




Original

Detección de anticuerpos anti-*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en bovinos de hatos lecheros de trópico bajo en los departamentos de Sucre y Córdoba, Colombia

Nathalia Correa-Valencia¹  M.Sc; Ferney Arango L²  MV; Jorge A. Fernández-Silva^{1*}  Dr.Med.Vet.

¹Universidad de Antioquia, Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela de Medicina Veterinaria, Grupo Centauro, Colombia.

²Universidad de Antioquia, Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela de Medicina Veterinaria, Colombia.

*Correspondencia: jorge.fernandez@udea.edu.co

Recibido: Septiembre 2019; Aceptado: Febrero 2020; Publicado: Julio 2020.

RESUMEN

Objetivo. Reportar la frecuencia de la seropositividad a *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) y explorar los factores asociados al resultado positivo, tanto a nivel de hato como de animal. **Materiales y métodos.** Se llevó a cabo un estudio transversal en 204 vacas lecheras resultado del cruce de diferentes razas, en cinco hatos de zonas de trópico bajo ubicadas en tres municipios de los departamentos de Sucre y Córdoba (Colombia) en 2018. Los animales fueron seleccionados aleatoriamente y se colectaron muestras de sangre de cada uno. Se utilizó un kit comercial de ELISA para analizar los sueros. La información con respecto a los factores relacionados con los hatos y los animales se recopiló mediante cuestionarios. Se calcularon las estadísticas descriptivas para todas las variables (i.e. tamaño del hato, presencia de otros rumiantes en co-pastoreo con el ganado bovino en los últimos 2 años, edad de los animales, paridad y días desde el último parto), y se exploró la asociación entre dichas variables y el resultado a ELISA ($p < 0.05$). **Resultados.** El 17.2% (35/204; IC 95%: 12.0-22.3%) de las vacas resultaron positivas a MAP mediante la prueba de ELISA, y los cinco hatos tenían animales seropositivos. La variable a nivel de hato presencia de otros rumiantes en co-pastoreo con el ganado bovino en los últimos 2 años y las variables a nivel de animal *edad* y *paridad* se encontraron asociados con los resultados positivos de ELISA. **Conclusiones.** El presente estudio encontró que el 17.2% de las vacas y el 100% de los hatos fueron positivos a MAP mediante la prueba de ELISA. Adicionalmente se identificaron variables asociadas que pueden ser de interés tanto para los productores como para los veterinarios de animales de producción, y orientar su enfoque para el manejo de la enfermedad.

Palabras clave: Epidemiología, ganado, serología (*Fuente: National Agricultural Library Thesaurus*).

ABSTRACT

Objective. To report the frequency of seropositivity against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) and to explore the factors associated with the positive outcome, both at herd and animal level. **Materials and methods.** A cross-sectional study was carried out on 204

Como citar (Vancouver).

Correa-Valencia N, Arango LF, Fernández-Silva J. Detección de anticuerpos anti-*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en bovinos de hatos lecheros de trópico bajo en los departamentos de Sucre y Córdoba, Colombia. Rev MVZ Córdoba. 2020; 25(2):e1782. <https://doi.org/10.21897/rmvz.1782>



©El (los) autor (es), Revista MVZ Córdoba 2020. Este artículo se distribuye bajo los términos de la licencia internacional Creative Commons Attribution 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>), que permite a otros distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir de su obra de modo no comercial, siempre y cuando den crédito y licencien sus nuevas creaciones bajo las mismas condiciones.

dairy cows, result of the crossing of different breeds, from five low-tropic dairy herds, located in three municipalities of the Provinces of Sucre and Córdoba (Colombia) in 2018. The animals were randomly selected, and blood samples were collected from each one. A commercial ELISA kit was used to analyze the sera. Information regarding factors related to herds and animals was collected through questionnaires. Descriptive statistics were calculated for all variables (i.e. herd size, presence of other ruminants co-grazing with cattle in the last 2 years, age of the animals, parity, and days since the last birth), and the association between these variables and the result to ELISA ($p < 0.05$) was explored. **Results.** The 17.2% (35/204; 95% CI: 12.0-22.3%) of the cows were positive for MAP by the ELISA test, and the five herds had seropositive animals. The herd-level variable *presence of other ruminants in co-grazing with cattle in the last 2 years* and the animal-level variables *age* and *parity* were associated with the positive ELISA results. **Conclusions.** The present study found that 17.2% of the cows and 100% of the herds were MAP positive by the ELISA test. Additionally, associated variables were identified and may be of interest to both producers and veterinarians of production animals, guiding their approach to disease management.

Keywords: Epidemiology, cattle, serology (Source: National Agricultural Library Thesaurus).

INTRODUCCIÓN

La paratuberculosis (PTB) o la enfermedad de Johne es una enfermedad infecciosa crónica que afecta a rumiantes domésticos y salvajes, caracterizada por una pérdida de peso progresiva y la presencia de diarrea crónica. La PTB causa emaciación y finalmente, la muerte del animal. La enfermedad es producida por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), bacteria que desencadena una enteropatía granulomatosa en los animales afectados, que resulta en una mala absorción de nutrientes esenciales, pérdida de proteínas y, en consecuencia, el cuadro clínico descrito. La bacteria se elimina a través de las heces y leche de los animales afectados, especialmente en las etapas avanzadas de la enfermedad (1). El principal mecanismo de transmisión es la vía fecal-oral, pero también se ha informado la transmisión intrauterina (2). MAP también se ha asociado con la enfermedad intestinal inflamatoria humana conocida como enfermedad de Crohn (3,4).

La enfermedad tiene una fase subclínica inaparente que puede durar años. Los animales generalmente se infectan a una edad temprana, con signos clínicos que se manifiestan en la etapa productiva (5,6). El impacto negativo de la infección es importante debido a su efecto en la economía de las granjas, expresado en la disminución de la producción de leche, la reducción de la vida productiva de la vaca y la predisposición a otras patologías (6).

Distribuido en todo el mundo (1), la PTB se considera actualmente una enfermedad emergente a pesar de su reconocimiento por más de un siglo (1895) (7). Estudios anteriores han

identificado una serie de factores que pueden influir en el estatus de MAP. La mayoría de estos estudios se han llevado a cabo considerando el hato como unidad de análisis, y han utilizado los resultados serológicos para establecer el diagnóstico de MAP en los animales, así como la posterior identificación de los factores asociados (8). En Colombia, la PTB fue reportada por primera vez en ganado bovino en 1924 (9). Desde entonces, la enfermedad se ha explorado principalmente en el ganado bovino y ovino, con algunos estudios enfocados en la detección del agente y en la estimación de prevalencia local, fundamentalmente en sistemas lecheros especializados (9,10), pero hasta el momento no hay información epidemiológica sobre MAP en lecherías del bajo trópico en el país.

En el ganado tropical, los sistemas de producción múltiple coexisten en diferentes pisos térmicos, diferentes grados de intensificación y se ubican en entornos socioeconómicos de naturaleza muy diversa, en los cuales la producción sostenible y competitiva de proteínas de origen animal es posible, gracias en gran parte al uso de razas bovinas adaptadas a las condiciones climáticas, económicas y de gestión propias de cada región (11).

Uno de ellos es el sistema de producción de lácteos del trópico bajo, que se define como un sistema de manejo en el cual se produce la leche de bovinos con biotipos europeos cruzados, considerando que solo la vaca, y no su cría, constituye la unidad de producción durante la lactancia. Por lo tanto, los beneficios definidos por el engorde de los terneros no son representativos para el hato, a diferencia de lo que se ve en los sistemas de doble propósito (12). En Colombia, este sistema se caracteriza por la presencia de

pequeños y medianos productores con recursos físicos, técnicos y financieros muy limitados y, a menudo, ubicados en áreas de producción marginal (13).

La producción de carne y leche en el país se fundamenta básicamente en este tipo y en sistemas de doble propósito, que representan aproximadamente el 80.5% del inventario nacional total de ganado, y contribuyen con el 50 y el 70% de la leche y la carne colombiana a los mercados internos, respectivamente (14).

Debido a la representatividad de este sistema productivo en el país, el objetivo del presente estudio es reportar la frecuencia de la seropositividad a MAP y explorar los factores, tanto a nivel de hato como de animal, que podrían estar asociados con el estatus seropositivo de 204 vacas de cinco hatos lecheros del trópico bajo, ubicados en el departamento de Sucre, Colombia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Consideraciones éticas. El comité de ética para la experimentación con animales (CEEA) de la Universidad de Antioquia, Colombia (Ley número 111, junio de 2018) aprobó el presente estudio (Acta #118, junio 5 de 2018).

Diseño y población de estudio. Se realizó un estudio de tipo transversal, utilizando un muestreo a conveniencia. El ganado de cinco hatos lecheros del trópico bajo, ubicados en tres veredas diferentes de tres municipios de los departamentos de Sucre y Córdoba (Colombia) se seleccionó al azar para la toma de muestras, con la posterior detección de anticuerpos anti-MAP. La altitud del área de estudio se encuentra entre los 44 y 117 m.s.n.m., correspondiente a

una región montañosa baja tropical, según la clasificación de zonas de vida de Holdridge (15).

El clima del departamento de Sucre está determinado principalmente por la posición geográfica y por su relieve. El tipo de clima predominante en el norte y centro del departamento es cálido- semiárido, mientras hacia el sur es de tipo cálido semi-húmedo y húmedo. Los diversos relieves del departamento son de piso térmico cálido con temperaturas que oscilan entre 25.5 y 28.7°C en promedio anual (16). El clima del departamento de Córdoba está igualmente determinado por la posición geográfica y por su relieve. El territorio departamental está conformado en un 60% por la Gran Llanura del Caribe y el restante por las últimas estribaciones de la cordillera de los Andes dando lugar a que se presenten diferentes climas. El 96% del territorio corresponde al piso térmico cálido, el 3% corresponde a piso térmico templado, y el 1% a piso térmico frío. La mayor parte del departamento registra temperaturas entre 26 y 28°C (17).

Los animales analizados en cada hato fueron seleccionados al azar y asignados proporcionalmente, de acuerdo con el peso específico de cada hato en la población en cuanto a la población de vacas con una edad igual o superior a 2 años (Tabla 1).

Se colectaron muestras de sangre de la vena coccígea. Después de permitir la retracción del coágulo de sangre a temperatura ambiente, el suero se separó inmediatamente mediante centrifugación a 2.000 rpm durante 5 min. Las muestras de suero se refrigeraron a 4°C hasta su llegada al laboratorio (Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia), donde se congelaron a -20°C hasta el análisis, realizado 8 días después.

Tabla 1. Resultados de ELISA para *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en suero de vacas de cinco hatos lecheros del trópico bajo, departamentos de Sucre y Córdoba (Colombia).

Hato	Departamento	Municipio	Distrito	Población total de vacas \geq 2 años de edad*	Peso muestral (%)	Animales muestreados	Animales positivos
1	Sucre	Sincelejo	Laguna flor	307	51.4	105	12
2	Sucre	Sampués	San Luis	55	9.2	19	9
3	Sucre	Sampués	San Luis	89	15	31	4
4	Sucre	Sampués	San Luis	81	13.6	28	8
5	Córdoba	Chinú	Nuevo oriente	65	10.8	21	2
Total				597	100	204	35

*Información obtenida a partir del administrador de los hatos.

Prueba de inmuno-ensayo ligado a enzimas (ELISA). Las muestras de suero se analizaron mediante la prueba comercial Cattletype® para MAP (Qiagen Leipzig GmbH, Leipzig, Alemania), kit de ELISA indirecto con pre-absorción, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los resultados se consideraron como válidos si el valor medio (MV) del valor de OD medido para el control positivo era ≥ 0.7 , y si el MV del valor de OD medido para el control negativo era ≤ 0.2 . Un animal se consideró positivo a ELISA en una proporción de muestra positiva (S/P%) ≥ 0.4 según lo recomendado por el fabricante. La sensibilidad (Se) y especificidad (Sp) reportadas para el kit comercial utilizado son del 60-85 y 99%, respectivamente.

Recopilación de información y análisis de datos. Se aplicó un cuestionario semiestructurado al administrador de los hatos en el momento de la toma de las muestras. El mismo investigador (NC) aplicó el cuestionario en los tres hatos.

Todos los cuestionarios incluían un párrafo introductorio que explicaba la razón y la importancia de las preguntas, cómo se utilizarían los datos y un acuerdo de confidencialidad y anonimato.

Las variables a nivel de hato consideradas incluyeron *tamaño del hato* (número de vacas en producción al momento del muestreo) y *presencia de otros rumiantes en copastoreo con el ganado bovino en los últimos 2 años* (i.e. cabras, ovejas, búfalos). Las variables a nivel de animal consideradas fueron a saber, *edad* (en meses), *paridad* y *días desde el último parto*.

La información colectada durante el estudio se ingresó en hojas de cálculo de Excel (Microsoft Corp., Redmond, WA, EE. UU.) y luego fue exportada a Stata 14.0 (StataCorp, 2017, Texas, EE. UU.) para su análisis estadístico. Se calcularon las estadísticas descriptivas para todas las variables, tanto a nivel de hato como de animal, y se exploró la asociación entre dichas variables y el resultado desde la prueba de ELISA para MAP mediante la prueba de *chi-cuadrado* de Pearson y prueba de Fisher ($p < 0.05$).

RESULTADOS

Los hatos del estudio pertenecían al mismo propietario y eran administrados por el mismo personal, compartiendo varias prácticas de manejo y genética (biotipos cruzados europeos),

sin razas predominantes. La estrategia de cruce de razas para todos los hatos es conservar la proporción F1 (*Bos indicus* × *Bos taurus*) y, según una evaluación fenotípica de rutina, las hembras son programadas reproductivamente con biotipos orientados a *B. taurus* o *B. indicus*.

Los cinco hatos estaban geográficamente cercanos y había un flujo activo de animales entre ellos, por lo que todos se consideran como hatos abiertos. Como práctica de manejo, las crías son destetadas a los 9 meses de edad; sin embargo, están en contacto directo con sus madres desde su nacimiento, y durante todas las mañanas siguientes, considerando que, por la noche, están alojados en espacios separados. No existe un registro diario de leche, ya que las vacas amamantan a sus crías por la mañana. Los cinco hatos se encontraban certificados como libres de brucelosis, pero no certificados como libres de tuberculosis, ni inscritos en programas de buenas prácticas de ganadería (BPG) al momento del muestreo.

Se requirió de una explicación de los investigadores al personal administrativo y encargado de los animales acerca de los síntomas compatibles con la PTB en bovinos (i.e. diarrea y pérdida de peso progresiva, refractaria al tratamiento), dado que no habían oído hablar de la enfermedad antes, ni siquiera reconocían el nombre. Entonces, y de acuerdo con el administrador, ninguno de los hatos ha presentado casos clínicos compatibles con la PTB hasta el momento del muestreo.

Se colectaron muestras de sangre de 204 vacas de ≥ 2 años de edad. A la prueba de ELISA se encontró que el 17.2% (35/204; IC 95%: 12.0-22.3%) y 82.8% (169/204; IC 95%: 77.7-88%) de las muestras resultaron positivas y negativas a MAP mediante ELISA, respectivamente. En los cinco hatos, ELISA detectó al menos un animal seropositivo. Los resultados serológicos por hato para la población de estudio se muestran en la tabla 1.

El promedio de *tamaño de hato* para la población de estudio fue de 92,6 animales (55-179 vacas en producción). Al análisis estadístico se encontró que dicha variable no se encontraba asociada al estatus serológico para MAP ($p=0.36$). Por su parte, la variable *presencia de otros rumiantes en copastoreo con el ganado bovino en los últimos 2 años* se encontró como asociada con la seropositividad a MAP por ELISA ($p=0.020$). Es importante enfatizar que el hato 1 fue el único con ovejas de carne que compartían espacios con los terneros durante la noche, desde el nacimiento

de los mismos hasta que los terneros tenían 3 meses de edad. Un resumen descriptivo de las variables cuantitativas a nivel animal evaluadas se muestra en la tabla 2. De las tres variables analizadas, dos se encontraron como asociadas significativamente con la seropositividad a MAP (i.e. *edad*, *paridad*; $p \leq 0.05$).

Tabla 2. Resumen descriptivo de las variables a nivel de animal evaluadas en cinco hatos lecheros del trópico bajo, departamentos de Sucre y Córdoba (Colombia), y su asociación con los resultados de ELISA para *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

Variable	VMV	DE	Valor mínimo	Valor máximo	Valor p
Edad	7.8 años	± 2.29	2.2	13.83	0.03*
Paridad	3.4 partos	± 1.74	0	9	0.05*
DUP	154 días	± 88.73	0	685	0.11

VMV=Valor medio de la variable en animales positivos a MAP por ELISA; DE=Desviación estándar; DUP= Días desde el último parto.

*Resultados significativos estadísticamente ($p \leq 0.05$).

DISCUSIÓN

Según el conocimiento de los autores y de acuerdo con la literatura consultada, este es el primer estudio que evalúa el estatus serológico a MAP y explora los factores asociados en hatos lecheros colombianos del trópico bajo. En Colombia, la enfermedad se ha explorado principalmente en ganado lechero, vacuno y ovino, y se ha centrado en la detección del agente y en la estimación de la prevalencia local (9,10). Tanto el agente como la enfermedad están presentes en Colombia, sin embargo, se dispone de información epidemiológica parcial, por lo que aún es necesario recopilar información sobre los vínculos epidemiológicos, teniendo en cuenta los diferentes sistemas productivos del ganado.

Dadas las particularidades en las estrategias de manejo y la genética utilizadas en los sistemas de producción de leche del trópico bajo, es difícil comparar las frecuencias de detección de anticuerpos anti-MAP y los factores asociados con resultados positivos. Sin embargo, la proporción de resultados positivos de ELISA obtenidos en los animales (17.2%) es consistente con los informes a este nivel en ganado bovino de otros países latinoamericanos (10). Se esperaba una mayor frecuencia por parte de los investigadores, ya que se observaron varios factores de riesgo durante el muestreo (e.g. movimiento de

animales entre hatos, compra de reemplazos de fuentes externas, pastoreo de ganado con ovejas, el bajo nivel de información sobre la enfermedad por parte del administrador, la permanencia de la madre con el ternero después del nacimiento, el calostro y la alimentación de leche a partir de múltiples vacas).

No se reporta la prevalencia como indicador de frecuencia de la enfermedad en la población de estudio, ya que el número de hatos muestreados no se considera representativo del sistema de producción en el área de estudio ni en el país. Adicionalmente, se trató de un muestreo a conveniencia. Sin embargo, utilizamos un diseño de estudio que consideró la proporcionalidad y la aleatorización de los animales muestreados dentro de cada hato.

Por otro lado, algunas particularidades de las pruebas utilizadas en el estudio podrían haber afectado la frecuencia de detección de animales positivos a MAP reportada, debido a falsos negativos. Las pruebas de diagnóstico más utilizadas para la PTB son el cultivo fecal (FC), ELISA y PCR (18). La prueba de ELISA, por su parte, ha mostrado ventajas como prueba tamiz, sobre las pruebas moleculares y microbiológicas, principalmente por el bajo costo para la obtención de las muestras, proporciona resultados rápidamente y ha demostrado ser altamente específica ($\geq 99\%$) (19). Las desventajas relativas a la Se están más relacionadas con la etapa de la enfermedad que con la prueba *per se* (esto es, cuanto más ha avanzado la enfermedad, más sensible es la prueba para detectar anticuerpos anti-MAP) (8). Además, los rumiantes pueden desarrollar la enfermedad sin respuesta de anticuerpos o una respuesta inconsistente contra MAP (20), lo cual podría de alguna manera explicar la relativamente baja frecuencia encontrada en el presente estudio.

La variable identificada a nivel de hato en el presente estudio como asociada a la seropositividad anti-MAP (*presencia de otros rumiantes en copastoreo con el ganado bovino en los últimos 2 años*) se informó por primera vez en 2011 (21) como un factor de riesgo para la infección por esta micobacteria. Además, la literatura ha reportado casos de PTB bovina a partir de la cepa S (oveja) en Australia e Islandia bajo sistemas de pastoreo, demostrando la oportunidad de transmisión entre especies (22). Luego, se puede detectar una respuesta serológica, ya que MAP es un patógeno

intracelular que no se reproduce en el ambiente, por lo que las posibles fuentes de contaminación serían otros rumiantes domésticos, como las cabras u ovejas.

Las variables a nivel animal *edad* y *paridad* pueden tener un comportamiento colineal, porque una variable puede ser una combinación lineal exacta de la otra. Esto podría explorarse desde un enfoque de modelo de regresión múltiple, que estaba lejos de nuestro objetivo. Sin embargo, a este nivel, se puede observar que estas dos variables proporcionan la misma información, ya que cuanto mayor es la edad de la vaca, mayor es el número de partos y viceversa. Reportes anteriores han establecido la probabilidad más alta de una prueba positiva entre las vacas más viejas (e.g. paridad >4) y la más baja entre la primera paridad (23, 24). La asociación observada con la *paridad* en nuestro estudio está relacionada con la naturaleza crónica de la infección, lo que implica que las vacas son relativamente viejas (normalmente 2-5 años) antes de mostrar síntomas de la enfermedad (8). En nuestro estudio evaluamos vacas cercanas a los 14 años, lo que implica una mayor probabilidad de detección utilizando ELISA. Es importante enfatizar que las variables mencionadas anteriormente y sus asociaciones con el estatus serológico a MAP provienen de reportes sobre ganado lechero en sistemas especializados para la producción de leche, que difiere en varios aspectos, principalmente los relacionados con la genética y el manejo, de sistemas lácteos del trópico bajo observados en Colombia, los cuales constituyeron la población de estudio del presente reporte. Sin embargo,

para los autores, se considera viable conservarlos como factores asociados comparables, dadas las características inherentes de la enfermedad y su agente causal.

En el presente estudio encontró que el 17.2% de las vacas y el 100% de los hatos de estudio fueron positivos a MAP mediante la prueba de ELISA. Adicionalmente se identificaron variables asociadas que pueden ser de interés tanto para los productores como para los veterinarios de animales de producción, y orientar su enfoque para el manejo de la enfermedad.

Nuestros hallazgos respaldan la necesidad de estudios adicionales para explorar posibles vínculos en la dinámica de la infección en diferentes sistemas de producción de ganado en Colombia, utilizando técnicas bacteriológicas y moleculares para analizar características específicas y factores de riesgo específicos a nivel de la población.

Conflicto de intereses

Los autores no tienen conocimiento de ninguna relación financiera o personal con otras personas u organizaciones que puedan influir de manera inapropiada en el trabajo que se informa en este documento.

Agradecimientos

Los autores agradecen al administrador y al propietario de los hatos de estudio por su participación.

REFERENCIAS

1. Fecteau ME. Paratuberculosis in cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2018; 34(1):209-222. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2017.10.011>
2. Sweeney RW, Whitlock RH, Rosenberger AE. *Mycobacterium paratuberculosis* isolated from fetuses of infected cows not manifesting signs of the disease. *Am J Vet Res.* 1992; 53:477-480. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2011.07.012>
3. Atreya R, Bülte M, Gerlach GF, Goethe R, Hornef MW, Köhler H, et al. Facts, myths and hypotheses on the zoonotic nature of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Int J Med Microbiol.* 2014; 304(7):858-867. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.07.006>
4. Kuenstner JT, Naser S, Chamberlin W, Borody T, Graham DY, McNees A, et al. The Consensus from the *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) Conference 2017. *Front Public Heal.* 2017; 5:1-5. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2017.00208>

5. McAloon CG, Roche S, Ritter C, Barkema HW, Whyte P, More SJ, et al. A review of paratuberculosis in dairy herds — Part 1: Epidemiology. *Vet. J* 2019; 246:59–65. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2019.01.010>
6. McAloon CG, Whyte P, More SJ, Green MJ, O’Grady L, Garcia A, et al. The effect of paratuberculosis on milk yield—A systematic review and meta-analysis. *J Dairy Sci.* 2016; 99(2):1449–1460. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10156>
7. Nielsen SS, Toft N. A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. *Prev Vet Med.* 2009; 88(1):1–14. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2008.07.003>
8. Barkema HW, Orsel K, Nielsen SS, Koets AP, Rutten VPMG, Bannantine JP, et al. Knowledge gaps that hamper prevention and control of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection. *Transbound Emerg Dis.* 2017; 65(1):125-148. <https://doi.org/10.1111/tbed.12723>
9. Correa-Valencia N, García-Tamayo YM, Fernández-Silva JA. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Colombia (1924-2016): A review. *Rev Colomb Cienc Pecu* 2018; 31(3):165-179. <https://doi.org/10.17533/udea.rccp.v31n3a01>
10. Fernández-Silva JA, Correa-Valencia NM, Ramírez NF. Systematic review of the prevalence of paratuberculosis in cattle, sheep, and goats in Latin America and the Caribbean. *Trop Anim Health Prod.* 2014; 46(8):1321–1340. <https://doi.org/10.1007/s11250-014-0656-8>
11. Galeano AP, Manrique C. Estimación de parámetros genéticos para características productivas y reproductivas en los sistemas doble propósito del trópico bajo colombiano. *Rev la Fac Med Vet y Zootec.* 2010; 57(2):119–131. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/remevez/article/view/17342/18179>
12. Holmann F, Rivas L, Carulla J, Rivera B, Giraldo LA, Guzmán S, et al. Producción de leche y su relación con los mercados; caso colombiano. CIAT. 2004; 1–80. http://ciat-library.ciat.cgiar.org/Articulos/Ciat/tropileche/books/Produccion_leche_relacion_mercados_caso_Colombia.pdf
13. DANE. Departamento Administrativo Nacional de Estadística. Colombia. Censo Nacional Agropecuario, 2014. <https://www.dane.gov.co/files/images/foros/foro-de-entrega-de-resultados-y-cierre-3-censo-nacional-agropecuario/CNATomo2-Resultados.pdf>
14. Espinal LS. Zonas de vida o formaciones vegetales de Colombia: Mapa geológico. Memoria explicativa sobre el mapa ecológico, Bogotá (Colombia). Instituto Geográfico Agustín Codazzi (IGAC) 1977. Vol. 11-13.
15. IDEAM. Instituto de hidrología, meteorología y estudios ambientales, Colombia. Mapas y gráficos del tiempo y el clima, 2018. http://institucional.ideam.gov.co/jsp/mapas-y-graficos-del-tiempo-y-el-clima_882
16. Toda Colombia, 2019. <https://www.todacolombia.com/departamentos-de-colombia/sucre/clima.html>
17. Toda Colombia. Clima Departamento de Córdoba. 2019. <https://www.todacolombia.com/departamentos-de-colombia/cordoba/clima.html>
18. Stevenson K. Diagnosis of Johne’s disease: Current limitations and prospects. *Cattle Pract.* 2010; 18:104–109.
19. Alinovi CA, Ward MP, Lin TL, Wu CC. Sample handling substantially affects Johne’s ELISA. *Prev Vet Med.* 2009; 90(3–4):278–283. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2009.04.004>
20. Münster P, Völkel I, Wemheuer W, Schwarz D, Döring S, Czerny CP. A longitudinal study to characterize the distribution patterns of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in semen, blood and faeces of a naturally infected bull by IS900 semi-nested and quantitative real-time PCR. *Transbound Emerg Dis.* 2013; 60(2):175–187. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2012.01336.x>
21. Barrett DJ, Mee JF, Mullaney P, Good M, McGrath G, Clegg T, et al. Risk factors associated with Johne’s disease test status in dairy herds in Ireland. *Vet Rec.* 2011; 168(15):0–2. <https://doi.org/10.1136/vr.c6866>

22. Whittington RJ, Taragel CA, Ottaway S, Marsh I, Seaman J, Fridriksdottir V. Molecular epidemiological confirmation and circumstances of occurrence of sheep (S) strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cases of paratuberculosis in cattle in Australia and sheep and cattle in Iceland. *Vet Microbiol.* 2001; 79(4):311–322. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00364-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00364-3)
23. Eisenberg SWF, Veldman E, Rutten VPMG, Koets AP. A longitudinal study of factors influencing the result of a *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* antibody ELISA in milk of dairy cows. *J Dairy Sci.* 2015; 98(4):2345–2355. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8380>
24. Laurin EL, Sanchez J, Chaffer M, McKenna SLB, Keefe GP. Assessment of the relative sensitivity of milk ELISA for detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infectious dairy cows. *J Dairy Sci.* 2017; 100(1):598–607. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11194>