presença de enterite, linfadenite granulomatosa com presença de macrófagos, células gigantes e a presença de inúmeras Bactérias Ácido-Álcool (ABB) por coloração de Ziehl-Neelsen (ZN). Determinado como lesões multibacilares (Figura 3). Já em 1 dos 9 animais estudados (11,2%), foi observada a presença de lesões granulomatosas multifocais com baixo número de bacilos (BAAR) no interior dos macrófagos, coincidindo com lesão paucibacilar.

Tabela 1. Resultados de soroprevalência de paratuberculose (ELISA), autópsias realizadas e resultados de isolamento bacteriano, por rebanho no Vale de Aguascalientes

Número do rebanho	Soroprevalência %	Resultados positivos ELISA-PPA-3	Animais com mais de 1 ano	Amostras com sinais clínicos sugestivos de PTB/autópsia realizada	Isolamento bacteriano e PCR positivo	Localização por município
14	91.3	168	184	+1	-	Rincón de Romos
6	84.4	287	340	+1	+	Aguascalientes (sul)
3	76.3	122	160	+0	Nr	Rincón de Romos
11	73.1	117	160	+1	+	Asientos
10	64.4	125	194	+1	-	Jesús María
9	61.4	72	140	+1	+	Asientos
4	58.6	99	169	+1	+	Aguascalientes (sul)
15	56.8	50	88	+1	-	San Francisco de los Romo C
13	54.5	36	66	+0	Nr	Pabellón de Arteaga
16	46.7	56	120	+0	Nr	Aguascalientes (centro)
1	43.8	35	80	+1	-	Jesús María
8	28.3	17	60	+0	Nr	Pabellón de Arteaga
5	12.9	8	62	+0	Nr	Aguascalientes (Nte)
7	9.5	31	326	+0	Nr	Aguascalientes (sul)
12	8.1	8	99	+0	Nr	San Francisco de los Romo
2	4.8	8	167	+1	+	San Francisco de Los Romo
16	51.3	1239	2415	16/9		TOTAL

Nr: Não realizado



Figura 1. Ovelhas com sinais de emagrecimento e edema submandibular sugestivos de PTB

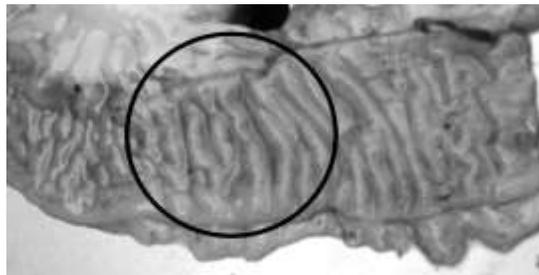


Figura 2. Lesões macroscópicas correspondentes a espessamento intestinal característico de enterite granulomatosa

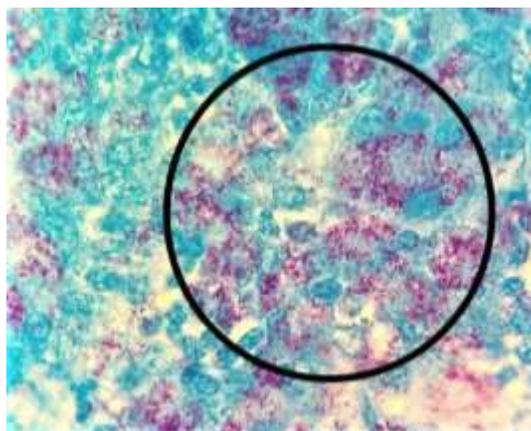


Figura 3. Lesões histopatológicas de ID multibacilar, coloração de Ziehl-Neelsen 400X onde vários BRAs são observados na mucosa intestinal

Isolamento bacteriano. Após 12 semanas de incubação, em 5 casos (55,5%), observou-se o desenvolvimento de colônias amarelas, cremosas, convexas e circulares características de MAP em meio L-Jm adicionado de micobactina. Enquanto em 4 dos casos (44,5%), nenhum desenvolvimento de colônia foi observado até a semana 40. Todos os meios que não foram adicionados com micobactina não apresentaram crescimento.

PCR IS900. Dos cinco isolados bacterianos obtidos, foram obtidos produtos de amplificação da sequência IS900 correspondente a 310 pares de bases (pb), confirmando a presença de MAP desses isolados obtidos (Figura 4).

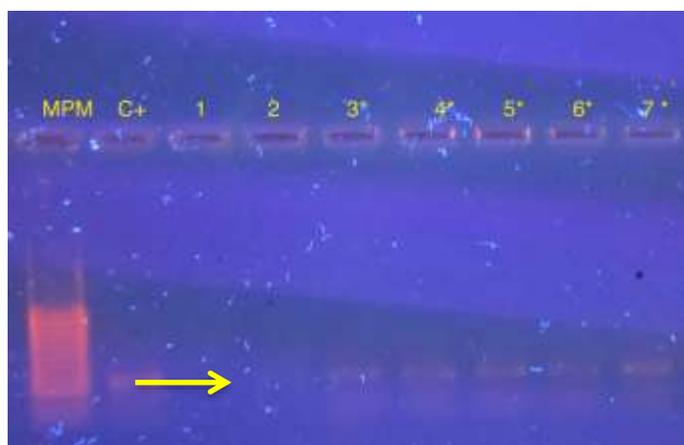


Figura 4. Fotografia de gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio. Onde produtos de amplificação com um tamanho de 310 bp são observados, a partir de DNA de colônias bacterianas obtidas de tecido intestinal, onde o marcador de peso molecular 100 bp, C + controle positivo, controle negativo pista 1 (água), pistas 3 a 7 produto de amplificação obtido dos isolados 03, 04, 05, 06 e 09, que correspondem a um fragmento de inserção *IS900* de MAP (*).

Assim, em 100% da amostra (16 rebanhos do estudo) foi obtida soropositividade de MAP; por sua vez, em 31,25% da amostra (5 rebanhos) a presença de PAM foi confirmada pelo isolamento bacteriano e identificação por PCR *IS900* dos animais que apresentavam sintomas clínicos no momento do estudo (Tabela 2).

Tabela 2. Resultados obtidos "Por rebanho" correspondentes aos diferentes métodos de diagnóstico e identificação utilizados

Soropositividade para MAP	Animais com sinais e lesões de necropsia sugestivos de PTB	Isolamento bacteriano de lesões no intestino delgado e PCR <i>IS900</i> positivo
16/16	9/16	5/16
100%	56.25%	31.25%

DISCUSSÃO

A média da soroprevalência obtida no presente estudo (51,3%) é relatada como elevada, se comparada a outros estudos realizados para mensurar a prevalência tanto no país quanto no mundo, considerando que a doença internacionalmente tem alta prevalência em diferentes espécies de ruminantes, com 20 % e até 40% ([Whittington et al., 2019](#)). No México, vários estudos indicam evidências sorológicas para PAM, como os relatados por [Jaimes et al., \(2008\)](#) em San Luis Potosí, México; onde a soroprevalência resulta em ovelhas pelo método de imunodifusão em ágar-gel foi de 44%. Já no estado de Nayarit, 28,94% foi reportado em ovinos, por meio de testes ELISA ([Mejía et al., 2015](#)). Na América Latina, poucos estudos realizados em ovinos mostram uma grande variabilidade na prevalência de MAP, onde prevalências de uma média de 4,3% em ovinos são relatadas ([Fernández et al., 2014](#)), a 54,08% de soroprevalência de MAP em ovinos em Brasil, ([Medeiros et al., 2012](#)).

Tendo em vista os poucos estudos e uma grande variação em relação à metodologia e ao teste diagnóstico utilizado para avaliar a prevalência de PTB, [Espechit et al. \(2017\)](#) e [Whittington et al., \(2019\)](#) apontam que isso resulta numa grande variabilidade dos resultados e, conseqüentemente, uma subestimação da presença e real impacto da paratuberculose.

Apesar dos resultados de alta frequência obtidos, no momento do estudo, apenas casos clínicos (9/16) foram encontrados em 56,25% dos rebanhos estudados, onde todos apresentavam lesões histopatológicas multibacilares ou paucibacilares, características da doença., Onde se for considerado que ocorrem em indivíduos maiores de um ano de idade, com tempo prolongado de infecção aliado à apresentação de um quadro clínico característico, altamente sugestivo de PTB, podem ser considerados como diagnóstico definitivo de PAM individualmente, dificilmente descartado por outros testes, como cultura e PCR, conforme mencionado por vários autores ([Pérez et al., 1999](#); [Dennis et al., 2011](#); [Windsor, 2015](#); [Whittington et al., 2019](#)).

Considerando que os nove animais necropsiados apresentavam lesões características de TBP, apenas em 55,5% (5/9) o isolamento bacteriano foi realizado apesar de apresentarem lesões multibacilares em oito dos nove. A dificuldade de isolar o MAP, meio de cultura utilizado considerando a possível variação do tipo de MAP presente, "S" ou "C", que apresentam diferença nas exigências nutricionais para o crescimento ([Elguezabal et al., 2011](#); [Whittington, 2011](#); [Stevenson, 2015](#); [Whittington et al., 2019](#)), ou no momento do processo de descontaminação bacteriana, onde o número de bactérias viáveis para cultivo e isolamento pode ser reduzido. O isolamento e cultivo do microrganismo em ovinos é extremamente difícil, sendo em rebanhos ovinos que a cultura fecal detecta menos do que casos clínicos e requer mais de 12 meses para incubação, conforme relatado por [Windsor \(2015\)](#), bem como [Whittington, 2010](#).

A posterior confirmação e identificação dos isolados obtidos de MAP por meio de PCR *IS900*, realizada a partir das cinco culturas obtidas, confirmou a presença de MAP.

Atualmente, alguns autores sugerem que a identificação da bactéria por PCR seja realizada a partir de amostras obtidas dos tecidos, agilizando o tempo dos resultados, sem depender diretamente das culturas obtidas, visto que os tempos de diagnóstico são prolongados pelas características do MAP isolamento, indicando que este teste tem uma eficácia semelhante com culturas (Kawaji *et al.*, 2007; Nilsen *et al.*, 2008; Whittington *et al.*, 2019).

Segundo autores como Kumthekar, *et al.*, (2013) e Konbon (2018), determinar o grau de infecção da doença em rebanhos permite estabelecer programas de controle adequados que impactam significativamente no custo-benefício; considerando principalmente a sucata de teste. Pois bem, dada a inviabilidade do descarte e considerando a limitada disponibilidade de alguns produtores para a vacinação dos rebanhos, as medidas de controle devem ser enquadradas no sentido de um fortalecimento da biossegurança. Considerando-se assim a separação precoce dos cordeiros e a eliminação dos animais com sinais clínicos iniciais da doença, pode ser uma medida que impacta positivamente na redução da prevalência da doença (Robee, 2011; Windsor 2015). Ressaltando que os profissionais do setor de saúde animal e as lideranças do setor produtivo têm um conhecimento claro do grau de presença e impacto da doença, tanto clínica, quanto econômica e de saúde pública; alcançando assim propostas de controle (Roche, 2015; Windsor, 2015; Wittington *et al.*, 2019)

CONCLUSÃO

A presença de *Mycobacterium avium* ssp *paratuberculosis* é confirmada como agente etiológico da doença clínica, além de se-observar a presença de alta frequência de animais soropositivos para MAP, em rebanhos do Vale Central do estado de Aguascalientes, México. O que o torna uma patologia de alto impacto na ovinocultura no estado.

LITERATURA CITADA

BALSEIRO A, Perez V, Juste R. 2019. Chronic regional intestinal inflammatory disease: A trans-species slow infection. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 62:68-100. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2018.12.001>

BEGG D, Whinttington R. 2010. *Paratuberculosis in Sheep*. In: *Paratuberculosis, Organism, Disease, Control*. United Kingdom. CAB International. Pp.157-168. <http://doi.org/10.1079/9781845936136.0157>

CHÁVEZ G, Trigo TF, Svastova P, Pavlik P. 2004. Identificación del polimorfismo genético de aislamientos de *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* de caprinos del centro de México. *Veterinaria México*. 35:75-84. <https://www.redalyc.org/pdf/423/42335107.pdf>

COELHO AC, Pinto ML, Coelho AM, Aires A, Rodríguez J. 2010. A seroepidemiological survey of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in sheep from North of Portugal. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 30(11):903-908.

<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2010001100001>

DENNIS M, Reddacliff LA, Whittington RJ. 2011. Longitudinal study of clinicopathological features of Johne's diseases in sheep naturally exposed to *Mycobacterium avium* subs *paratuberculosis*. *Veterinary. Pathology*. 48:565-575.

<http://dx.doi.org/10.1177/0300985810375049>

DE JUAN L, Álvarez J, Romero B, Bezos J, Castellanos E, Aranaz A, Mateos A, Domínguez L. 2006. Comparison of four different culture media for isolation and growth of type II and type I/III *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains isolated from cattle and goats. *Applied and Environmental Microbiology*. 72:5927-5932.

<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00451-06>

ELGUEZABAL N, Bastida F, Sevilla IA, González N, Molina E, Garrido JM, Juste RA. 2011. Estimation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Growth Parameters: Strain Characterization and Comparison of Methods. *Applied and Environmental Microbiology*. 77: 8615-8624.

<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.05818-11>

ESPESCHIT IF, Schwarz GG, Faria CS, Souza CC, Paolicchi FA, Juste RA, Carvalho IA, Moreira AS. 2017. Paratuberculosis in Latin America: a systematic review. *Tropical Animal Health and Production*. 49:1557-1576. <http://dx.doi.org/10.1007/s11250-017-1385-6>

ESTÉVEZ DI, Hernández CR, Trujillo AM, Chávez GG. 2006. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in goat and sheep flocks in México. *Small Ruminant Research*. 72:209-213. <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.10.017>

FERNANDEZ SJ, Correa NM, Fernando RN. 2014. Systematic review of the prevalence of Paratuberculosis in cattle, sheep, and goats in Latin America and the Caribbean. *Tropical Animal Health and Production*. 46:1321-1340. <http://dx.doi.org/10.1007/s11250-014-0656-8>

FERNANDEZ SF, Sánchez JM, Córdoba A, Largo AC. 2002. *Estadística descriptiva*. 2^{da} ed. Madrid, España: Editorial Esic. Pp. 566. ISBN: 978-847-35630-62

GARCÍA MJ, Chávez G, Adúriz JJ, Pérez V, Juste RA, Badiola JJ. 1992. Prevalence of paratuberculosis in infected goat flocks and comparison of different methods of diagnosis. Proc. III Int. Coll. PTBC. 157-163. <http://www.paratuberculosis.net/publications.php>

GIOFFRÉ A, Correa MM, Alvarado PM, Vaca R, Morsella C, Fiorentino MA, Romano MI. 2015. Tipificación molecular de *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis mediante análisis de repetición en tándem de número variable de múltiples locus. *Revista Brasileira de Microbiología*. 46:2: 557-564. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246220140283>

JAIMES NG, Santillán FM, Hernández CO, Córdova LD, Guzmán RC, Arellano RB, Díaz AE, Tenorio GV, Cuéllar OA. 2008. Detección de *Mycobacterium avium* subespecie paratuberculosis, por medio de PCR-anidada a partir de muestras de heces de ovinos. *Revista Veterinaria México*. 39(4): 377–386. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=42339402>

KAWAJI S, Taylor DL, Mori Y, Whittington RJ. 2007. Detection of *Mycobacterium Avium* Subsp. *paratuberculosis* in ovine faeces by direct quantitative PCR has similar or greater sensitivity compared to radiometric culture. *Veterinary Microbiology*. 125:36-48. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.05.002>

KONBOON M, Bani YM, Pithua PO, Rhee N, Aly SS. 2018. A nested compartmental model to assess the efficacy of paratuberculosis control measures on US dairy farms. *PLoS One*. 13:10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203190>

KUMTHEKAR S, Manning EJ, Ghosh P, Tiwari K., Sharma RN, Hariharan H. 2013. *Mycobacterium avium* subespecie paratuberculosis confirmada tras la vigilancia serológica de pequeños rumiantes en Granada, West Indies. *Revista de investigación de diagnóstico veterinario*. 25(4): 527-530. <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1040638713490688>

MEDEIROS JM, Garino JF, Torres MR, de Medeiros CV, Riet CF. 2012. Frequência de anticorpos para paratuberculose em bovinos no semiarido paraibano. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 32:697-700. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2012000800003>

MEJÍA MK, Lemus FC, González MC, Palomares RG, Díaz AE, Gutierréz HJ. 2015. Factores de riesgo asociados a *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* en rebaños ovinos de Nayarit, México. *Revista Científica FCV-LUZ*. 5:294-302. <https://www.redalyc.org/pdf/959/95953315005.pdf>

NIELSEN SS, Toft N. 2008. Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: A review of accuracies of ELISA, interferon-gamma assay and fecal culture techniques. *Veterinary Microbiology*. 129:217-235. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.12.011>

NOM-033-SAG/ZOO-2014. *Norma Oficial Mexicana: Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres*. México. Diario Oficial de la Federación, 26/08/2014. https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5405210&fecha=26/08/2015

OIE (World Organisation for Animal Health). 2017. Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals Vol I. Recuperado en noviembre de 2017. <http://www.oie.int/es/normas-internacionales/manual-terrestre/acceso-en-linea/>

PÉREZ V, Tellechea J, Corpa JM, Gutiérrez M, García MJ. 1999. Relation between pathologic findings and cellular immune responses in sheep with naturally acquired Paratuberculosis. *American Journal of Veterinary Research*. 60:123-127. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9918160/>

ROCHE S, Jones BA, Meehan M, Massow M, Kelton D. 2015. Evaluating the effect of focus farms on Ontario dairy producers' knowledge, attitudes, and behaviour toward control of Johne's disease. *J Dairy Sci*. 98:5222–040. <https://doi:10.3168/jds.2014-8765>

ROBBE AS. 2011. Control of Paratuberculosis in Small Ruminants. *Vet Clin Food Anim*. 27:609–620. <https://doi:10.1016/j.cvfa.2011.07.007>

SÁNCHEZ CC, Guerrero GC. 2006. *Procedimientos en microbiología clínica*. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. ISBN: 84-609-2287-1. <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia1.pdf>

SIAP (Servicio De Información Agroalimentaria Del Gobierno De México). 2018. Estadísticas de la producción pecuaria 2018. Recuperado en septiembre de 2018. <http://infosiap.siap.gob.mx/gobmx/datosAbiertos.php>

STEVENSON K. 2015. Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis and the influence of strain type on infection and pathogenesis: a review. *Veterinary Research*. 46:64. <http://dx.doi.org/10.1186/s13567-015-0203-2>

STRAUB OC. 2004. Maedi–Visna virus infection in sheep. History and present knowledge. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 27:1-5. [https://doi.org/10.1016/S0147-9571\(02\)00078-4](https://doi.org/10.1016/S0147-9571(02)00078-4)

TIMONEY JF, Gillespie JH, Scott FW, Barlough JE. 1988. *Hagan and Bruner's Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals*. Ithaca, United States: Cornell University Press. Pp. 912. ISBN: 9780-801-41896-9.

TRUSFIELD M. 2018. *Veterinary Epidemiology*. 4^{ta} ed. UK: Blackwell publishing. Pp. 888. ISBN: 978-1-118-28028-7.

WHITTINGTON RJ. 2010. *Cultivation of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*. 2^{da} ed. Wallingford, UK. Editorial Cabi. Pp. 266-304. ISBN: 978-1-789-24341-3.

WHITTINGTON RJ, Marsh IB, Saunders V, Grant IR, Juste R, Sevilla IA, Manning EJ, Whitlock RH. 2011. Culture phenotypes of genomically and geographically diverse *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from different hosts. *Journal of Clinic Microbiology*. 49:1822-1830. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00210-11>

WHITTINGTON RJ, Donat K, Weber MF. 2019. *Control of paratuberculosis: who, why and how. A review of 48 countries*. *BMC Veterinary Research*. 15:198. <http://dx.doi.org/10.1186/s12917-019-1943-4>

WINDSOR PA. 2014. Managing control programs for ovine caseous lymphadenitis and paratuberculosis in Australia, and the need for persistent vaccination. *Veterinary Medicine: Research and Reports*. 5:11–22. <https://doi.org/10.2147/VMRR.S44814>

WINDSOR PA. 2015. Paratuberculosis in sheep and goats. *Veterinary Microbiology*. 181:161-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.07.019>