



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE AGUASCALIENTES**

**CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

Posgrado en Ciencias Agrícolas, Pecuarias y de los Alimentos

**PREVALENCIA DE LA PARATUBERCULOSIS OVINA Y FACTORES DE  
RIESGO ASOCIADOS, EN REBAÑOS SELECCIONADOS DEL ESTADO DE  
AGUASCALIENTES.**

Para obtener el grado de

**DOCTORADO EN CIENCIAS PECUARIAS  
PRESENTA**

**MC. GABRIEL ERNESTO PALLÁS GUZMÁN**

Director de Tesis

**Dr. TEÓDULO QUEZADA TRISTÁN  
Dr. GILBERTO CHÁVEZ GRIS**

Comité tutorial

**Dra. MARTHA PATRICIA ZAVALA ARIAS  
Dr. EFRÉN DÍAZ APARICIO  
Dr. EFRAÍN ISLAS OJEDA**

Aguascalientes, Ags., diciembre de 2011

**DR RAUL ORTIZ MARTINEZ**  
**DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**PRESENTE**

Por medio del presente como **TUTOR** designado del estudiante **GABRIEL ERNESTO PALLAS GUZMAN** con ID **9234** quien realizó la tesis titulada: **PREVALENCIA DE LA PARATUBERCULOSIS OVINA Y FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS, EN REBAÑOS SELECCIONADOS DEL ESTADO DE AGUASCALIENTES**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que él pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**

**"Se Lumen Proferre"**

**Aguascalientes, Ags., a 16 de diciembre de 2011.**

  
**Dr. Teódulo Quezada Tristán**  
**Tutor de tesis**

c.c.p.- Interesado

c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

**DR RAUL ORTIZ MARTINEZ**  
**DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

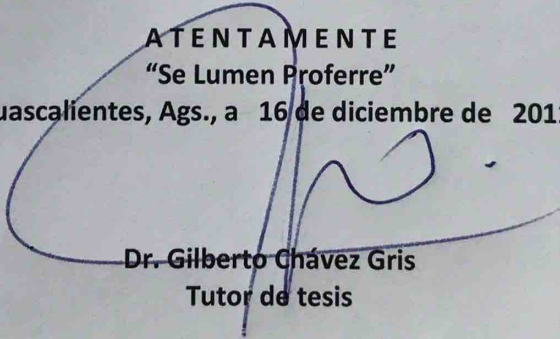
**PRESENTE**

Por medio del presente como **TUTOR** designado del estudiante **GABRIEL ERNESTO PALLAS GUZMAN** con ID **9234** quien realizó la tesis titulada: **PREVALENCIA DE LA PARATUBERCULOSIS OVINA Y FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS, EN REBAÑOS SELECCIONADOS DEL ESTADO DE AGUASCALIENTES**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que él pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"Se Lumen Proferre"**

**Aguascalientes, Ags., a 16 de diciembre de 2011.**



**Dr. Gilberto Chávez Gris**  
**Tutor de tesis**

c.c.p.- Interesado  
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

**DR RAUL ORTIZ MARTINEZ**  
**DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**PRESENTE**

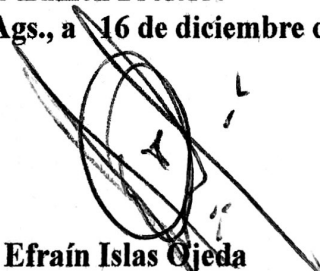
Por medio del presente como **ASESOR** designado del estudiante **GABRIEL ERNESTO PALLAS GUZMAN** con ID **9234** quien realizó la tesis titulada: **PREVALENCIA DE LA PARATUBERCULOSIS OVINA Y FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS, EN REBAÑOS SELECCIONADOS DEL ESTADO DE AGUASCALIENTES**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que él pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**

**“Se Lumen Proferre”**

**Aguascalientes, Ags., a 16 de diciembre de 2011.**



**Dr. Efraín Islas Ojeda**  
**Asesor de tesis**

c.c.p.- Interesado

c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

**DR RAUL ORTIZ MARTINEZ**  
**DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

---

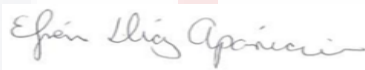
PRESENTE

Por medio del presente como **ASESOR** designado del estudiante **GABRIEL ERNESTO PALLAS GUZMAN** con ID **9234** quien realizó la tesis titulada: **PREVALENCIA DE LA PARATUBERCULOSIS OVINA Y FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS, EN REBAÑOS SELECCIONADOS DEL ESTADO DE AGUASCALIENTES**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que él pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"Se Lumen Proferre"**

**Aguascalientes, Ags., a 16 de diciembre de 2011.**



**Dr. Efrén Díaz Aparicio**  
**Asesor de tesis**

c.c.p.- Interesado  
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

**DR RAUL ORTIZ MARTINEZ**  
**DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

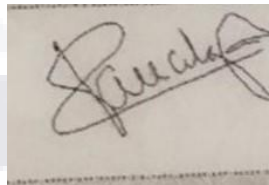
**PRESENTE**

Por medio del presente como **ASESOR** designado del estudiante **GABRIEL ERNESTO PALLAS GUZMAN** con ID **9234** quien realizó la tesis titulada: **PREVALENCIA DE LA PARATUBERCULOSIS OVINA Y FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS, EN REBAÑOS SELECCIONADOS DEL ESTADO DE AGUASCALIENTES**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que él pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"Se Lumen Proferre"**

**Aguascalientes, Ags., a 16 de diciembre de 2011.**



**Dra. Martha Patricia Zavala Arias**  
**Asesora de tesis**

c.c.p.- Interesado  
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

**NOMBRE:** Gabriel Ernesto Pallás Guzmán **ID** 9234

**PROGRAMA:** Posgrado en ciencias y tecnologías agrícolas, pecuarias y de los alimentos (PCTAPA). **LGAC (del posgrado):** Salud Animal

**TIPO DE TRABAJO:** (  ) Tesis ( ) Trabajo Práctico

**TÍTULO:** PREVALENCIA DE LA PARATUBERCULOSIS OVINA Y FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS, EN REBAÑOS SELECCIONADOS DEL ESTADO DE AGUASCALIENTES

**IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado):** Se genera conocimiento sobre el impacto que esta teniendo esta enfermedad poco considerada por productores y Médicos Veterinarios, para que se puedan establecer medidas de control al respecto.

**INDICAR SI NO N.A. (NO APLICA) SEGÚN CORRESPONDA:**

INDICAR	SI	NO	N.A. (NO APLICA)	SEGÚN CORRESPONDA:
<b>Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:</b>				
SI				El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
SI				La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
SI				Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
SI				Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
SI				Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
SI				El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
SI				Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
NO				Generó transferencia del conocimiento o tecnológica
SI				Cumple con la ética para la investigación (reporte de la herramienta antiplagio)
<b>El egresado cumple con lo siguiente:</b>				
SI				Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
SI				Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
SI				Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
N.A.				Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
SI				Coincide con el título y objetivo registrado
SI				Tiene congruencia con cuerpos académicos
NO				Tiene el CVU del Conacyt actualizado
SI				Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)
<b>En caso de Tesis por artículos científicos publicados</b>				
				Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
				El estudiante es el primer autor
				El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
				En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
				Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
				La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado:

Sí    
 No

**FIRMAS**

**Elaboró:**

\* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN:

  
Dr Antonio de Jesús Meráz Jiménez

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

  
Dr Antonio de Jesús Meráz Jiménez

\* En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del NAB de la LGAC correspondiente distinto al tutor o miembro del comité tutorial, asignado por el Decano

**Revisó:**

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:

  
Dr Antonio de Jesús Meráz Jiménez

**Autorizó:**

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

  
DR Raúl Ortiz Martínez

**Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado**

En cumplimiento con el Art. 105C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: ... Cuidar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105F las funciones del Secretario Técnico, llevar el seguimiento de los alumnos.

Abanico Veterinario. Enero-Diciembre 2021; 11:1-13. <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2021.5>  
Artículo Original. Recibido: 28/08/2020. Aceptado: 15/01/2021. Publicado: 30/01/2021. Clave:2020-74.

## Identificación del *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* y su seroprevalencia en rebaños ovinos de Aguascalientes

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

Pallás-Guzmán Gabriel<sup>1</sup> ID, Quezada-Tristán Teóduo<sup>1</sup> ID, Chávez-Gris Gilberto<sup>2</sup> ID, Maldonado-Castro Edith<sup>2</sup> ID, Chávez-González Leticia<sup>1</sup> ID, García-Munguía Carlos<sup>\*3</sup> ID

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

### RESUMEN

Con el objetivo de identificar la presencia de Paratuberculosis (PTB), enfermedad infecciosa causada por el *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* (MAP), en ovinos, a través de estudios anatomopatológicos, cultivo bacteriano y PCR *IS900*, así como estimar la seroprevalencia a MAP. El presente estudio, de tipo transversal, se realizó en 16 diferentes rebaños con el suero de 2415 animales adultos y analizados por Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA); se emplearon nueve ovinos con signos clínicos sugerentes a PTB, de los cuales se obtuvieron muestras para la realización de los estudios de identificación; obteniendo un 51.3 % de animales seropositivos a MAP (1239/2415), en el 100% de los rebaños (16/16); el aislamiento bacteriano y su identificación por PCR *IS900* en cinco de los nueve casos hallados (5/9) correspondiendo al 31.25% de los rebaños (5/16). Conformando la presencia del *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*, así como una elevada frecuencia de animales seropositivos a MAP en rebaños de Aguascalientes.

**Palabras clave:** Paratuberculosis, ovinos, seroprevalencia, *Mycobacterium*.

### ABSTRACT

With the objective of identifying the presence of Paratuberculosis (PTB), an infectious disease caused by *Mycobacterium avium* subsp *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 sheep, 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* subsp *paratuberculosis*, and a high frequency of seropositive animals to MAP in flocks of Aguascalientes.

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





## ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE CUADROS	3
ÍNDICE DE FIGURAS	4
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
1.- INTRODUCCIÓN	7
2.- ANTECEDENTES	
2.1.- La producción ovina en México y Aguascalientes	9
2.2.- Aspectos generales de la Paratuberculosis	10
2.2.1.- Etiología	10
2.2.2.- Infección y Patogenia	13
2.2.2.1.- Vías de transmisión del agente	
2.2.2.2.- Patogenia	
2.2.3.- Cuadro clínico y lesiones	16
2.2.3.1.- Etapas de la enfermedad y Cuadro clínico	
2.2.3.2.- Lesiones	
2.2.4.- Diagnóstico	21
2.2.4.1.- Diagnóstico por lesiones	
2.2.4.2.- Diagnóstico por pruebas serológicas	
2.2.4.3.- Diagnóstico por cultivo y aislamiento bacteriano	
2.2.4.4.- Diagnóstico por reacción de cadena polimerasa	
2.2.4.5.- Comparativo de pruebas diagnósticas	
2.2.5.- Epidemiología e impacto económico	26
2.2.5.1.- Prevalencia de la enfermedad	
2.2.5.2.- Presencia de la enfermedad en animales silvestres y no rumiantes	
2.2.5.3.- Impacto económico	
2.2.6.- Salud pública	28
2.2.7.- Control de la Paratuberculosis	28
2.2.8.- Factores de Riesgo	29
3.- HIPÓTESIS	33
4.- OBJETIVOS	34
4.1.- Objetivo general	
4.2.- Objetivos específicos	
5.- MATERIALES Y MÉTODOS	
5.1.- Ubicación del estudio	35

5.2.-	Diseño del estudio	36
5.3.-	Selección de los rebaños	36
5.4.-	Estimación de la seroprevalencia a MAP	38
	5.4.1.- Toma de muestras para serología (ELISA)	38
	5.4.2.- Prueba de ELISA	38
	5.4.3.- Estimación de la seroprevalencia	39
5.5.-	Identificación de la presencia de MAP en los rebaños	39
	5.5.1.- Toma de muestras para estudios anatomopatológicos y aislamiento de MAP	39
	5.2.3.- Cultivo bacteriano a partir de tejidos (intestino)	40
	5.2.4.- PPCR IS 900	41
5.6.-	Determinación de factores de riesgo asociados	41
	5.6.1.- Cuestionario	
5.7.-	Análisis estadístico	42
6.-	RESULTADOS	
6.1.-	Seroprevalencia a MAP por ELISA	43
6.2.-	Identificación de <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	45
	6.2.1.- Estudios anatomopatológicos	45
	6.2.2.- Cultivo Bacteriano a partir de tejido (intestino)	49
	6.2.3.- PCR IS900	49
6.3.-	Determinación de la presencia de factores de riesgo	51
7.-	DISCUSIÓN	53
8.-	CONCLUSIONES	59
	REFERENCIAS CONSULTADAS	60
	ANEXOS	76

## ÍNDICE DE CUADROS

NÚMERO	NOMBRE DE CUADRO	PÁGINA
1	Distribución del padrón de productores de AGLOYCA	9
2	Relación filogenética del complejo <i>Mycobacterium avium</i>	12
3	Posibilidad de diagnóstico de la enfermedad de Johne conforme a los estadios de enfermedad	26
4	Comparación de pruebas de diagnósticos para la enfermedad de Johne	27
5	Explotaciones incluidas en el estudio y características generales de éstas	37
6	Resumen de categorías y aspectos contenidos en el cuestionario	42
7	Resultados de seroprevalencia de paratuberculosis por rebaño	45
8	Resultados bacteriológicos, anatomopatológicos y de PCR de rebaños con casos clínicos con sospecha de PTB	52
9	Determinación de factores de riesgo asociados a la seroprevalencia a paratuberculosis	53

## INDICE DE FIGURAS

NÚMERO	NOMBRE DE FIGURA	PÁGINA
1	Antecedentes: Lesión en íleon, inflamación granulomatosa, células epitelioides y células gigantes multinucleadas	19
2	Antecedentes: Lesión paucibacilar en donde se aprecian algunos BAAR	20
3	Antecedentes: Antecedentes: Lesión multibacilar en íleon, bacilos ácido alcohol resistentes en la mucosa	20
4	Ubicación de las 16 explotaciones incluidas en el estudio dentro del Valle central de Aguascalientes	35
5	Porcentaje de las seroprevalencias a MAP obtenidas por rebaño por la técnica de ELISA	45
6	Ejemplar con signos clínicos y lesiones de emaciación crónica, edema submandibular	46
6a	Ejemplar con signos de edema submandibular	47
7	Presencia de ascitis y degeneración grasa en vísceras Abdominales	47
8	Lesión correspondiente a engrosamiento de la mucosa intestinal a nivel de íleon	48
9	Lesiones de tipo granulomatoso en mucosa de intestino delgado tinción H-E	48
10	Lesión histopatológica de tipo multibacilar, tinción de Ziehl-Neelsen	49
11	Aislamiento de colonias bacterianas en medio Löwenstein-Jensen	50
12	Producto de amplificación de PCR directo a partir de extracción de ADN de colonias bacterianas	51

## RESUMEN

La paratuberculosis (PTB) es una enfermedad crónica infecciosa de distribución mundial, caracterizada por provocar una enteritis granulomatosa, asociada a una emaciación progresiva en rumiantes. En Latinoamérica y particularmente en México, se desconoce su prevalencia en las diferentes especies y su impacto en los sistemas y unidades de producción ovina. Con el objetivo de estimar la seroprevalencia de anticuerpos contra *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), e identificar la presencia de la bacteria a través de estudios anatomopatológicos, cultivo bacteriano y PCR en ovinos con cuadro clínico sugerente a Paratuberculosis, así como determinar los principales factores de riesgo asociados a la frecuencia de la enfermedad, se plantea un estudio de tipo descriptivo transversal en dieciséis rebaños del estado de Aguascalientes, México. Se obtuvieron muestras de suero del total de 2341 animales adultos y se aplicó un ELISA no comercial con antígeno PPA-3 evaluando la seropositividad de los animales; al mismo tiempo se identificaron nueve animales con signos sugerentes a PTB, los cuales se sacrificaron para realizar necropsia y a partir de muestras de tejido íleo-cecal, se identificaron lesiones histopatológicas; a partir de muestras de tejido intestinal se realizó cultivo bacteriano en medio Löwenstein-Jensen y de los aislados obtenidos se llevó a cabo la identificación del MAP mediante PCR IS900. Para la identificación de los factores de riesgo, se aplicó un cuestionario con preguntas dicotómicas y analizadas para obtener el valor de riesgo (OR). Los resultados obtenidos muestran una seroprevalencia de 51.3% en promedio del total de los animales, así como animales seropositivos en el 100% de los rebaños (16 de 16); de los 16 rebaños se realizó necropsia en nueve ejemplares (9 de 16), de estos, ocho presentaron lesiones de tipo multibacilar y uno de tipo paucibacilar, se obtuvieron cinco aislamientos positivos a MAP (5 de 16 rebaños) y confirmándose estos mismos por PCR IS900. Los factores de riesgo identificados con una “fuerte asociación” fueron: la falta de programas de bioseguridad, contaminación del alimento con heces, no lotificación del rebaño, estrés nutricional y desbalance nutricional. Los que presentaron una “Moderada asociación” fueron, tamaño y antigüedad del rebaño, baja frecuencia de limpieza de corrales y la contaminación de comederos. Concluyendo así en la confirmación diagnóstica de la presencia del *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, así como una frecuencia elevada en la seroprevalencia hacia este mismo; lo cual se encuentra fuertemente asociado a la falta de programas de sanitarios, de bioseguridad que rompan la ruta de infección fecal-oral y deficiencias alimentarias en los rebaños estudiados.

## ABSTRACT

Paratuberculosis (PTB) is a chronic infectious disease with a worldwide distribution, characterized by a granulomatous enteritis associated with progressive emaciation in ruminants. In the Latin American region and particularly in Mexico, prevalence in diverse species and particularly their impact on sheep production systems is unknown. In order to estimate the seroprevalence of antibodies against *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* (MAP) and identify the presence of the agent through pathological studies, bacterial culture and PCR in sheep with a clinical picture suggestive of Paratuberculosis and determining the main risk factors associated with the frequency of the disease, in sheep flocks selected from the Aguascalientes Valley. A cross-sectional descriptive study was proposed in sixteen flocks. Serum samples were obtained from a total of 2341 adult animals and evaluated with a non-commercial ELISA with PPA-3 antigen to obtain the seropositivity of the animals. At the same time, nine animals with suggestive signs of PTB were sacrificed to perform Necropsy, ileo-caecal tissue samples were taken, histopathological lesions were identified from these tissue samples; and a bacterial culture was performed in Löwenstein-Jensen medium from the same tissue and the obtained isolates were identified by MAP using IS900 PCR. To identify the risk factors, a questionnaire with dichotomous questions was applied and analyzed to get the risk value (OR). The results show a seroprevalence of 51.3%, with seropositive animals in 100% of the herds (16 of 16), from the 16 herds, a necropsy was carried out in nine specimens (9 of 16), eight animals show multibacillary lesions and one with paucibacillary lesion, only five positive isolates were obtained (5 of 16 flocks), who were confirmed by IS900 PCR. The risk factors identified with a "Strong association" were: the lack of biosecurity programs, contamination of the feed with feces, not lotification of the herd, nutritional stress and nutritional imbalance. With a "Moderate association" were identified: herd size and age, low frequency of cleaning pens and contamination of feeders. The diagnostic confirmation of the presence of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* and a high seroprevalence frequency in the flocks, are strongly associated with the lack of sanitary, biosafety programs and nutritional deficiencies in studied flocks.

## 1 INTRODUCCION

El sector de producción ovino ha mostrado una actividad creciente, en donde la eficiencia reproductiva y la tecnificación son elementos que han impulsado el desarrollo del sector, en la actualidad México con un crecimiento aproximado de un 20% en el periodo de 2003 a 2010 con un total de más de ocho millones de cabezas, incrementando la producción de carne en un 30%. Con este incremento en la producción nacional se satisface un 70% del consumo de carne de ovino, mientras que para complementar la demanda se importa el otro 30% de países como Australia, Nueva Zelanda, Estados Unidos, Aguascalientes ha participado durante este periodo con un 0.8% de la producción nacional. (Arteaga 2008; SIAP 2010).

Entre los diversos problemas de tipo sanitarios y que han impactado la productividad el rebaño ovino por su común presentación, son cuadros clínicos correspondientes a emaciación crónica, en donde la mortalidad y el desecho por esta causa es un porcentaje aparentemente elevado sin tener ningún reporte oficial ni de investigación al respecto (Tórtora, 2008). Una de las posibles causas sugerentes de este cuadro, es la Paratuberculosis (PTB) o Enfermedad de Johne, enfermedad crónica, causada por el *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, que afecta a rumiantes y se caracteriza por ser una enteropatía con signos de pérdida progresiva de la condición corporal. Aunque se debe considerar también la presentación de otras etiologías que pueden causar cuadros clínicos similares a la Paratuberculosis, como: parasitosis intestinal crónica, abscesos intestinales, Pseudotuberculosis (*Corynebacterium pseudotuberculosis*), enfermedad hepática crónica y malnutrición crónica entre otros (NRC, 2003; Chávez, 2005; Begg y Whittington, 2010).

Una de las problemáticas comunes referidas por varios investigadores, es la dificultad en el diagnóstico de la enfermedad y el aislamiento del agente en cultivo fecal, prueba considerada como "Gold Standard", inclusive con el desarrollo de pruebas de cadena polimerasa PCR (Chávez, 2005).

La falta de eficacia para el diagnóstico en todos los animales infectados, se asocia al desarrollo de la patogenia de la enfermedad, en donde hay una liberación intermitente de microorganismos en heces y una respuesta inmune no continua durante el desarrollo de la enfermedad, que no permite que exista una alta confiabilidad en los diferentes métodos diagnósticos previos a la presentación clínica de la enfermedad, siendo así que la mayoría



de los análisis diagnósticos de la enfermedad son efectivos a nivel de rebaño y en menor grado a nivel de individuo (Sezzi *et al.*, 2007; Begg y Whittington, 2010; OIE, 2004)

En México, se ha detectado la presencia de PTB en ovinos en diversos estados del país, como son, San Luis Potosí, Guanajuato, Querétaro, Ciudad de México, Estado de México y Veracruz (Estéves *et al.*, 2006; Jaimes *et al.*, 2008); sin embargo, al igual que en el resto del mundo, existen pocos estudios sobre la presencia y prevalencia de estas enfermedades. Para el caso de la Paratuberculosis, como sucede en otros países, se desconoce cuánto daño ha causado a la industria ovina el comportamiento de la prevalencia de la enfermedad dentro de un rebaño considerando que el número de los casos clínicos presentes representan sólo una pequeña proporción de los individuos que realmente están infectados por lo que la enfermedad se define como igual al concepto de un iceberg, donde el número de casos clínicos presentes sólo representan una pequeña proporción de los individuos que realmente están infectados (Chávez, 2005; Manning y Collins, 2010). En el estado de Aguascalientes existen casos no cuantificados en los rebaños de ovinos, de animales adultos con emaciación progresiva y mortalidad en algunos casos, sin embargo, no se realiza el diagnóstico para conocer su causa y entre las posibilidades de diagnóstico está la PTB.

El presente trabajo plantea el objetivo de estimar la frecuencia de rebaños ovinos y de individuos dentro de estos que resulten ser seropositivos a MAP, confirmar la presencia de MAP a través de estudios anatomopatológicos, cultivo y PCR en ovinos que presentan cuadro clínico sugerente a PTB al momento del estudio, así como determinar los principales factores de riesgo asociados que favorezcan el desarrollo y presentación clínica de la enfermedad en rebaños ovinos seleccionados del Valle de Aguascalientes.

## 2 ANTECEDENTES

### 2.1 LA PRODUCCIÓN OVINA EN MÉXICO Y AGUASCALIENTES

En el periodo de 2003 a 2013, uno de los sectores de producción agropecuaria en México, con un significativo crecimiento en el desarrollo de su actividad es el de la especie-producto ovina con un 20% aproximado. Parte importante del desarrollo de esta industria es el incremento en productividad de algunos segmentos del sistema productivo como son la mejora de la eficiencia reproductiva y la tecnificación, aunque hay regiones y estratos de productores como los pertenecientes a los sectores sociales rurales y aquellos considerados como de “traspatio” y/o “tradicionales” que no han logrado mejorar su productividad (Arteaga 2008)

En Aguascalientes, como en otros estados del país, la ovinocultura ha crecido a partir de 1990 en más del 100%, en este crecimiento de la producción ovina, Aguascalientes, ha participado con un aproximado el 0.8% de la producción nacional estimada (Arteaga, 2008; SIAP 2010). Geográficamente, el Valle de Aguascalientes, conformado por los municipios de Aguascalientes, San Francisco de los Romo, Rincón de Romos, Jesús María, Pabellón y Asientos, es en donde se concentra el 85% de la producción de carne ovina del estado, porcentaje similar al resto de las actividades pecuarias. Al momento del estudio las principales razas de ovinos explotadas en el estado de Aguascalientes por los cerca de 96 productores (cuadro 1) afiliados a la Asociación Ganadera Local de Ovinocultores y Caprinocultores de Aguascalientes son: Black Belly, Pelibuey, Katahdín, Dorper y Suffolk principalmente (AGLOYCA, 2010).

MUNICIPIOS	RANCHOS	%	CABEZAS
AGUASCALIENTES	35	33.65	9589
RINCÓN DE ROMOS	13	12.50	2550
JESÚS MARÍA	12	11.54	1227
PABELLÓN DE ARTEAGA	11	10.58	2253
SAN FCO. DE LOS ROMO	11	10.58	1910
OTROS	22	21.15	4056
<b>TOTAL</b>	<b>104</b>	<b>100%</b>	<b>21585</b>

Cuadro 1. Distribución del padrón de productores de AGLOYCA por municipio (enero de 2010).

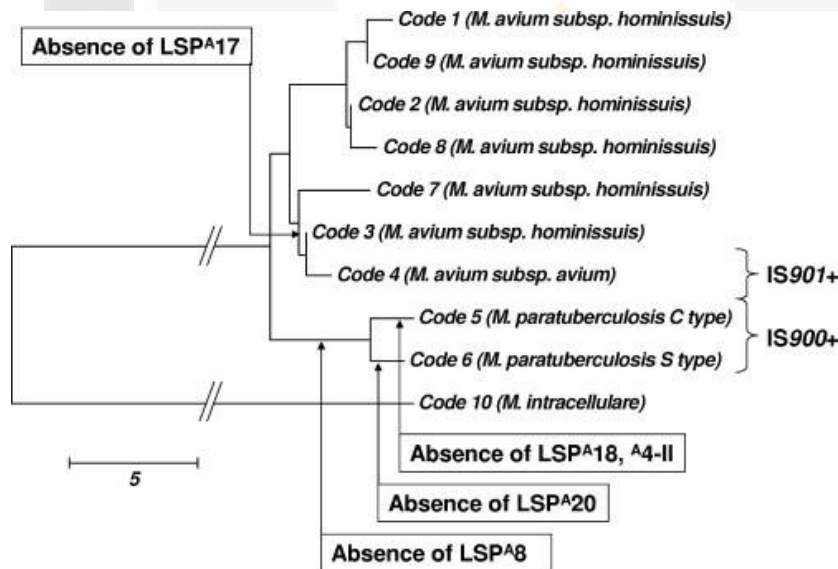
## 2.2 ASPECTOS GENERALES DE LA PARATUBERCULOSIS

La Paratuberculosis (PTB) o Enfermedad de Johne, enfermedad infecciosa crónica causada por el *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), es caracterizada por una enteritis granulomatosa en los rumiantes y una emaciación progresiva de los animales. Fue descrita por primera vez en 1895 en Alemania por H. A. Johne y L. Frothingham, quienes la describieron como “un caso peculiar de Tuberculosis”, demostrando la conexión entre la presencia de enteritis del ganado y la presencia de bacterias ácido-alcohol resistentes. El Dr. Bernard Bang en 1906, distinguió la existencia de lesiones “tuberculosas” y de lesiones “no tuberculosas” o difusas, llamando a ésta “enteritis crónica bovina pseudotuberculosa”. La identificación del agente etiológico se atribuye a Frederick W. Twort, quien en 1912 cultivó y caracterizó a la bacteria, denominándola como *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis johne*, con lo cual en 1914 se reprodujo la enfermedad en forma experimental (Harris y Barletta, 2001; Manning y Collins, 2010). La Paratuberculosis es una enfermedad enzoótica de distribución mundial, ubicada dentro de la lista B de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), siendo quizás una de las enfermedades de más amplia distribución mundial que causa importantes pérdidas económicas (OIE, 2004). En México, se ha reportado la presencia de PTB en ovinos y caprinos en diversos estados del país, como, San Luis Potosí, Guanajuato, Querétaro, Ciudad de México, Estado de México, Hidalgo y Veracruz (Estéves *et al.*, 2006; Manning y Collins, 2010). Diversos estudios sugieren la participación de MAP en la enfermedad de Crohn en humanos, considerada actualmente una zoonosis (Behr, 2010; Over *et al.*, 2011).

### 2.2.1. Etiología

La Paratuberculosis o enfermedad de Johne, es un proceso infeccioso causado por el *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). Esta bacteria pertenece al género *Mycobacterium*, organismos aerobios que se encuentran en el suelo y agua en forma libre o como patógenos intracelulares de los animales. Son bacterias Gram positivas, con forma de bastón, no motiles; se diferencian de otras bacterias por que producen ácido micólico en su pared, lo cual las hace difíciles de teñir con colorantes habituales como el Gram, esto le confiere características de teñido ácido alcohol resistente, para lo cual se emplean tinciones como la Ziehl-Neelsen. (Turenne y Alexander, 2010)

El Complejo *Mycobacterium avium* incluye diversas subespecies como: *M. avium* subsp. *avium* (MAA), *M. Avium* subsp *hominissuis* (MAH) *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), aunque poseen elementos de similitud genética, la diferenciación entre estas especies puede realizarse fenotípicamente por características de sus colonias y su dependencia a la micobactina durante su cultivo, así como una diferencia genotípica por la presencia de la inserción de secuencias genéticas, la IS901 está presente en las especies MAA, la inserción IS900 está presente en MAP y carece de LSP8 (Li *et al.*, 2005; Turenne *et al.*, 2007; Turenne y Alexander, 2010); en el Cuadro 2 se presenta una relación filogenética de las subespecies del género *Mycobacterium*.



Cuadro 2. Relación filogenética del CMA basadas en sus diferencias de nucleótidos e inserciones de secuencias genéticas basada en diferencias de nucleótidos, superpuesta con variación genética basada en LSP. Las cepas IS901 + se agrupan en un linaje, y todas carecen de LSPA17. Las cepas IS900 todas carecen de LSPA8 (Turenne *et al.*, 2007)

Para la identificación genómica del *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, se ha mostrado la inserción del gene IS900 en los 14 de los 18 locus en donde se encuentra, es un método que es posible emplear para determinar y caracterizar la cepa de MAP que se

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

desea identificar. Estudios genéticos realizados con el MAP, se describen las secuencias completas de su genoma, su tamaño es de 4.4 a 4.7 Mb (Li *et al.*, 2005; Stevenson, 2010). Es hacia 1990 cuando se determina la existencia de diferentes variedades de MAP, mediante el uso de nuevas técnicas de determinación de ADN, como es el análisis de longitud de filamentos polimórficos (fragment length polymorphism análisis: RFLP), que ha permitido poder establecer variabilidad genética entre diferentes cepas de MAP, las cuales se han caracterizado de acuerdo a la especie de donde se han aislado estas cepas, siendo principalmente la “C” (Cattle) cuyo origen son los bovinos también denominada como cepa II y la “S” (Sheep) o cepa I cuyo origen son los Ovinos, reportándose también una cepa III o tipo “bisón”, la cual actualmente se agrupa o reconoce del tipo I o “S” incluso agrupándolas en una misma categoría. (NRC, 2004; Alexander *et al.*, 2009; Stevenson, 2010).

Las cepas identificadas de MAP, son unas de las especies de más lento crecimiento y para su aislamiento pueden tomar varios meses, presentan otras diferencias como son la necesidad de diferentes elementos para su crecimiento en aislamiento bacteriano, y el tiempo necesario para el crecimiento de las colonias, el cual es para la cepa “C” de 4 a 16 semanas y para la cepa “S” de 4 meses a un año, además de considerarse de difícil cultivo o fastidiosa. Si bien cada cepa se ha aislado de diferentes especies esto no excluye que una cepa pueda infectar a las otras especies de rumiantes, u otras especies, esto se reporta en aislamientos de la cepa “S” en bovinos y caprinos, o bien cepa “C” en caprinos (Chávez-Gris 2001; De Juan, 2006; Whittington, 2009; Stevenson, 2010; Elguezabal *et al.*, 2011), con lo cual se confirma la posibilidad de transmisión de la MAP entre diferentes especies susceptibles independientemente de la cepa (Moloney y Whittington, 2008).

El MAA y el MAP son considerados para su crecimiento como micobactina dependientes, como manera de adquirir el hierro necesario para su crecimiento, a diferencia de otras bacterias del género *Mycobacterium* que son capaces de producir su propia micobactina, compuesto intracelular ferro-ligando; sin embargo, el MAA al cultivarlo, pierde esa dependencia de micobactina. Los mamíferos restringen la disposición de hierro a las bacterias patógenas, inhibiendo así su crecimiento, por lo que las micobacterias sintetizan dos sideroforos responsables de llevar hierro hacia el interior de la célula, como medio de obtener el hierro necesario para su crecimiento, siendo la micobactina y la exoquelina, MAP sólo es capaz de sintetizar exoquelina, lo cual lo hace micobactina dependiente para su crecimiento en cultivos bacterianos, obteniéndose primero del *M. phlei* y subsecuentemente reemplazado por la micobactina J, obtenida de cepas de MAA (Kontoghiorges y Weinberg,

1995), este requerimiento de hierro es una forma de diferenciación fenotípica para MAP al momento de su cultivo y aislamiento. Para su crecimiento se requieren medios que contengan micobactina y piruvato de sodio, este último se excluye de los medios en donde se busca aislar la cepa “S” como es el Löwenstein-Jensen, siendo esta última la más fastidiosa para su aislamiento, puesto que parece ser más sensible a los procedimientos de descontaminación de las muestras y a ciertos antibióticos, por lo que se recomienda que para esta cepa se use un medio de cultivo sólido como es el Löwenstein-Jensen y el medio Middlebrock 7H11 (Merkal y Curran, 1974; Chávez et al., 2008; Whittington, 2010). Las colonias primarias de MAP que crecen en medios con micobactina y yema de huevo, son pequeñas, lisas, convexas y no pigmentadas en general, aunque en el caso de la cepa “S”, las colonias pueden presentar un color amarillento (de Juan *et al.*, 2006; Whittington, 2009). Una de las características a considerar de MAP dentro de su ecología, es que puede sobrevivir hasta por 55 semanas en un medioambiente húmedo y sombreado, nueve meses en agua y hasta por 24 semanas en pasturas abonadas con estiércol que contenga MAP, se le define como un organismo con viabilidad finita en el ambiente, lo cual lo sitúa como un organismo obligado de parasitar a los animales para sobrevivir (Whittington *et al.*, 2004). Además, el MAP ha demostrado presentar mayor resistencia a comparación de otro tipo de bacterias, a diversos elementos físicos y químicos como el cloro que se usa como desinfectantes, en diversos programas de limpieza, desinfección y control sanitario (Manning y Collins, 2001; Berghaus *et al.*, 2005).

## **2.2.2. Infección y Patogenia**

### **2.2.2.1. Vías de transmisión del agente**

La principal vía de infección de la enfermedad es la vía fecal-oral, MAP es eliminada a través de las heces de manera intermitente, contaminando así forrajes y pasturas, así como el exterior de la glándula mamaria al postrarse las hembras; así, el ingreso de esta micobacteria al organismo se lleva a cabo por la ingestión del microorganismo presente en materia fecal presente y contaminante de alimentos y superficies. Esto al consumir alimentos o pasturas, agua, lamer superficies sucias, al morder o comer tierra y heces de los corrales (pica), pero principalmente en el caso de los corderos, al amamantarse de ubres sucias y contaminadas con heces procedentes de animales adultos infectados. Los animales jóvenes y recién nacidos son los más sensibles de adquirir la infección, así como

los de diversas edades que se encuentran en pastoreo junto a los enfermos (Whittington *et al.*, 2004; Begg y Whittington, 2010).

Una vía importante de infección es la vertical, por vía transplacentaria de la madre hacia el feto, en donde, en animales infectados sin sign, se reporta una transmisión menor al 1%, sin embargo, en el caso de fetos de hembras con enfermedad clínica todas resultaron infectadas (Sweeney, 2011)

La contaminación por leche de animales con enfermedad clínica, es considerada como una importante vía de transmisión de la enfermedad, que juega un papel importante tanto en los programas de control, como en la posible vía de transmisión hacia el hombre y otras especies en el caso de consumo de productos lácteos al demostrarse la excreción del MAP por medio de leche y calostro (Moloney y Whittington, 2008; Whittington y Windsor, 2009; Grant, 2010).

La enfermedad a pesar de ser transmisible vía vertical o trans uterina, se ha confirmado que los embriones bovinos obtenidos de hembras donadoras positivos a MAP, no son una vía de transmisión de la infección, debido a los procedimientos de lavado estandarizados (Bielanski *et al.*, 2006; Perry *et al.*, 2006). Sin embargo, en casos avanzados se constituye en una bacteria que se difunde hacia otros órganos como la glándula mamaria (Kholet *et al.*, 2010).

#### 2.2.2.2. Patogenia

Una vez que la bacteria ingresa al tracto digestivo por la vía fecal-oral, continúa con su trayecto hasta alcanzar las células linfáticas de la mucosa y macrófagos del intestino delgado a nivel de íleon y linfonodos mesentéricos, en donde principalmente se desarrolla la patogenia de la enfermedad (Coussens *et al.*, 2010), las dosis orales infectantes de MAP estimadas para infectar a un cordero son de  $10^3$  UFC hasta  $10^9$  UFC, resultando en la colonización de la mucosa intestinal y linfonodos mesentéricos de corderos (Whittington *et al.*, 2000)

Una vez adquirido el MAP vía oral y dependiendo de las dosis ingeridas, la bacteria ingresa principalmente a los macrófagos intestinales y células M (blanco principal de MAP) y los linfonodos mesentéricos, son estos dos órganos los que actúan como reservorios de enfermedad durante la etapa silenciosa y subclínica, en la cual existe una mayor proporción del número de animales infectados. Los macrófagos intestinales y las células M, son las células blanco de infección del MAP, el cual ingresa por endocitosis en las células M de la

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

mucosa intestinal y transportado en vacuolas a los macrófagos en el tejido linfoide asociado del intestino. La sobrevivencia adentro de los macrófagos es una característica de MAP, quién inhibe la función fago-lisosomal de los macrófagos, esta habilidad de inhibir la fusión fagosoma-lisosoma es esencial para prevenir o evitar el reconocimiento de MAP por el sistema inmune de hospedador. MAP también puede usar su ingreso a las células dendríticas para alcanzar desde la mucosa otras células linfoides y macrófagos como estrategia de su difusión en el tejido linfático intestinal, donde MAP una vez adaptado a su vida intracelular es capaz de persistir y replicarse (Wu *et al.*, 2007; Coussens *et al.*, 2010).

En una etapa posterior, tanto la multiplicación como la destrucción intracelular del MAP en los macrófagos se da de forma simultánea, lo cual se refleja en una respuesta inmune celular mediante la producción de linfocitos T ayudadores (Th1), posterior a la etapa silenciosa de la enfermedad y en los estadios de la enfermedad subclínica, se desarrolla una fuerte respuesta de tipo inmune celular que incluye el reclutamiento de células Th1, CD4 y CD, y las células sanguíneas mononucleares secretan un alto nivel de citoquinas incluida la Interferón gamma ( Wu *et al.*, 2007; Coussens *et al.*, 2010), los niveles de interferón gama partir de los tejidos del ciego y los linfonodos cecales se incrementan en animales infectados en estadio subclínico (Lybeck *et al.*, 2011).

Uno de los rasgos característicos de MAP es la capacidad de conformar granulomas atípicos o únicos, hallados en las porciones terminales del intestino delgado, esto representa una respuesta tardía de la enfermedad, una estrategia de MAP para reclutar macrófagos y continuar replicándose o para alcanzar otros tejidos como los linfonodos mesentéricos y las células epiteliales de la glándula mamaria (Davis y Ramakrihnan, 2009; Coussens *et al.*, 2010). Estas lesiones granulomatosas son responsables de la inflamación y proliferación de la mucosa intestinal, por ende, la mala absorción de nutrientes, la pérdida de condición y adelgazamiento de los individuos, reducción en la producción de leche, deshidratación y muerte (Begg y Whittington, 2010)

En una segunda etapa o en la fase clínica de la enfermedad hay un decremento de la respuesta celular y hay un incremento de inmunidad humoral mediante la proliferación de células B como respuesta a los antígenos de MAP y generando altos títulos de anticuerpos (Pérez *et al.*, 1994; Singurdadottir *et al.*, 1999) Durante la transición de fase subclínica a la fase clínica de la enfermedad existe un acompañamiento de una marcada insensibilidad de las células B antígeno específicas. (Pérez *et al.*, 1994; Waters *et al.*, 1999). Es en esta etapa de la enfermedad, en donde hay una gran eliminación de bacterias por vía fecal, lo cual



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

puede suceder diariamente en animales con grado de lesión celular de tipo multibacilar (Whittington *et al.*, 2000).

### **2.2.3. Cuadro clínico y lesiones**

#### *2.2.3.1. Etapas de la enfermedad y Cuadro clínico*

El desarrollo clínico de la Paratuberculosis se caracteriza por cuatro etapas de desarrollo, las cuales corresponden a las lesiones y reacciones inmuno-patológicas que la enfermedad va desarrollando desde la infección hasta la presentación clínica severa y característica de la enfermedad en los animales. Las lesiones entéricas que dan origen a los principales signos clínicos de la enfermedad se desarrollan de los seis a 12 meses de la detección inicial del agente (MAP), aunque algunos animales pueden desarrollar lesiones severas desde los 12 meses de infección (Begg and Whittington, 2010; Dennis *et al.*, 2011).

Los signos característicos de la Paratuberculosis en estadios avanzados o finales de la se caracterizan por una pérdida progresiva de peso y emaciación inexplicable de ovinos de dos a tres años de edad o más, la presencia de diarrea en el caso de los ovinos no es común a diferencia de otras especies de rumiantes, observándose frecuentemente una pérdida en la consistencia de las heces, se observa un cuadro de hipoproteinemia caracterizado por edema submandibular y baja calidad de lana en razas que la poseen, no presenta respuesta a tratamientos.(Begg y Whittington 2010; Dennis *et al.*, 2011).

Las etapas del desarrollo de la Paratuberculosis tanto en ovinos como en bovinos son reportadas como similares, pudiéndose presentar cuatro etapas de acuerdo a su desarrollo: Etapa 1 o Infección Silenciosa.

En esta etapa los animales no presentan cuadro alguno de infección con MAP, principalmente en animales jóvenes y algunos adultos, no existe una técnica de rutina o análisis clínico patológico que apoye la detección de la enfermedad en estos ejemplares, sólo, en ocasiones con el cultivo de tejido post-mortem o mediante pruebas histopatológicas.

Etapa 2 o Enfermedad Subclínica.

En esta etapa se encuentran generalmente animales adultos portadores del MAP, no presentan sintología clínica alguna, en esta etapa existe desarrollo de anticuerpos y

respuesta inmune celular que pueden ser detectados, la mayoría son negativos al cultivo fecal (15% a 25% son positivos), aunque intermitentemente presentan liberación de microorganismos en heces. Muchos de estos ejemplares pasan lentamente a la fase 3 pero muchos de ellos no son detectados ya que son eliminados del hato o el rebaño por otras razones y no son diagnosticados para MAP. Los ejemplares de las etapas uno y dos también son considerados como asintomáticos.

#### Etapa 3 o Enfermedad Clínica.

Los signos clínicos aparecen como resultado de una larga incubación del MAP, baja productividad de los animales, pelo hirsuto, pérdida de la consistencia de las heces en forma ocasional y un inicio de desgaste gradual de la condición corporal sin una aparente disminución del apetito. Las lesiones histopatológicas pueden ser encontradas ocasionalmente en el tracto intestinal (íleon terminal). Los cambios séricos, de paquete celular y químicos no son específicos de la presencia de MAP, los animales pueden ser detectados positivos por medio del cultivo fecal de MAP y pruebas de PCR a partir de heces; presentan concentraciones detectables de anticuerpos para ser detectados por kits comerciales de ELISA e Inmunodifusión en Gel Agar. En ciertos casos raros algunos animales regresan al estadio dos de la enfermedad manteniéndose allí por un periodo, pero recayendo posteriormente.

#### Etapa 4 o Enfermedad Clínica Avanzada.

Los animales avanzan de la etapa tres a la cuatro en pocas semanas, principalmente al haber una demanda energética por parte del animal, como pueden ser la gestación, lactación periodos de secas y escasez alimenticia en potreros. Además del cuadro de emaciación progresiva, se presenta edema submandibular causado por hipoproteinemia, caquexia severa. La diseminación de MAP por tejidos es posible haciendo de la transmisión transplacentaria un medio de infección. Puede haber lesiones gastrointestinales presentes a nivel de hígado, nódulos linfáticos y tracto intestinal. La muerte se caracteriza por una severa deshidratación y caquexia, la mortalidad anual en rebaños con una infección que ha persistido por más de cinco años puede alcanzar más del 15% (Stehman y Shulaw, 2002; NRC, 2003; Bairnsdale y Bendigo, 2006; Dennis *et al.*, 201).

#### 2.2.3.2. Lesiones

Los tipos de lesiones macroscópicas o cambios anatómicos aparentes frecuentemente presentes al realizar una necropsia de animales infectados con MAP son en el caso de

ovinos: un engrosamiento de la pared intestinal la cual que puede variar, desde un ligero a un marcado engrosamiento, principalmente de la porción distal del íleon, los vasos linfáticos entéricos se observan prominentes, así como un incremento en las dimensiones y edema de los linfonodos mesentéricos (Bairnsdale y Bendigo, 2006; Dennis *et al.*, 2011). Presentan además de esto, lesiones consideradas como secundarias, la emaciación de la canal, presencia de ascitis, edema submandibular, hidropericardio y atrofia serosa de la grasa como consecuencia de una hipoproteinemia debida a la malabsorción de nutrientes; algunas cepas de MAP en ovinos "S" pueden producir un pigmento amarillo-naranja que puede resultar en lesiones intestinales café-amarillas (Chávez-Gris, 2005; Whittington, 2010). Sobre las lesiones a nivel celular o microscópicas (observadas mediante pruebas de histopatología), se observa una característica enteritis granulomatosa, la cual se caracteriza por un acumulo de macrófagos y células epitelioides a nivel de lámina propia, submucosa e incluso en algunas ocasiones a nivel de la serosa (figura 1).

Se consideran principalmente dos distintas formas de presentación o tipo de lesiones, las cuales están relacionadas con la signología que pueden presentar los animales con enfermedad clínica: las lesiones paucibacilares las cuales muestran una infiltración linfocítica localizada con algunas células epitelioides y un escaso número de organismos acido-básicos (figura 2); relacionadas con signos iniciales de la enfermedad clínica en los animales y las lesiones multibacilares, en donde se presenta extensiva infiltración de células epitelioides en la mucosa y en la submucosa, abundantes macrófagos y células gigantes, con numerosos organismos acido-básicos presentes dentro de los macrófagos (figura 3). (Estévez *et al.*, 2006; Gillan *et al.*, 2010; Dennis *et al.*, 2011)

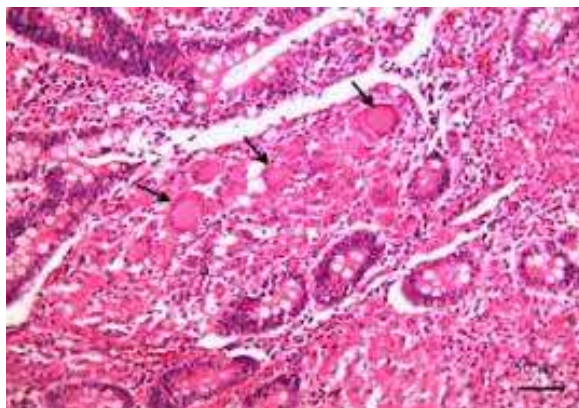


Figura 1. Antecedentes: Lesión en mucosa de íleon, Inflamación granulomatosa, células epitelioides y células gigantes multinucleadas (flechas), tinción H-E (Ramírez *et al.*, 2011).

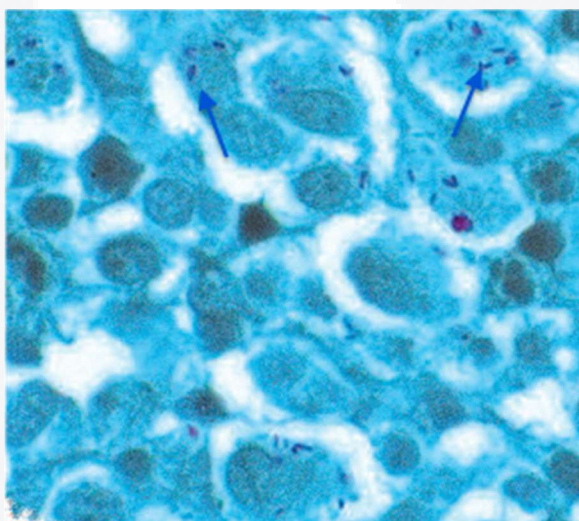


Figura 2. Antecedentes: Lesión Pausibacilar en donde se aprecian algunos BAAR de color morado (flechas) Tinción Z-N / Verde Brillante. 1000 aumentos.

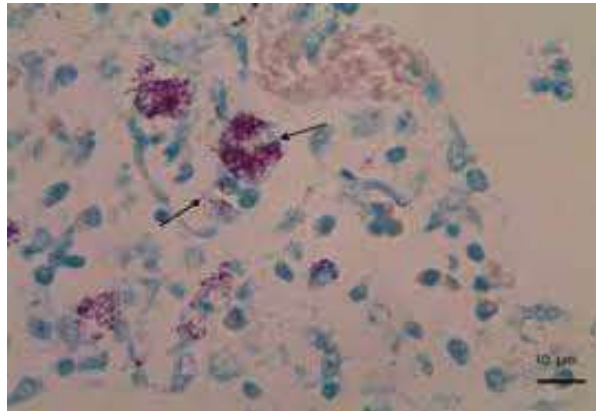


Figura 3. Antecedentes: Lesión multibacilar en Íleon, bacilos ácido alcohol resistentes en la mucosa (flechas). Coloración de Ziehl Neelsen. (Ramírez et al., 2011)

Pérez *et al.*, (1996) propuso otra clasificación para categorizar las lesiones, la cual fue retomada por otros autores en diversos trabajos (NRC, 2003; Chávez-Gris, 2005; González *et al.*, 2005):

Tipo 1: Se observan agregados focales de macrófagos, formando pequeños granulomas en el tejido linfoide a nivel de íleon, sin organismos ni lesiones visibles.

Tipo 2: Los animales presentan lesiones extensivas en el tejido linfoide íleal, con granulomas extendidas hacia la submucosa, con presencia de microorganismos a nivel histológico, pero sin lesiones macro visibles.

Tipo 3a: Se observa un engrosamiento visible de la mucosa intestinal a nivel de íleon, hay presencia de granulomas grandes multifocales en la lámina propia, submucosa y serosa del íleon y nódulos linfáticos, con lesiones extendidas hacia el yeyuno y con presencia clara de organismos a nivel histopatológico.

Tipo 3b: Presencia de numerosos macrófagos y algunas células gigantes multinucleadas dispersas en forma de mosaico a través de la submucosa y lamina propia, creando fusiones en vellosidades, marcado engrosamiento del intestino con presencia abundante de organismos.

Tipo 3c: Se observa una enteritis difusa granulomatosa es presente en esta categoría, con marcados linfocitos infiltrados, además de bien definidos granulomas y células gigantes dispersas por las lesiones. En los nodos linfáticos hay presencia de granulomas y áreas focales de necrosis por células gigantes.

#### 2.2.4. Diagnóstico

Los signos clínicos de la enfermedad en ovinos y en los demás rumiantes son insuficientes para realizar un diagnóstico confiable de la presencia o ausencia de la enfermedad, esto es complicado aún con la aplicación de todos los métodos diagnósticos empleados para identificar a animales domésticos con paratuberculosis, se tiende a subestimar la prevalencia real de la enfermedad, debido a la dificultad de identificar a los animales infectados en estadio subclínico (Begg and Whittington, 2010; Windsor, 2014).

Para poder hacer un adecuado diagnóstico se debe considerar que las presentaciones clínicas, la interpretación de resultados de diferentes diagnósticos, los métodos y resultados del aislamiento de la bacteria varían de acuerdo a la especie que estemos trabajando bovinos, ovinos o caprinos, la edad en que fue infectado el individuo y la edad en que se presenta cuadro clínico, así como por la severidad de la infección en cada uno de ellos o el estadio en que se presenta la enfermedad, se requiere el uso de diversas pruebas diagnósticas para realizar un diagnóstico confiable, además de que un solo resultado diagnóstico no es suficiente para todos los propósitos dentro de esta enfermedad (Begg y Whittington 2010; Northon *et al.*, 2010; Collins, 2011), actualmente se emplea un gran número de estudios y métodos diagnósticos como son: serológicos como IDGA y ELISA, cultivo, identificación del agente por tinciones de Zeihl-Neelsen y PCR para identificación de la bacteria, además de la identificación de lesiones por vía de necropsias, histopatología entre otros (Pérez *et al.*, 1996; Chávez-Gris, 2005).

Los animales infectados frecuentemente diseminan el microorganismo meses antes de que sean detectadas respuestas inmunológicas a la enfermedad, y ambos eventos, la eliminación del microorganismo por heces y la respuesta inmune son de presentación intermitente, por lo que la mayoría de los sistemas de diagnóstico de la enfermedad presentan una mayor confiabilidad durante el estadio de la presentación clínica de la enfermedad. Siendo así que la mayoría de los análisis diagnósticos de la enfermedad son efectivos a nivel de rebaño y en menor grado a nivel de individuo. Actualmente las pruebas basadas en el polimorfismo genético de la bacteria mediante PCR y otras han logrado un gran auge y buenos resultados en su aplicación, y siendo más ampliamente empleada por sus resultados en un menor tiempo que el requerido para el cultivo y aislamiento bacteriano considerado prueba "Gold Standard" (Sezzi *et al.*, 2007; Kawajii *et al.*; 2011).

#### 2.2.4.1. Diagnóstico por lesiones

El diagnóstico por medio de la identificación de lesiones histopatológica ha sido confirmado en un 90% de los casos de animales que presentan signo de enfermedad en rebaños conocidos como infectados siendo este diagnóstico en el caso de animales muertos, más eficaz que otras de las pruebas, debiendo enfatizar que no existe una relación directa entre animales positivos a histopatología y animales positivos a frotis con Zhiel-nielsen, lo cual indica que no hay forzosamente presencia de bacteria en el lumen intestinal, a pesar de existir lesiones confirmadas en el caso de cabras (Tafty y Radishi, 2000; Collins, 2011).

#### 2.2.4.2. Diagnóstico por Pruebas serológicas

Para el diagnóstico serológico, han sido desarrolladas tres diferentes para medir los niveles de anticuerpos contra MAP a partir de sueros de animales infectados han sido desarrollados, ELISA (Ensayo Inmunoabsorbete Ligado a una Enzima), IDGA (Inmuno difusión en gel agar) y Fijación de Complemento; con respuesta similar en especies como bovinos, ovinos, caprinos, ciervo rojo entre otros. Se han realizado diferentes estudios y resultados a lo largo de las últimas dos décadas, siendo concordantes y discrepantes sobre la capacidad de realizar un diagnóstico acertado de animales infectados con MAP. Existe un fuerte interés en el desarrollo de pruebas diagnósticas que permitan identificar a aquellos animales infectados, durante estadios tempranos de la enfermedad fundamentados en el estudio de la inmunidad por mediación celular, como son las nuevas pruebas de interferón gamma ELISA (Roobbe-Austerman *et al*, 2007), estas pruebas se han propuesto como una alternativa de diagnóstico para animales jóvenes, o en animales con infección en un periodo subclínico. El desarrollo de esta técnica en estadios tempranos de la enfermedad, tanto en ovinos como en bovinos ha demostrado ser una buena alternativa, sin embargo, algunos estudios han mostrado inconsistencia con los resultados esperados lo cual no los hace concluyentes (Pérez *et al.*, 1999; Storset *et al.*, 2005; Bosward *et al.*, 2010). La especificidad de las pruebas de diagnóstico por ELISA e IDGA, son específicas para el 90% de los casos clínicos presentes. Sin embargo, son sensibles al 41% hasta el 50.9%. ELISA es altamente específico en animales con lesiones histopatológicas multibacilares, la sensibilidad varía entre individuos por efectos de: rebaños, de condición corporal y la categoría de lesión presente en los tejidos, siendo la sensibilidad de la prueba dependiente principalmente del estadio de la enfermedad (Sergeant *et al.*, 2003; Nielsen, 2010). Para su realización la prueba de ELISA, la reabsorción con antígenos de *Mycobacterium phlei*, ayuda a mejorar

la sensibilidad de la prueba eliminando a los anticuerpos no específicos contra micobacterias ambientales eliminando así a los posibles falso positivos. Varios estudios, actualmente reportan que, para la detección de la PTB en ovinos, mediante el uso del método de ELISA, se presenta una sensibilidad de 16% a 85% y una especificidad de 97% a 100% (Nielsen y Toft, 2008; Nielsen 2010). La inmunodifusión en agar-gel (IDGA), aparece como una de las pruebas serológicas con mayor sensibilidad (arriba del 80%) en individuos que presentan el cuadro clínico. No existiendo una correlación completa entre ELISA e IDGA, no se presentan diferencias entre ELISA y IDGA para el diagnóstico de ovinos con lesiones histopatológicas de paratuberculosis, ambas son altamente sensibles cuando los ovinos presentan lesiones multibacilares 86 a 100%, pero cuando hay lesiones paucibacilares la sensibilidad es de 10 al 30% (Clarke *et al.*, 1996). ELISA es la prueba de elección para evaluación de rebaños en programas nacionales de control de la enfermedad (NRC, 2003; Nielsen y Toft, 2008).

#### 2.2.4.3. *Diagnóstico por Cultivo y aislamiento bacteriano*

El cultivo y aislamiento bacteriano es la técnica de diagnóstico denominada “Gold estándar”, se emplea previamente incluso para la aplicación posterior de pruebas de identificación genética por PCR. Desde que se implementó la técnica de Cultivo bacteriano, los protocolos de cultivo y los diversos medios empleados para ello, han sido modificados por el hecho de que el MAP es una bacteria de larga incubación para su cultivo y aislamiento (de Juan *et al.*, 2006). El Cultivo además ha demostrado en diversos estudios, ser más específico que ELISA para el diagnóstico de la paratuberculosis (Whitlock *et al.*, 2000; Whittington, 2010). El cultivo fecal en pool (cultivo que mezcla las heces de varios ejemplares) es normalmente positivo en rebaños que presentan animales con cuadros de emaciación o altas mortalidades o indicadores clínicos con presencia de enfermedad y sus resultados son empleados incluso como estimadores de la prevalencia de la enfermedad. (Toribio y Sergeant, 2007; Dhand *et al.*, 2007). El aislamiento y cultivo del microorganismo en ovinos es extremadamente difícil con el uso de medios usados para bovinos, siendo en rebaños ovinos que el cultivo fecal detecta menos del 8 al 12% de los casos clínicos y requiere más de 12 meses para su incubación (Whittington, 2010), debido a que es necesario un gran número de microorganismos presentes en heces para poder realizar el aislamiento y cultivo en comparación a los bovinos y caprinos. por lo que, para el cultivo de la cepa de ovinos, se recomienda el uso del medio de Löwenstein-Jensen, adicionado con micobactina y sin



piruvato (NRC, 2003; Chávez *et al.*, 2008). Es necesario el uso de antibióticos en los medios para evitar el crecimiento de otras bacterias y hongos contaminantes debido al prolongado tiempo de cultivo e incubación para el crecimiento de MAP, pues no hay diferencia en usar medios como el Herrold con yema de huevo o el Löwenstein-Jensen en referencia al grado de posible contaminación durante la incubación de las muestras de MAP (Nielsen *et al.*, 2004; Whittington, 2010). Se debe considerar tanto que la etapa de la enfermedad, así como el tipo de lesión presente ya sea multibacilares o paucibacilares, tiene impacto en la cantidad de excreción de bacterias vía fecal, esto para que el muestreo de heces y su cultivo sea efectivo ya que la cantidad de excreción de cantidades de MAP depende de la forma de la enfermedad, en casos multibacilares el diagnóstico llega a ser de 98% mientras que en los paucibacilares es de 48% (Whittington *et al.*, 2000). Las muestras de Heces para cultivo pueden congelarse desde 0 – 4° C para conservarlo en cortos periodos de tiempo 48 h, y hasta los -70° C para periodos de tiempo más largos (3 meses) sin perder viabilidad en su cultivo (Khare *et al.*, 2008).

#### 2.2.4.4. Diagnóstico por Reacción de cadena polimerasa

La prueba de Reacción de Cadena Polimerasa (PCR) es el método diagnóstico por medio de la identificación de DNA, consistente en la identificación de secuencias presentes solamente en MAP no en MAA, mediante el uso del gene rRNA 16S y la inserción del elemento IS900. Variaciones sobre el estudio del elemento IS900 y sus diferentes 14 a 17 inserciones en el genoma del MAP ayudan a su diagnóstico. En algunos estudios que buscan diferenciar al MAP del complejo *Mycobacterium avium intracellulare*, así como de identificar las cepas C y S, se emplean las pruebas de PCR mediante el uso de las inserciones IS900 e IS901 (Collins *et al.*, 2002; Chávez, 2004; Doosti y Moshkelano, 2010; Bolske y Herthnek, 2010). El resultado de diagnóstico de MAP por medio PCR en heces, mediante la identificación del fragmento IS900 es igual de sensible a los resultados del coprocultivo lo cual apoya a un diagnóstico más rápido de la presencia del agente (Kawagy *et al.*, 2007). A diferencia del diagnóstico en bovinos, y caprinos en donde el crecimiento de colonias en cultivo es mayor al presente en ovinos, la sensibilidad que presenta el diagnóstico por PCR es mucho mayor que el cultivo fecal de heces de ovinos en medios no específicos para la cepa de MAP (“S”). Las conclusiones presentadas en trabajos en donde se comparan los métodos de cultivo y las de PCR, si bien es una prueba más rápida de realizarse y con una mayor especificidad, aún debe ser más sensible para poder ser usado

en lugar del diagnóstico por cultivo en programas de control de la enfermedad, quizás debido a la eliminación intermitente del agente en animales positivos a la enfermedad (Sezzi *et al.*, 2007; Bolske y Herthnek, 2010).

**2.2.4.5. Comparativo de pruebas diagnósticas**

La sensibilidad del diagnóstico de la paratuberculosis, considerando las diferentes pruebas diagnósticas en las diferentes etapas de presentación de la paratuberculosis de presentan en el cuadro 3 y 4 de acuerdo al National Research Council (2003).

	<b>Etapas 1 (Subclínica)</b>	<b>Etapas 2 (Subclínica)</b>	<b>Etapas 3 y 4 (Clínicas)</b>
Signos de enfermedad	NO	NO	SI
Cultivo fecal	NO	PROBABLE	SI
PCR	NO	PROBABLE	SI
Presencia de Bacterias ácido alcohol (Frotis etc.)	NO	PROBABLE	SI
Gama- interferón	PROBABLE	SI	PROBABLE
Serología	NO	PROBABLE	SI

Cuadro 3. Posibilidad de diagnóstico de la enfermedad de Johne conforme a las etapas de enfermedad (NRC, 2003).

PRUEBA	ESPECIES	ETAPA	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD	COSTO	TIEMPO
--------	----------	-------	--------------	---------------	-------	--------

Cultivo fecal	Todas	2,3,4	Moderada	Alta	Medio	Meses
PCR	Todas	2,3,4	Baja	Alta	Alto	Horas
Bacilo Acido	Todas	3,4	Baja	Moderada	Bajo	Horas
Interferón gama	Bov, Ovin, Cap.	2,3	Moderada	Moderada	Alto	Días
ELISA	Bov, Ovin, Cap, Alpaca, Venado	2,3,4	Baja-alta	Moderada	Bajo	Horas
Inmunodifusión en gel agar	Bovino	3,4	Baja-Media	alta	Bajo	Horas

Cuadro 4. Comparación de test de diagnósticos para la enfermedad de Johne (NRC, 2003).

**2.2.5. Epidemiología e impacto económico**

*2.2.5.1 Prevalencia de la enfermedad*

La Paratuberculosis es una de las enfermedades de más amplia distribución mundial, considerada por muchos la enfermedad infecciosa más seria que actualmente afecta a las industrias ovinas, bovinas y caprinas mundiales, dado el frecuente carácter subclínico de la infección. Se sospecha que se reportan menos casos de los que en realidad existen, aun cuando se trate de una enfermedad de reporte obligatorio en diversos países (Barkema *et al.* 2010).

Por cada caso clínico avanzado que es observado, se estima un número de 6 a 10 animales en diferentes estadios de la enfermedad en el rebaño o hato, haciendo de esta enfermedad una presentación denominada de comportamiento de iceberg (Menzies, 1998), por lo que para conocer la enfermedad es necesario contar a los animales afectados o cantidad de enfermedad, así como definir cuando y donde ocurre la enfermedad en forma bien delimitada; el número relativo de animales enfermos con el tamaño de la población en riesgo o “La población que es naturalmente susceptible de enfermarse” (Trusfield, 2005). Se han hecho diversos estudios a lo largo del mundo para conocer la prevalencia de la PTB en diferentes especies y lugares como Estados Unidos, Australia, Europa, y Latinoamérica, tanto a partir de cultivos bacterianos como por pruebas serológicas de detección de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

anticuerpos principalmente ELISA (Coelho *et al.*, 2007; Nielsen y Toft, 2008). La comparación de estudios de prevalencia a lo largo del mundo es difícil por la variedad de métodos de muestreo y diagnóstico empleados, variables consideradas, así como que algunos estudios presentan el cálculo de la prevalencia verdadera al ajustar la seroprevalencia por factores como la sensibilidad y especificidad de la prueba a partir de la prevalencia aparente (Boelaert *et al.*, 2000; Ikonopoulus *et al.*, 2007; Begg y Whittington, 2010).

#### 2.2.5.2. *Presencia de MAP en animales silvestres y no rumiantes*

La paratuberculosis es bien conocida como una enfermedad que afecta a los rumiantes silvestres, sin embargo, afecta a una gran variedad de otras especies y fauna silvestre, incluso no rumiantes, se ha demostrado que aun entre especies silvestres en EU se han aislado varios subtipos de MAP, lo cual sugiere la transmisión inter-especies de cepas específicas. (Motiwala *et al.*, 2004). La presencia de reservorios en animales silvestres, con el potencial de transmitirlos a rumiantes domésticos susceptibles puede impactar en los programas de control que puedan implementarse, aunque la frecuencia de contagio entre especies silvestres como lagomorfos, canideos, mustélidos y múridos para con las especies domesticas no está documentado aunque hay varios casos reportados (Motiwala *et al.*, 2004, Salgado *et al.*, 2011), El MAP puede permanecer en diferentes especies de rumiantes silvestres de los cuales ha sido aislado, como son venado cola blanca, borregos cimarrón, cabras de las montañas rocallosas, llamas, bisontes y alces. También está presente en monogástricos como perros, cerdos y macacos, los cuales se cree pueden ser un importante reservorio y vía de infección de rumiantes de granja (Mackintosh y Friffin, 2010; Singh *et al.*, 2011; Maio *et al.*, 2011).

#### 2.2.5.3. *Impacto económico*

La PTB es prevalente en los rumiantes domésticos a lo largo de todo el mundo, teniendo un impacto importante en la economía, tan solo en los Estados Unidos las pérdidas son calculadas en 1.5 billones de dólares en la industria pecuaria cada año, sin embargo, a pesar del impacto en la producción, el medir el costo individual de pérdidas en cada explotación es complicado por lo que no ha sido estimado en muchas regiones, por lo que se han desarrollado modelos matemáticos que pueden estimar el impacto económico de la enfermedad (Bennet *et al.*, 2010; Lombard *et al.*, 2011), en México se ha estimado que el

costo de pérdida total por vaca a causa de la paratuberculosis en establos lecheros de \$8,849 a \$10,409 pesos por vaca (Miranda, 2008). En ovinos no se han realizado estudios específicos, sin embargo se ha estimado que el impacto de la enfermedad en la producción, incide en la reducción del peso vivo, disminuye la cantidad y calidad de lana, reduce el número de corderos nacidos por hembra y el peso de estos tanto al nacimiento como al destete, la tasa de reemplazo se incrementa al desechar a las hembras a una edad más temprana e incrementa los costos veterinarios de la explotación (Morris *et al.*, 2006; Manning y Collins, 2010)

#### **2.2.6. Salud Pública**

EL aislamiento de MAP en pacientes humanos con enfermedad de Crohn ha dado la pauta de considerar a esta bacteria como causante de esta patología, aunque es algo controversial aun en diversos estudios, con lo cual es un elemento a considerar como importante dentro de la salud pública y la posible zoonosis que esto implica. (Sechi *et al.*, 2005; Behr, 2010). Dentro de esta problemática, está el encontrar la bacteria en leche pasteurizada en forma viable, reportando así la resistencia de MAP a procesos de pasterización, entre otros, lo cual lo convierte a los lácteos en una posible fuente de infección con impacto en la salud pública y los riesgos que esto presenta dentro de la cadena e inocuidad alimenticia (Nebbia *et al.*, 2006; Favila *et al.*, 2010).

#### **2.2.7 Control de la Paratuberculosis**

Desde que se han implantado programas de control para la Paratuberculosis, el manejo es considerado como la más importante herramienta. Sin embargo, las recomendaciones de administración, instalaciones y manejo suelen fallar cuando se hacen en forma global y no en forma individualizada para cada una de las granjas o explotaciones (Robee, 2011), las practicas específicas de manejo han sido ampliamente revisadas en cualquier lugar y muestran la necesidad de contar con “Buenas Prácticas Ganaderas”, como se denomina actualmente a los programas para cría y manejo en las granjas; considerando Como factores de vital importancia la limpieza de la granja y sus pasturas, el evitar la contaminación con excremento de comida e instalaciones, evitar el contacto entre animales

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

jóvenes y enfermos, así como la presencia de animales silvestres o no en la granja y/o en sus bodegas, las formas de emplear el excremento como abono natural en praderas y parcelas de cultivo de forrajes y alimento para los animales (Bakker, 2010; Whitlock, 2010; Kennedy y Lorna, 2010; Eppleston *et al.*, 2011; Pribylova *et al.*, 2011). Un programa de control para paratuberculosis exitoso, debe considerar las fuentes potenciales de infección y las rutas de transmisión del agente. Debido a que MAP es capaz de sobrevivir por tiempos prolongados en el ambiente, pero en forma finita, se deben considerar tiempos amplios de descontaminación de praderas y pastizales mediante el descanso y no pastoreo de éstas, o la implementación de alternativas de pastoreo con especies no sensibles, así como el evitar la contaminación de MAP a través de las heces de áreas sombreadas. (Whittington *et al.*, 2004). Algunos métodos alternos han sido propuestos sin resultados concluyentes como es el uso de monensina sódica en alimento de becerras principalmente (Hendrick *et al.*, 2006<sup>a</sup> y 2006<sup>b</sup>). Una de las herramientas críticas de los programas de control para el control y la erradicación de la PTB, es la prueba de rebaño mediante la aplicación de ELISA en conjunto con el cultivo Bacteriano, pudiendo determinar así el grado de prevalencia de la enfermedad, y la eliminación de la bacteria dentro del rebaño. Posteriormente se eliminan los animales positivos a las pruebas del rebaño, mostrando una significativa reducción de la exposición de los animales jóvenes a la fuente de infección que son los animales enfermos (NRC, 2003). El uso de una vacuna que prevenga la infección de MAP, puede ser una meta a alcanzar dentro de los programas de prevención de la enfermedad, esto se ha trabajado por mucho tiempo y por varios investigadores, sin embargo, las vacunas disponibles actualmente no han sido completamente efectivas previniendo la enfermedad tanto en ganado de leche que es donde se pone mayor interés en el desarrollo de estas alternativas de control, como en ovinos y caprinos (Bastida y Juste, 2011; Patton, 2011). Sin embargo, el uso de la vacuna ha mostrado una protección parcial reduciendo la cantidad de bacteria que es eliminada por el animal enfermo, disminuye el número de animales clínicamente afectados, así como el número de animales positivos a las pruebas serológicas y de cultivo bacteriano (Juste *et al.*, 2009; de Lisle, 2010), mayor investigación acerca del desarrollo de una mejor vacuna se está desarrollando para que esta sea más eficiente, sin afectar pruebas diagnósticas tanto de la PTB como de otras enfermedades, contando, empleado la diversidad de herramientas actuales (Huygen *et al.*, 2010).

#### **2.2.8.- Factores de riesgo**

Con la finalidad de determinar aquellos elementos que participan en el desarrollo y transmisión de una enfermedad y con ello tener herramientas que permitan establecer políticas y prácticas de control de la enfermedad tanto a nivel rebaño como a nivel regional, una de las herramientas que se han usado ampliamente en los estudios epidemiológicos es la Identificación de “Factores de riesgo,” en donde se busca relacionar la frecuencia de presentación de una determinada enfermedad con la existencia o no de aquellos elementos y/o actividades que predisponen o facilitan la transmisión y desarrollo de la enfermedad en cuestión (Trusfield, 2005).

Para el caso específico de la Paratuberculosis, han sido determinados una variedad de factores de riesgo que afectan la presentación de la paratuberculosis en las diferentes especies de rumiantes a lo largo de diferentes estudios, para con ello ampliar el conocimiento de los elementos que predisponen tanto la infección del agente, como de presentación de la enfermedad, pudiendo establecer protocolos de control de la enfermedad como medidas de manejo de los diferentes hatos y rebaños; estos estudios analizan la presencia o no de diversos factores, así como la prevalencia de la enfermedad, pudiendo determinar la interrelación entre estas variables y el grado de presentación de la enfermedad (Berghaus *et al.*, 2005; Dhand *et al.*, 2007). De acuerdo a lo expresado por Dhand y colaboradores (2007), existen pocos trabajos en la literatura, relacionados con la identificación de factores de riesgo en ovinos y los resultados de estos. Es posible que los factores de riesgo identificados en estudios hechos en bovinos de leche sean indicadores que orienten diversos manejos dentro de la granja que faciliten o incrementen el riesgo de infección de la PTB para otras especies (Pillards *et al.*, 2011).

Dentro de algunos estudios realizados en explotaciones de ovinos, los componentes que se hallaron como de importancia para el desarrollo de la paratuberculosis son: la contaminación de pasturas, ya que se encuentra a menudo en muestras de suelo, pero con menor frecuencia en forrajes recolectados y ensilajes, esto debido a que se prefiere esparcir el estiércol en los campos utilizados para la cosecha de cultivos a esparcirlo en pastizales donde la bacteria encuentra un sitio ideal de contaminación (Dhand, 2007; Whitlock, 2010). La influencia de la nutrición, la disposición de nutrientes en las praderas a pastorear, así como una baja condición corporal, son elementos que pueden predisponer un incremento en la presentación de la enfermedad, así como una mayor eliminación de la bacteria por heces y por consiguiente una mayor contaminación de las pasturas (Dhand, 2007).

La edad temprana de infección ha sido ampliamente demostrada como un elemento importante en la patogenia de la enfermedad ya que este punto, junto con la cantidad e bacteria que sea ingerida, tiene un impacto en la presentación de la enfermedad (Begg and Whittington, 2010; Dennis *et al.*, 2011) Aunque la transmisión vertical y vía semen ha sido demostrada también sobre todo en hembras con una fase clínica de la enfermedad en donde la diseminación de la bacteria se da hacia diferentes órganos del animal y es secretado por medio de la glándula mamaria hacia la leche, la cual se convierte en un potencial medio de contaminación e infección hacia las crías jóvenes (Khol, 2010; Favila, 2010; Mutharia, 2010). El tamaño del rebaño, así como la tasa de animales por metro cuadrado, es considerado un factor importante, dado que, al incrementar la densidad de la población, se eleva el potencial de eliminación y de contaminación de la bacteria, además de que esto puede desembocar en una situación de estrés alimentario (Dhand, 2007), la climatología y la época del año, no tiene un impacto importante directamente en los factores asociados, esto elementos tiene relación con la calidad y disposición de las pasturas y praderas como se refirió anteriormente. Igualmente, no se hallaron efectos significativos de que la época del año o temperaturas ambientales tengan un impacto en el diagnóstico serológico, por cultivo, por lo que no se estima que la época del año tenga un efecto en el comportamiento de la enfermedad en bovinos. (Strickland *et al.*, 2005). El tipo de suelo y fertilización pueden tener un impacto, sin embargo, no se ha estudiado la correlación y efecto que pudiesen tener estos elementos (Lugton, 2004)

Considerando la interacción existente entre los micronutrientes presentes en la dieta de los rumiantes y el efecto de estos en el sistema inmune, en revisiones de estudios a lo largo del mundo se ha demostrado una mayor presencia y correlación de animales enfermos de Paratuberculosis en áreas con los suelos ácidos, quizás por la baja disponibilidad de micronutrientes en las plantas que crecen en este tipo de suelos (Dhand, 2007; Michel y Bastianello, 2000; Lugton, 2004).

Por otro lado, la contaminación de fuentes de agua y la persistencia del MAP en ellas, se ha considerado como una potencial fuente de infección y reservorio para animales susceptibles y posiblemente el hombre (Whan *et al.*, 2005). Diversos estudios han demostrado la viabilidad el MAP por más de 250 días en agua o incluso hasta 100 días aproximadamente en superficies de diversos materiales que retienen la bacteria a través de una biocapa de agua, los cuales se emplean para la construcción de la infraestructura de las granjas (Cook *et al.*, 2010). Otro de los elementos que se han determinado además



de la capacidad de la bacteria de sobrevivir en el medio en forma exitosa, es la capacidad de transmitirse entre las diversas especies de rumiantes, así como el mantenerse en los posibles reservorios en donde se han identificado la bacteria como son la fauna silvestre, conejos, roedores, e incluso protozoarios como amibas de vida libre (Moloney y Whittington, 2008; Mackintosh y Griffin, 2010; White *et al.*, 2010). Con esto se puede observar el que el control de la Paratuberculosis debe ser una suma de acciones persistentes a corto y largo plazo orientadas a cortar la transmisión y presentación de la enfermedad de acuerdo a las circunstancias y factores presentes en cada explotación región y país.



### 3 HIPÓTESIS

La presencia del *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* y una elevada seroprevalencia en rebaños ovinos del Valle de Aguascalientes, está asociada a los factores de riesgo presentes en los rebaños.



## 4 OBJETIVOS

### 4.1. OBJETIVO GENERAL

Estimar la seroprevalencia relativa a MAP, e identificar la presencia de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, a través de estudios anatomopatológicos, cultivo bacteriano y PCR en ovinos con cuadro clínico sugerente a Paratuberculosis, así como determinar los principales factores de riesgo asociados a la seroprevalencia en rebaños ovinos seleccionados del Valle de Aguascalientes.

### 4.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

-Estimar la frecuencia de ovinos seropositivos a *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, en rebaños ovinos seleccionados del estado de Aguascalientes.

-Identificar la presencia de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en rebaños ovinos, por medio de estudios anatomopatológicos, aislamiento bacteriano y pruebas de PCR, a partir de muestras obtenidas de animales con presentación de cuadros clínicos sugerentes a paratuberculosis.

-Determinar los factores de riesgo asociados a la frecuencia de animales seropositivos a MAP en rebaños seleccionados del estado de Aguascalientes.

## 5 MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. UBICACIÓN DEL ESTUDIO

El estado de Aguascalientes esta localizado en la región Centro-Norte de la República Mexicana, a una altitud de 2,217 msnm, con una temperatura promedio de 16.9°C y una precipitación pluvial promedio de 475 mm al año, la cual, fue estacional presentándose únicamente en el verano, el clima es templado, semiárido y extremoso, BsKw (w) (e) de acuerdo a la clasificación de Köeppen modificada por García, 2004.

El Valle central de Aguascalientes, conformado por los municipios de Aguascalientes, Rincón de Romos, Jesús María, San Francisco de Los Romo, Pabellón de Arteaga, Asientos y el Llano; es la región geográfica donde tiene su mayor impacto la actividad pecuaria del estado) y donde se conjunta el mayor número de unidades de producción o rebaños, afiliados a la “Asociación ganadera local especializada de ovinocultores y caprinocultores de Aguascalientes “(figura 1).

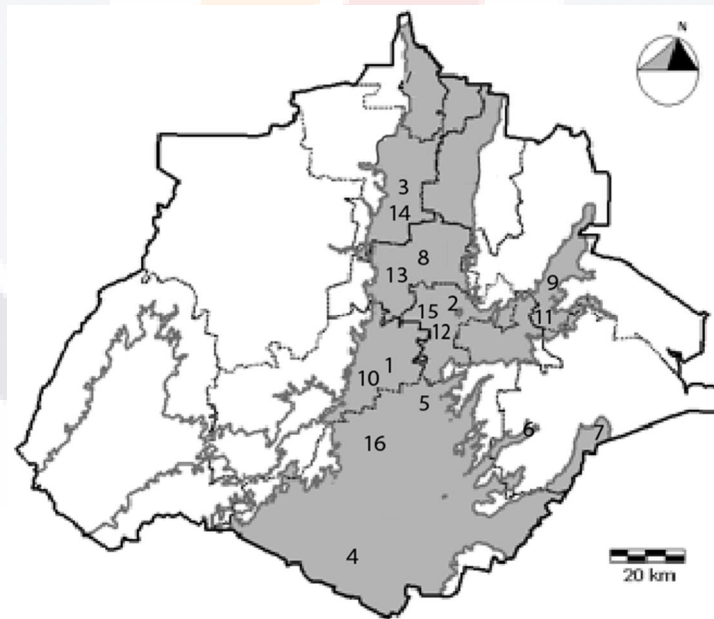


Figura 4. Ubicación de las 16 unidades de producción ovina incluidas en el estudio dentro del Valle central de Aguascalientes (área sombreada <2000 msnm) y municipios del estado correspondientes: Aguascalientes (rebaños 4,5,6,16), Asientos (rebaños 9,11), El Llano (rebaños 7), Jesús María (rebaños 1,10), Pabellón de Arteaga (rebaños 8,13), Rincón de Romos (rebaños 3,14), San Francisco de los Romo (rebaños 2,12,15).

## 5.2 DISEÑO DEL ESTUDIO

Este estudio de tipo “Transversal” donde la unidad de estudio es “El rebaño”, y con un muestreo “por conveniencia” de dieciséis rebaños o unidades de producción ovina que cubrieron los criterios de inclusión definidos y considerando la totalidad de animales adultos de cada rebaño como aquellos mayores a un año de edad (Thrusfileld, 2005).

## 5.3 SELECCIÓN DE LOS REBAÑOS

Los rebaños ovinos y los ejemplares seleccionados para conformar la población muestra del presente estudio, se obtuvieron a partir del listado de los productores de ovinos agremiados en la Asociación Ganadera Local de Ovinocultores y Caprinocultores de Aguascalientes, en donde se cuenta con un total de 104 productores y un aproximado de 2951 cabezas de ovinos hasta enero de 2009 (AGLOYCA 2010), de los cuales se seleccionó a 16 rebaños, empleando el método no probabilístico “por conveniencia” (Thrusfileld, 2005) que cumplieron con los criterios de inclusión que se enlistan a continuación:

- A.- Participaron sólo aquellos productores organizados y asociados a la AGOLYCA (Asociación ganadera local de ovinocultores y caprinocultores de Aguascalientes) y cuyos rebaños se encuentren en el área descrita.
- B.- Explotaciones con dedicación a la cría de ovinos, no solo a engorda o comercialización.
- C.- Contar con identificación individual adecuada de cada animal.
- D.- Existir disposición e interés de los propietarios a participar en el estudio, así como para la toma de muestras de la totalidad del rebaño adulto.

Los dieciséis rebaños seleccionados de acuerdo a estos criterios de inclusión en el momento del estudio, contaron con un rango de 62 hasta 340 animales adultos (> 1 año edad), conformando una población total del estudio de 2,415 ovinos. El tamaño de población, ubicación y raza explotada, así como el haber tenido la presentación de animales enfermos con cuadros clínicos sugerentes a Paratuberculosis (PTB), se presentan en el cuadro 5.

Unidad de producción:	Ubicación (mpio.)	Núm. Adultos	Razas explotadas	Antecedentes de Casos sugerentes a PTB
1	Jesús María	80	Black belly/ Polipay	si
2	San Francisco de Los Romo	167	Black belly/ Romanov/ Cruzas pelo	Si
3	Rincón de Romos	160	Black Belly	Si
4	Salto de Los Salado	169	Dorper(x)/Katahdin	Si
5	Aguascalientes (Nte)	62	Katahdín/cruzas pelo	Si
6	Aguascalientes (sur)	340	Cruzas Pelo	Si
7	El Llano	326	Katahdín/Dorper	Si
8	Pabellón de Arteaga	60	Katahdín	no
9	Asientos	140	Cruzas pelo	Si
10	Aguascalientes (Poniente)	194	Katahdín, Black Belly y Cruzas de Pelo	Si
11	Asientos B	160	Cruzas de pelo	Si
12	San Francisco de los Romo B	99	Black belly	Si
13	Pabellón de Arteaga B	66	Black Belly y Cruzas de Pelo	Si
14	Pabellón de Arteaga C	184	Black Belly y Cruzas de Pelo	Si
15	San Francisco de los Romo C	88	Black Belly y Cruzas de Pelo	Si
16	Aguascalientes (centro)	120	Black Belly y Cruzas de Pelo	Si

Cuadro 5. Unidades de producción ovina incluidas en el estudio y características generales de estas.

## 5.4. ESTIMACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA A MAP.

### 5.4.1. Toma de muestras para serología (ELISA)

Se tomaron muestras de 5 mL sangre, por venopunción de la yugular en tubos de vacío sin anticoagulante de cada uno de los animales seleccionados, se dejaron reposar durante 20 min para obtener el suero mediante la separación del coágulo, en viales de plástico de 2 mL, se mantuvieron en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ , hasta su empleo para la prueba de ELISA.

### 5.4.2. Prueba de ELISA

Los sueros previamente obtenidos, se analizaron mediante a la prueba de ensayo de inmunoensayo enzimático indirecto (ELISA) para detectar anticuerpos contra MAP, con un modelo no comercial de acuerdo al método señalado por Favila (2007) y Chávez *et al.* (2008) sensibilizando las placas con 0.04mg/ml del antígeno protoplasmático PPA-3 (Allied Monitor®) en solución de carbonato pH 9.6, este método presenta una especificidad del 75% y una sensibilidad de 64%. Los sueros problema se adsorbieron con una suspensión de *Mycobacterium phlei* (5g/100 mL de solución salina) en una relación de 1:1, incubándose doce horas a  $4^{\circ}\text{C}$ , con el objetivo de incrementar la sensibilidad de la prueba y eliminar reacciones cruzadas de anticuerpos inespecíficos. Posteriormente, en las placas fijadas con antígeno PPA-3, se agregaron 95  $\mu\text{l}$  de solución salina de fosfatos (PBS 1x) más 5  $\mu\text{l}$  de suero previamente adsorbido y se incubaron de los sueros problema por dos horas en cámara húmeda, posteriormente se lavaron las placas tres veces con solución de fosfatos y Tween 20 (PBST), se añadió anti-IgG ovino marcado con peroxidasa de rábano a una dilución de 1:4500, incubándose nuevamente durante dos horas en una cámara húmeda; se realizaron 3 lavados con PBST y se añadió solución de citrato 0.05 M pH 4, más 2.2'-azino-di (3-etil-benzotiazolin sulfona-6)-(diamonio) (ABTS) y peróxido de hidrógeno diluido 1/12, se agitó en oscuridad por 15 minutos y finalmente se leyó con un espectrofotómetro de ocho canales con un filtro de 405 nm (ELX-800, BIO-TEK Instruments. Inc.). Se consideran como positivos aquellas muestras con valores superiores al punto de corte establecido  $>0.8$ , este valor se determinó dividiendo el valor medio de Densidad Óptica (DO) de la muestra problema entre el valor medio de la DO del suero control positivo (anexo A) (Favila, 2007; Chávez *et al.*, 2008).

### 5.4.3. Estimación de la seroprevalencia

Considerando a la prevalencia, como la “fracción de la población que está enferma en un punto de tiempo o la proporción de individuos positivos a la prueba en la muestra”, o “La prevalencia P, es el número de instancias de enfermedad o atributos relacionados (infección, presencia de anticuerpos, etc.) en una población conocida, en un momento designado. (Trusfield, 2005; Nielsen y Toft, 2009). La seroprevalencia se estimó con base a la proporción de ovinos adultos positivos a la prueba de ELISA, en relación al total de animales adultos de cada rebaño.

$$P = \frac{\text{N}^\circ \text{ animales positivos a la prueba}}{\text{Tamaño de la muestra}} \times 100$$

### 5.5. IDENTIFICACIÓN DE LA PRESENCIA DE MAP EN LOS REBAÑOS

A partir de los rebaños participantes, al momento del estudio solamente en nueve de los dieciséis rebaños (56.25%) se presentó al menos un caso sugerente a Paratuberculosis (etapa 3 o 4 de la enfermedad de acuerdo a NRC, 2004), mientras que en el resto (siete rebaños) no existieron casos clínicos asociados, si bien si ha referido haber tenido casos presentes anteriormente. Los nueve animales obtenidos pertenecían a los rebaños 1 y 10 del Municipio de Jesús María, el 4 del Municipio de Aguascalientes, el 6 del Municipio del Llano, 9 y 11 del Municipio de Asientos, 2 y 15 del Municipio de San Francisco y el 14 del Municipio de Rincón de Romos.

#### 5.5.1. Toma de muestras para estudios anatómo patológicos y aislamiento de MAP

Los animales fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital sódico (NOM-33-ZOO-1995) de acuerdo a los lineamientos establecidos del “Comité de ética para el uso de animales en la docencia e investigación de la Universidad Autónoma de Aguascalientes”, para posteriormente realizar la necropsia (anexo E) (Glock *et al.*, 2007; Chávez-Gris, 2008).



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

A la necropsia, se tomaron muestras de secciones intestinales de íleon y yeyuno que mostraron engrosamiento de la mucosa intestinal que sugerían lesiones asociadas a paratuberculosis; estas secciones fueron fijadas en formalina amortiguada (pH 7.6) para su posterior procesamiento histológico, empleando las tinciones de Hematoxilina-Eosina (H-E) y de Ziehl-Neelsen (ZN), esta última para poner en evidencia la presencia de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) (Estévez *et al.*; 2006). También durante la necropsia se obtuvieron muestras para su aislamiento bacteriano a partir de secciones de 30 cm de íleon y yeyuno que mostraban lesiones sugerentes de PTB (Bairnsdale y Bendigo, 2006; Dennis *et al.*; 2011), siendo depositadas en recipientes estériles de plástico para su conservación a -20° C hasta su procesamiento en el laboratorio.

### **5.5.2. Cultivo Bacteriano a partir de tejido (intestino)**

A partir de las muestras de intestino, estas fueron descongeladas y se realizó raspado de la mucosa intestinal con bisturí estéril, esta muestra se maceró en un *Ten Broeck* en forma manual, se colocaron para su incubación durante una hora a temperatura ambiente en un vial estéril con 50 mL de tripsina al 2.5% en PBS 1x pH 7.5 y posteriormente el vial fue colocado toda la noche en refrigeración a -4° C por al menos ocho horas. Después de este tiempo la muestra se centrifugó a 4000 rpm por veinte minutos, se desechó el sobrenadante, la pastilla se re-suspendió en PBS 1x con lisozima (20mg/100mL de PBS 1x), manteniéndose en agitación por un mínimo de dos horas, se centrifuga a 4000 rpm por veinte minutos, se desechó el sobrenadante, repitiéndose el mismo proceso, disolviendo el primer precipitado en 10 ml de agua destilada y se centrifugó a 4000 rpm durante diez minutos y se desecha nuevamente el sobrenadante. El sedimento fue re-suspendido en 20 ml de una solución de cloruro de hexadecil piridinium (HPC) al 0.75% para su descontaminación, dejándolo en este proceso durante 15 a 30 minutos a temperatura ambiente manteniendo los tubos en posición vertical. Posteriormente, con una pipeta de transferencia estéril se tomaron 4 mL del material de la interface, que fueron colocados nuevamente en tubos estériles y mantenidos en posición vertical durante toda la noche hasta ser inoculados en los medios de cultivo.

La inoculación o siembra en medio de Löwenstein-Jensen (L-Jm) con micobactina se realizó colocando tres a ocho gotas de cada una de las muestras, distribuyéndose en toda la superficie del medio. De cada muestra, se inocularon en dos diferentes tubos con medio

LJ, uno conteniendo micobactina y el segundo sin micobactina. Posteriormente fueron incubados a 37° C, manteniéndolos en posición inclinada y sin humedad. (anexo B) Se verificó el crecimiento bacteriano cada cuatro semanas hasta la semana doce, los medios donde no se observó crecimiento se continuaron en incubación hasta la semana 40 (De Juan *et al.*, 2006; Chávez *et al.*, 2008).

### **5.5.3. PCR IS900**

La identificación molecular se realizó a partir del crecimiento de las colonias de MAP, por examen de PCR punto final, empleando los iniciadores IS900P3N (5'-GGG TGT GGC GTT TTC CTT CG-3') e IS900P5N (5'-ATTTCCGCCGCCACCGCCACG-3'); las condiciones de amplificación fueron: un ciclo inicial de desnaturalización a 94° C por 5 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 40 seg., alineamiento a 68° C por 40 s, extensión a 72° C por 40 seg. y finalmente un ciclo de 72° C por 5 min. Los productos de amplificación se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% con un buffer tris-acetato EDTA (TAE) a 85 volts por 50 min., se tiñó con bromuro de etidio (5 µl/mL) y se procedió a realizar la lectura en transiluminador (UVP, M20) (Chávez *et al.*, 2004; Favila, 2007).

### **5.6. DETERMINACIÓN DE FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS**

A partir de trabajos previos tanto de ovinos como en otras especies (Lugton, 2004; Berghaus *et al.*, 2005; Dhand *et al.*, 2007), se desarrolló un cuestionario para coleccionar información cara a cara con los productores o encargados de los rebaños, acerca de los elementos que pudieran estar afectando el nivel de seroprevalencia y la presentación de la enfermedad. Posterior a la aplicación del cuestionario se tabularon los resultados aplicando tablas de contingencia 2x2, calculando la razón de posibilidades (odds ratio, odds) para cada factor mediante el software "OpenEpi" (Dean *et al.*, 2010) y se identificaron los factores de riesgo que pudieran estar asociados con la seroprevalencia de la enfermedad, considerando razones de 1.1-1.3 como débiles, 1.4-1.7 modestos, 1.8-3 moderados, 3-8 fuertes 8-16 muy fuertes, 16-40 dramáticos y >40 abrumador (Schoenbach, 2000).

**5.6.1. Cuestionario**

Se desarrollaron un total de 77 preguntas con respuestas dicotómicas cerradas (anexo F) y que pudiesen ser tabuladas para su análisis, siendo agrupadas en cinco categorías (cuadro 6).

Categoría	Elementos evaluados por categoría.
Elementos del sistema de producción.	Antigüedad de la Explotación, origen de animales fundadores, producción comercial o pie de cría, sistema intensivo o extensivo tamaño del rebaño, raza, explotación de otras especies, cercanía con otras granjas de rumiantes.
Prácticas generales de manejo.	Composición de rebaño, origen de sementales y reemplazos externos, última vez que fueron adquiridos, tenían alguna prueba sanitaria como PTB, existe flujo de animales externos de compraventa en el rebaño, cuenta con un programa organizado de reemplazos, tasa de reemplazo, densidad de población por corrales, lotificación productiva, corrales especiales para partos y lactancia
Plan nutricional y alimentación.	Principal fuente de alimentación, programa de rotación de praderas, praderas comunes de adultos y crías, suplementación, calidad de los alimentos, se balancean raciones, condición corporal general del rebaño, estrés alimenticio en hembras gestantes y lactancia (subalimentación), espacio de comederos, uso de suplementos de origen animal, origen de los alimentos, fuentes, depósitos de agua y bebederos.
Control Sanitario y bioseguridad	Existencia de programa definido de bioseguridad, programa de medicina preventiva, contacto con fauna silvestre, presencia de visitantes a la explotación dentro de corrales, frecuencia de limpieza, sistemas de eliminación de excretas y cadáveres, tratamiento y diagnósticos de casos clínicos, hay contacto de heces entre adultos y corderos, implementos de uso exclusivo para alimentar y para limpiar, contaminación de comederos, bebederos y alimentos por heces, limpieza de ubres.
Administración y personal	Organización y número de personal, conocimientos sobre la especie y su producción, capacitación, definición de actividades rutinarias, registros productivos y seguimiento de estos.

Cuadro 6. Resumen de categorías y aspectos contenidos en el cuestionario.

### 5.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

La obtención de la media para la prevalencia en el estudio, así como su intervalo de confianza, se realizó mediante análisis para una variable, con apoyo del paquete “Statgraphics Centurion XV”. La estimación de la significancia de los valores de la razón de posibilidades (odds ratio, odds) correspondiente a los factores de riesgo obtenidos por cuadros de contingencia 2x2, se realizaron aplicando la prueba de “Chi cuadrada” y “Prueba exacta de Fisher”, mediante el uso del software “OpenEpi” (Dean *et al.*, 2010).



## 6 RESULTADOS

### 6.1. SEROPREVALENCIA A MAP POR ELISA

En los dieciséis rebaños en los que se realizaron las pruebas de ELISA (PPA-3), se identificaron casos positivos en los 16 rebaños de este estudio (16/16), obteniéndose una frecuencia a “nivel de rebaño” del 100%.

Mientras que el porcentaje de la frecuencia de animales seropositivos a MAP promedio de los 16 rebaños, fue de 51.3%, con un valor mínimo de 4.8% y un valor máximo de 91.33% con un intervalo de confianza al 95.0% para la media de: [32.7173, 62.3415]. Los resultados individuales para cada uno de rebaños se describen el cuadro 7 y la figura 5.

Número de rebaño	Población total de animales adultos (> 1 año)	Número de animales seropositivos a ELISA-PPA-3 por rebaño.	Frecuencia (%) por rebaño	Necropsia realizada/ por rebaño.	Raza	Ubicación por municipio
14	184	168	91.3	1	Black belly y Cruzas de Pelo	Rincón de Romos
6	340	287	84.4	1	Cruzas Pelo	Aguascalientes (sur)
3	160	122	76.3	0	Black Belly	Rincón de Romos
11	160	117	73.1	1	Cruzas de pelo	Asientos
10	194	125	64.4	1	Katahdín, Black Belly y Cruzas	Jesús María
9	140	72	51.4	1	Cruzas pelo	Asientos
4	169	99	58.6	1	Dorper(x)/Katahdin	Aguascalientes (sur)
15	88	50	56.8	1	Black belly y Cruzas de Pelo	San Francisco de los Romo C
13	66	36	54.5	0	Black belly y Cruzas de Pelo	Pabellón de Arteaga
16	120	56	46.7	0	Black belly y Cruzas de Pelo	Aguascalientes (centro)
1	80	35	43.8	1	Black belly/ Polipay	Jesús María

8	60	17	28.3	0	Katahdín	Pabellón de Arteaga
5	62	8	12.9	0	Katahdín/cruzas pelo	Aguascalientes (Nte)
7	326	31	9.5	0	Katahdín/Dorper	El Llano
12	99	8	8.1	0	Black belly	San Francisco de los Romo
2	167	8	4.8	1	Black belly/	San Francisco de Los Romo
16	2415	1239	51.3	9/16	TOTAL	

Cuadro 7. Frecuencia de animales seropositivos a MAP por prueba de ELISA y realización de necropsia al momento del estudio; por rebaño.

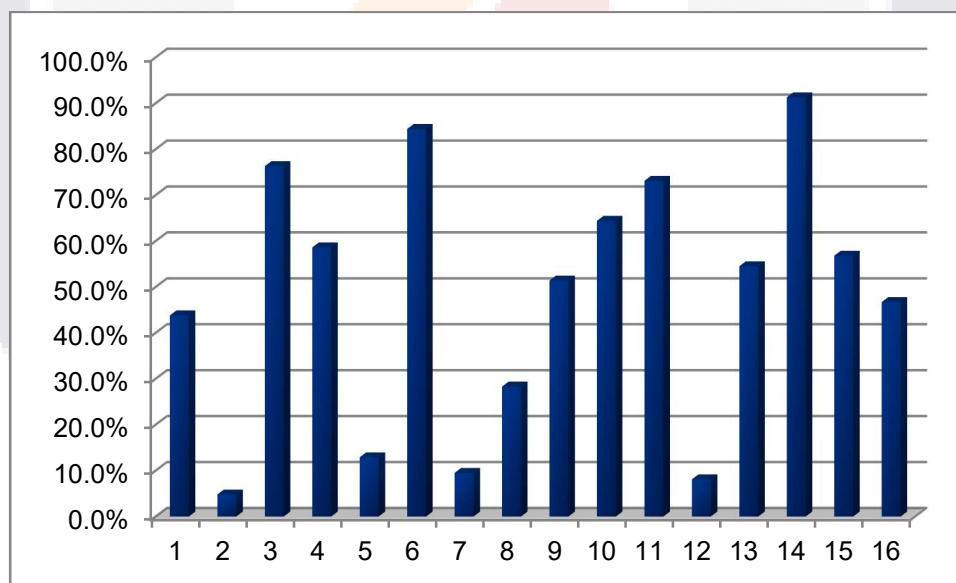


Figura 5.- Frecuencia de seropositividad a MAP de ELISA (PPA-3), de acuerdo al número de rebaño.

## 6.2. IDENTIFICACIÓN DE *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

### 6.2.1. Estudios anatomopatológicos

En los nueve animales en los que se realizó la necropsia se presentó emaciación, lana o pelo hirsutos, edema submandibular (figuras 6 y 6a), presencia de ascitis, degeneración de la grasa (7), así como engrosamiento aparente de la mucosa intestinal a nivel de íleon y yeyuno (8), además de aumento de tamaño de linfonodos mesentéricos y fusión de éstos (figuras). Al estudio histopatológico se observó enteritis granulomatosa en 8 de los 9 (88.8%) animales estudiados, con presencia de macrófagos y células gigantes, además de presencia de abundantes bacilos Acido Alcohol Resistentes (BAAR) mediante la tinción de Ziehl-Neelsen (ZN) y siendo coincidentes a lesiones de tipo multibacilar (figuras 9 y 10). En uno de los casos (11.2%) se observó la presencia de lesiones granulomatosas de tipo multifocal con escasa cantidad de bacilos (BAAR) en el interior de macrófagos, coincidente con una lesión de tipo paucibacilar. Solo en el 56% de los rebaños de estudio se logró realizar necropsia y estudio histopatológico que confirmó en 9 de los ovinos estudiados la presencia de lesiones compatibles con PTB (cuadro 8).



Figura 6. Ejemplar con signos clínicos y lesiones de emaciación crónica, edema submandibular (flecha).

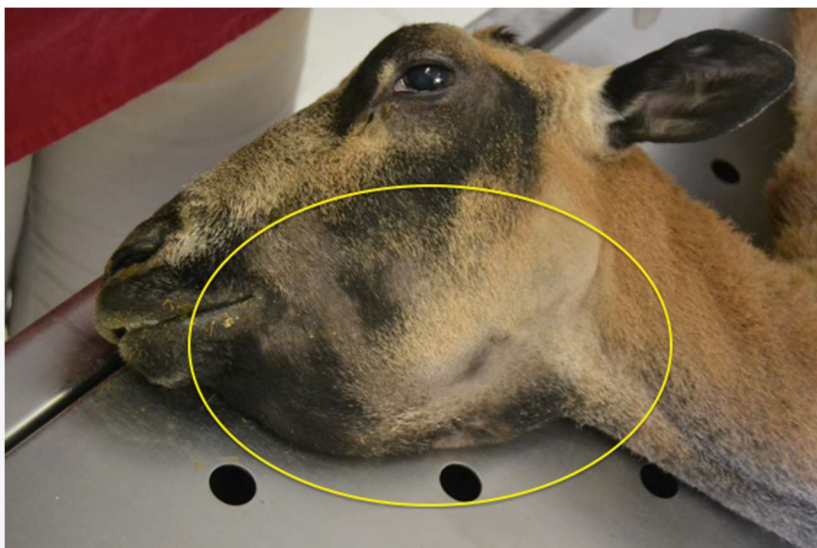


Figura 6a. Ejemplar con edema submandibular

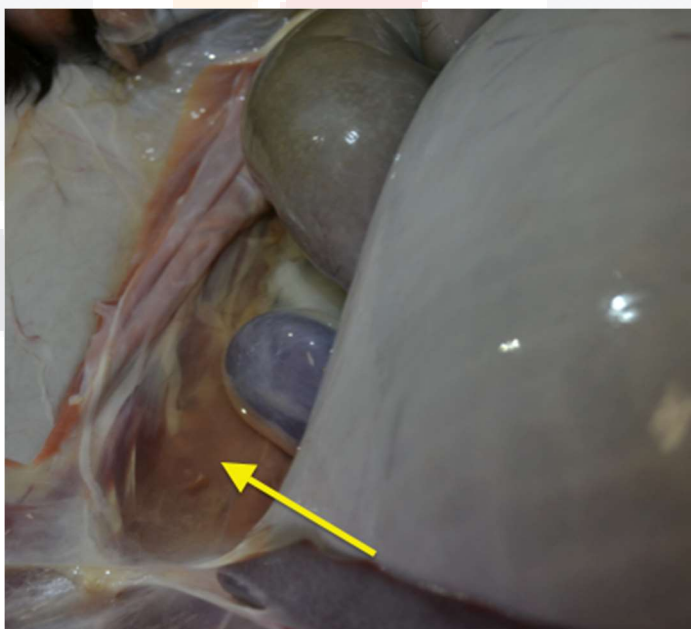


Figura 7. Presencia de ascitis y degeneración grasa en vísceras abdominales.



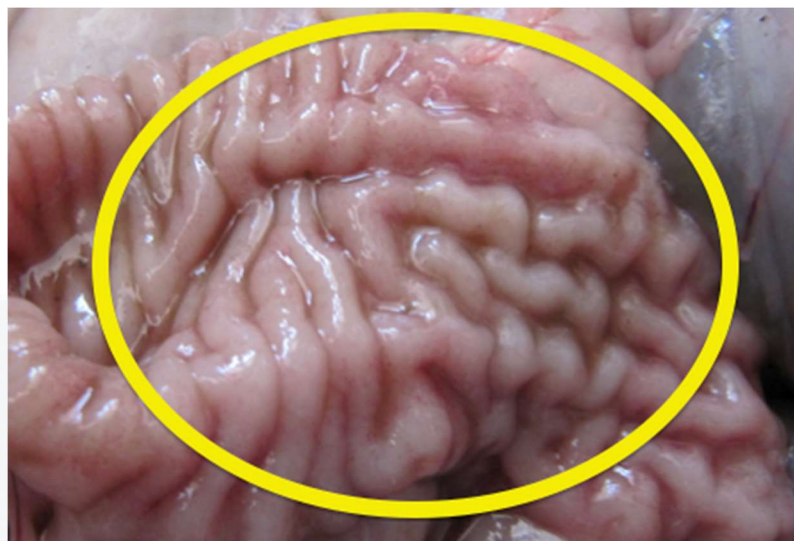


Figura 8. Lesión correspondiente a engrosamiento de la mucosa intestinal a nivel de íleon.

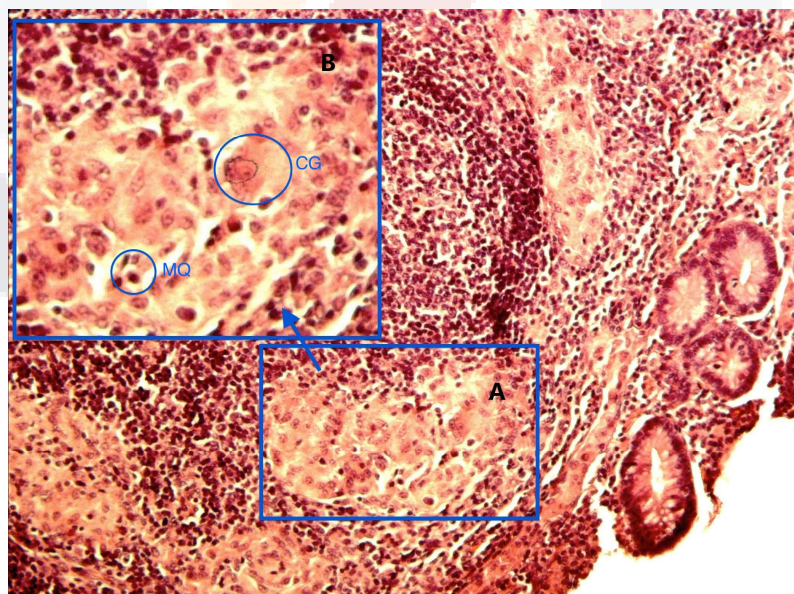


Figura 9. Íleon. A: Lesiones de tipo granulomatoso multifocales en mucosa B: Se observan numerosos macrófagos (MQ) y células gigantes (CG). Tinción Hematoxilina-eosina, 400 aumentos.

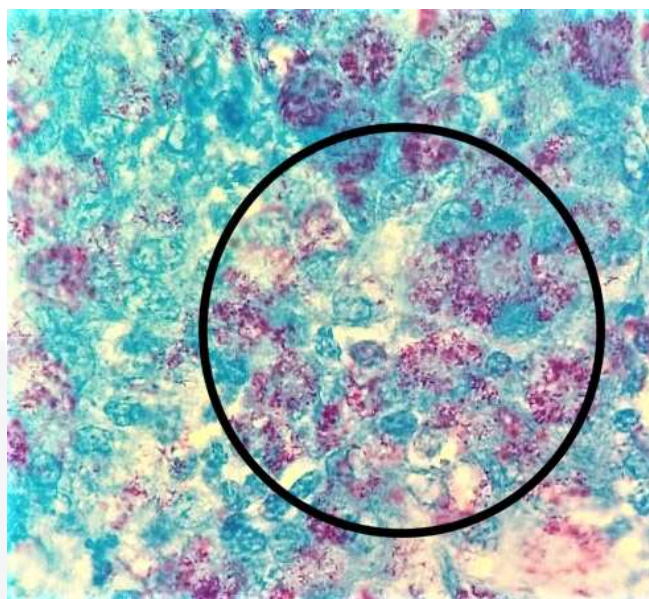


Figura 10. Lesión Histopatológica de tipo multibacilar, tinción de Ziehl-Neelsen 1000 aumentos, donde se observan múltiples Bacilos acido-alcohol resistentes (BAAR) en mucosa intestinal.

### 6.2.2. Cultivo Bacteriano a partir de tejido (intestino).

El cultivo bacteriano a las 12 semanas de incubación se observó en cinco casos (5/9) el desarrollo de colonias de color amarillo, cremosas, convexas y de forma circular característicos de MAP en los medios L-Jm adicionados con micobactina, correspondiendo al 55.5%. En los 4 casos restantes (44.5%), no se observó desarrollo de colonias hasta la semana 40. Todos los medios que no fueron adicionados con micobactina, no presentaron crecimiento (figura 11).

Considerando los 16 rebaños de estudio, solamente en el 31.25% de estos (5/16) se confirmó el aislamiento bacteriano de MAP (cuadro 8).

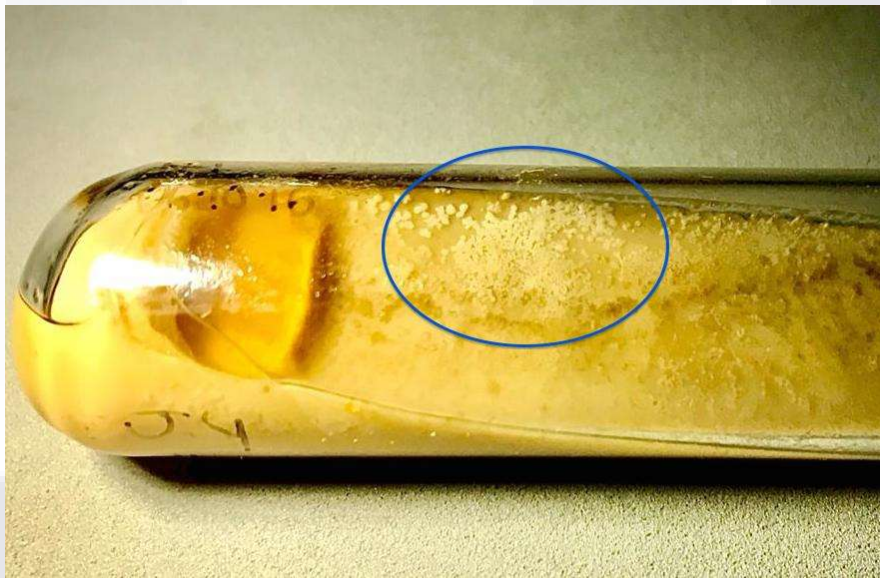


Figura 11. Crecimiento y aislamiento de colonias bacterianas (óvalo) en medio Löwenstein-Jensen a las 12 semanas en medios adicionados con Micobactina.

### 6.2.3. PCR IS900

A partir de los cinco aislamientos bacterianos obtenidos se obtuvieron productos de amplificación de la secuencia IS900 correspondiente a 310 pares de bases (pb), confirmándose así la presencia MAP a partir de los aislamientos obtenidos (figura 12).

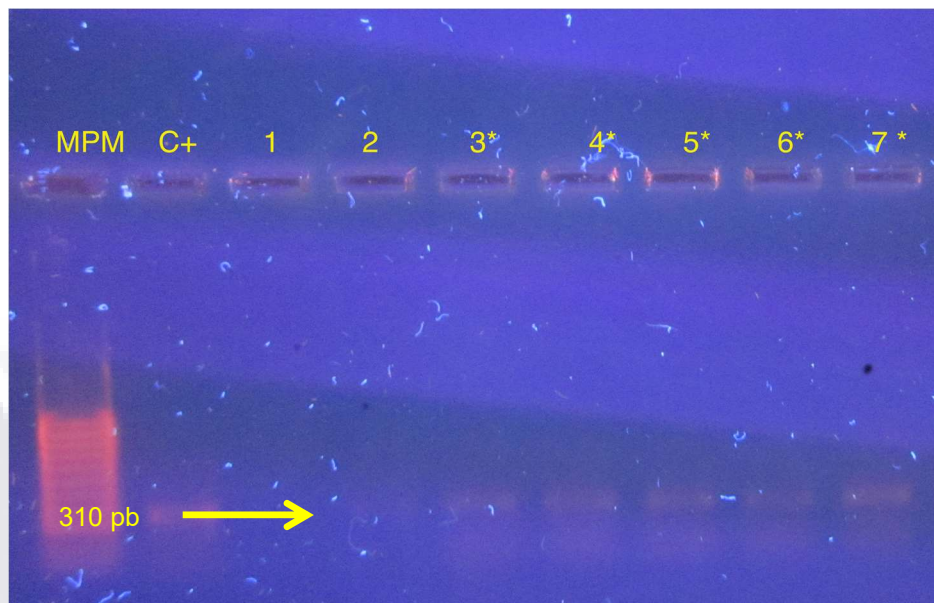


Figura 12. Producto de amplificación de PCR Directo a partir de extracción de ADN de colonias Bacterianas. Gel de agarosa teñido con Bromuro de etidio, en donde se observa en el primer Carril el marcador de peso molecular 50 pb, carriles 3 a 7 producto de amplificación de PCR de los 5 aislamientos de MAP. LA flecha indica el peso del producto esperado (310 pb) C+: Control positivo.

Considerando los 16 rebaños de estudio, en el 31.25% de estos (5/16) se confirmó la participación de MAP a partir de los animales que presentaron cuadro clínico al momento del estudio por medio de lesiones y por el aislamiento bacteriano y conformación de PCR (cuadro 8).

Seropositividad a MAP ELISA	Animales con signos y lesiones a la necropsia sugerentes a PTB (Multibacilares y paucibacilares)	Aislamiento bacteriano y PCR IS900 a partir de lesiones en Intestino delgado
16/16	9/16	5/16
100%	56.25%	31.25%

Cuadro 8. Resultados obtenidos “Por rebaño” correspondientes a los diferentes métodos de diagnóstico empleados.

### 6.3. DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE FACTORES DE RIESGO

El análisis y determinación de los factores de riesgo correspondiente, muestran una asociación entre su presencia, para con la seroprevalencia obtenida, en forma “Fuerte” (con una odds o razón de probabilidades, de 3 a 8, según la escala de Shoenbach, 2000), de los elementos enumerados a continuación:

1. El “No” contar con programa de bioseguridad, con un odds de 4.7,  $p < 0.05$ .
2. La presencia de alimento contaminado por heces, con un odss de 3.36,  $p < 0.05$ .
3. El que no haya Lotificación productiva (convivencia estrecha entre todos los animales de cría del rebaño), con una odss de 3.262,  $p < 0.05$ .
4. Base de alimentación en pesebre común, con una odss de 3.262,  $p < 0.05$ .

En un segundo grupo de factores determinados, con una asociación “Moderada” (odss de 1.8 a 2.9) se encuentran los siguientes:

1. Se Observa un estrés alimenticio/nutricional (por baja condición corporal), con un odss de 2.393,  $p < 0.05$ .
2. La contaminación de comederos con heces, con un odss de 2.393,  $p < 0.05$ .
3. La frecuencia de limpieza de corrales  $> 3$  meses. La antigüedad de establecimiento del rebaño mayor a seis años y El tamaño del rebaño mayor a 100 cabezas, son tres factores con un odss de 1.813,  $p < 0.05$ .

Hay que hacer notar que no se presentan Factores asociados de tipo “Modestos” (odss 1.4-1.7), mientras que dentro de la escala de factores “Débiles” (odds 1.1-1.3), se determinaron a 5 factores no significantes estadísticamente, que son: No hacer diagnóstico de casos clínicos por un Médico Veterinario (odds 1.39,  $p > 0.05$ ), contaminación de bebederos con heces, se abonan tierras de cultivos para producción de forrajes con heces del rebaño, baja calidad nutricional de la dieta y no hay balanceo de raciones, Animales recién paridos en contacto con adultos del resto del rebaño (odss 1.088,  $p > 0.05$ ).

El resto de factores analizados no presentaron una asociación (valor de odd igual o menor a 1.0), por lo que no se integran en la Tabla 9, donde se hace un resumen de todos los factores determinados y que presentan un grado de asociación.

	Factor asociado	Razón de posibilidades (odds)	Intervalo de Confianza P<0.05	Valor de P
Asociación: FUERTE	No existe un programa de bioseguridad en el rebaño.	4.711	1.34-16.58	<0.05
	Alimento Contaminado por heces.	3.362	1.05-10.15	<0.05
	No existe lotificación productiva ni reproductiva.	3.262	1.05-10.15	<0.05
	Base de alimentación en pesebre común (intensivo y semi-intensivo).	3.262	1.05-10.15	<0.05
Asociación: MODERADA	Se Observa un estrés alimenticio/nutricional.	2.393	0.892-6.908	<0.05
	Contaminación de comederos con heces.	2.393	0.829-6.908	<0.05
	Frecuencia de limpieza de corrales > 3 meses.	1.813	0.659-5.004	<0.05
	Antigüedad de establecimiento del rebaño mayor a seis años.	1.813	0.659-5.004	<0.05
	Tamaño del Rebaño >100.	1.813	0.659-5.004	<0.05
Asociación: DEBIL	No hacer diagnóstico de casos clínicos por MVZ.	1.399	0.5192-3.767	>0.05
	Contaminación de bebederos con heces.	1.088	0.469-2.908	>0.05
	Se abonan tierras de cultivos para producción de forrajes con heces del rebaño.	1.088	0.469-2.908	>0.05
	Baja calidad nutricional de la dieta, no hay balanceo de raciones.	1.088	0.469-2.908	>0.05
	Animales recién paridos en contacto con adultos del resto del rebaño.	1.088	0.469-2.908	>0.05

Nota: Factores con relaciones igual o menores de 1 no se incluyen en la presente tabla.

Factores considerados como "Débiles" (1.1-1.3); Factores considerados como "Modestos" (1.4-1.7); Factores considerados como "Moderados" (1.8-2.9); Factores considerados como "Fuertes" (3-8)

Cuadro 9. Determinación de factores de riesgo asociados a la seroprevalencia a paratuberculosis

## 7 DISCUSION

Los resultados obtenidos de seroprevalencia mediante la prueba de ELISA para la identificación de anticuerpos (IgG) contra MAP, a nivel intra-rebaño donde la frecuencia media obtenida del total de animales seropositivos fue de 51.3%, y con una seropositividad de 100% a nivel inter-rebaño, puede ser considerada “alta” o elevada, de acuerdo la clasificación presentada por Rossiter y Burhans en 1996, con presentación de casos clínicos, incremento en animales desechados por signos compatibles y 10 a 20% de positivos a partir de la prueba de ELISA, al igual que Barkema (2010), quien considera en otros estudios en ovinos, una prevalencia 20 al 40% como elevada. Si bien existen estudios en ovinos, en México en donde se ha observado menor seroprevalencia a las obtenida en este estudio, como son los datos reportados en los estados de: Querétaro con un 18% (Méndez et al., 2009) y Jalisco con un 14% (Ventura, 2010); también existen otros estudios en San Luis Potosí, México, que igualmente presentan una alta seroprevalencia a nivel intra-rebaño la cual fue de un 44% (Jaimes *et al.*, 2008). De la misma manera estudios realizados en Europa y Australia, reportan seroprevalencias con un 29% a 39% en regiones de Nueva Gales del Sur (Sergeant y Baldock, 2002), 6.4 en Portugal Coelho et al. (2007), y de 0.3% a 3.5% en otras zonas de Europa (Nielsen y Toft, 2008). Esta variabilidad de resultados que en algunos casos contrastan y en otros coinciden con el presente estudio, no hacen más que confirmar que el poder determinar una comparación efectiva de estimaciones de prevalencia de la Paratuberculosis en ovinos, ante los escasos estudios reportados en la literatura y una amplia variación metodológica, es complejo, con lo cual se sigue dando poca importancia a la presencia y al impacto verdadero de la paratuberculosis en diversos países como México, como lo mencionan reiteradamente varios autores (Jaimes *et al.*, 2008). Siendo la técnica de ELISA considerada una de las pruebas de elección para estimar la cantidad de animales infectados por MAP en programas nacionales de control de la PTB (NRC, 2003) y con una alta correlación con animales aparentemente sanos (Holmes *et al.*, 2004), se debe considerar que los que algunos resultados de ELISA para anticuerpos contra MAP, pueden ser falsos-positivos, debido a una posible reacción cruzada con infecciones de *Corynebacterium* spp. (Songer y Post., 2005; Manning *et al.*, 2007), afección presente y observada en los rebaños analizados en el estudio, más no considerada dentro de un análisis formal en éste mismo, por lo que es importante realizar aislamiento de MAP.

En el presente estudio, se observaron casos clínicos asociados a PTB en el 56.25% de los rebaños (9/16), en donde las lesiones identificadas a nivel de íleon a través de estudios histopatológicos se encuentran asociadas a esta micobacteriosis, con lo que se confirma mediante estudios anatomopatológicos la presencia de MAP en los rebaños del Estado de Aguascalientes, como algunos autores lo consideran (Pérez *et al.*; 1999; Dennis *et al.*, 2011). En estos estudios histopatológicos, ocho de los nueve casos analizados (88.8%), presentan lesiones de tipo multibacilar, las cuales sugieren un desarrollo importante en los casos clínicos hacia una etapa avanzada de la enfermedad, constituyéndose éstos en un importante medio de eliminación y diseminación del MAP por heces, e incluso por medio trans-placentario, y con ello un desarrollo y preservación de la enfermedad dentro de cada una de las unidades de producción donde se encuentran (Bairnsdale y Bendigo, 2006; Dennis *et al.*, 2011).

A partir de los casos observados sólo se logró el aislamiento bacteriano en el 55.5% de estos (5/9), lo cual se puede haber sido consecuencia de errores en la toma de muestra, el proceso de descontaminación de las muestras previas al cultivo con una posible pérdida en el número de las bacterias viables, o al tipo de cepa de MAP presente en los animales, en relación con el medio de cultivo empleado, ya que estas presentan diferencias en los requerimientos nutricionales en los diferentes medios de cultivo y la dificultad de aislamiento que presenta MAP (Elguezabal *et al.*, 2011; Whittington 2011). En el presente estudio no se realizó la identificación de las cepas aisladas, y aunque la cepa “S” o “I” es la que se espera observar en ovinos, como lo reporta Estévez (2004) en su estudio realizado en diversos estados de México, también es altamente probable tener la presencia de la cepa “C”, la cual ha sido identificada en otros estudios en México como predominante en diversas especies, esto debido al contacto de varios de los rebaños del estudio con poblaciones de bovinos lecheros, considerando la capacidad de un contagio de las diferentes cepas en las diferentes especies (Chávez *et al.*, 2004; Whittington, 2011) por lo que se hace necesario realizar en futuros trabajos una determinación de la cepa causante de la PTB.

La posterior identificación de los aislamientos obtenidos, por medio de PCR IS900, confirmó la presencia de MAP. Algunos autores sugieren que la identificación de la bacteria por PCR sea realizada a partir de las muestras obtenidas de los tejidos, o incluso directamente a partir de heces, sin depender directamente de los cultivos obtenidos como fue el proceso en el presente estudio, por lo que es conveniente que en nuevas propuestas, se considere que actualmente esta prueba presenta una similar eficacia con los cultivos y aislamientos



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

bacterianos en la identificación de MAP en los animales (Juste *et al.*, 2005; Kawaji *et al.*, 2007; Nilsen y Toft, 2008). Los resultados del presente estudio sumado a la existencia de los pocos estudios disponibles en la literatura, muestran la dificultad para determinar la extensión y la presentación de la PTB en ovinos, por lo que de acuerdo a como lo expresan Begg y Whittington (2010), aún hace falta un mayor trabajo de investigación, para difundir y mejorar los resultados de las pruebas diagnósticas y establecer mejores medidas y programas de control de la PTB.

Los estudios sobre evaluación y determinación de factores de riesgo y su relación ya sea con la frecuencia de la presentación clínica de la PTB o con la seroprevalencia a MAP en ovinos son escasos y hasta el 2010 sólo se identifican cuatro de ellos (Coelho, 2010).

A diferencia de la generalidad de los estudios de factores de riesgo, tanto en otras especies como para otras enfermedades, en donde los estudios solo indican la determinación y presencia o no de ellos, no presentan una categorización con relación a los odds obtenidos, como se establece en el presente trabajo, las categorizaciones tienen la finalidad de poder asignar un grado de importancia a los factores de riesgo identificados y con ello orientar así como priorizar líneas de acción en programas de control de la PTB hacia aquellos factores con un mayor impacto en la transmisión y persistencia de la infección en las unidades de producción animal (Reviriego *et al.*, 2000; Dhand, 2007; Nielsen y Toft, 2007; Kudahl *et al.*, 2008; Tiwari *et al.*, 2009; Coelho, 2010; Dore *et al.*, 2011)

En el presente estudio los factores de riesgo determinados y que fueron considerados con una Fuerte asociación, fueron *la falta de programas de bioseguridad y la no lotificación de los animales*, en otros estudios se ha señalado que una estrecha convivencia entre todos integrantes del rebaño y la falta de controles sanitarios y administrativos favorecen la presentación de la enfermedad (Juste y Pérez, 2011; Whitlock, 2010). Estos factores establecen que no existen medidas o acciones tendientes a evitar el contacto de animales jóvenes con las excretas de animales adultos y con ello favorecer la transmisión del MAP, siendo considerado como el factor de mayor importancia por otros estudios, tanto en ovinos (Dhand, 2007) como en estudios realizados en bovinos (Dore *et al.*, 2011). Siendo consistente con la historia natural de la enfermedad donde, los corderos son más susceptibles a infectarse en edades tempranas y por consiguiente a desarrollar la enfermedad (Whittington y McGregor, 2005).

Esta falta de programas de bioseguridad que favorece la transmisión del agente, se refleja en otro de los factores determinados con una fuerte relación en el presente estudio como es el *uso de pesebre común* en confinamiento, lo cual está relacionado directamente con sistemas de producción intensivos, en confinamiento o mixtos, así como épocas del año donde los rebaños son confinados. El confinamiento y los sistemas intensivos de producción, implica el que exista una alta densidad poblacional y con ello una mayor posibilidad de transmisión, lo cual es un factor de riesgo reportado consistentemente en los estudios realizados en ovinos (Mainar y Vázquez, 1998; Lugton 2004b, Dhand *et al.*, 2007; Coelho *et al.*, 2010).

Otro factor evaluado en el presente estudio y considerados con una asociación Moderada, es el *estrés alimenticio y nutricional*, factor que otros estudios también han identificado, ya sea por la falta de nutrientes específicos como el selenio y cobalto entre otros (Lugton, 2004b), o por una baja de condición corporal durante la época de cría y por consiguiente en la época de mayor demanda nutricional causando un estrés nutricional en la borrega (Dhand, 2007). A este factor se suman otros encontrados en el presente estudio y con un estrecha relación con el estrés nutricional, como son la *Baja calidad nutricional de la dieta*, y *la falta de balanceo de raciones*, factores responsables de generar un estrés nutricional por las posibles deficiencias que se generan con esto, y que precisamente Lugton (2004) en su estudio en ovinos, manifiesta como de gran importancia, el que la dieta deba cubrir todos los requerimientos tanto de micro como de macronutrientes. Este factor de deficiencia y estrés nutricional también se ha descrito no solo en ovinos sino también en caprinos (Reviriego *et al.*, 2000; Dhand *et al.*, 2007) y en bovinos (Berhaus *et al.*, 2005).

Los factores de riesgo como *Antigüedad de establecimiento del rebaño mayor a seis años*, así como el *Tamaño del Rebaño >100*, son factores que se identificaron con una Moderada asociación e igualmente determinados por otros estudios, donde se identifica el tamaño del rebaño como un factor de riesgo a considerar es en rebaños de más de 200 cabezas aunado al manejo de tipo intensivo y con alta densidad de población como fue mencionado con anterioridad (Mainar y Vázquez, 1998); sin embargo en Portugal, se observó que en rebaños de 31 a 60 cabezas (Coelho 2010) se mostró como un factor de riesgo, siendo unidades de producción que se manejan de manera tradicional no tecnificada y que carecen de controles en su operación. Si bien la antigüedad del rebaño no se identifica como un factor de riesgo en otros estudios, si se menciona que en un rebaño donde está presente la paratuberculosis y no se aplican medidas de control, la prevalencia en ésta enfermedad,

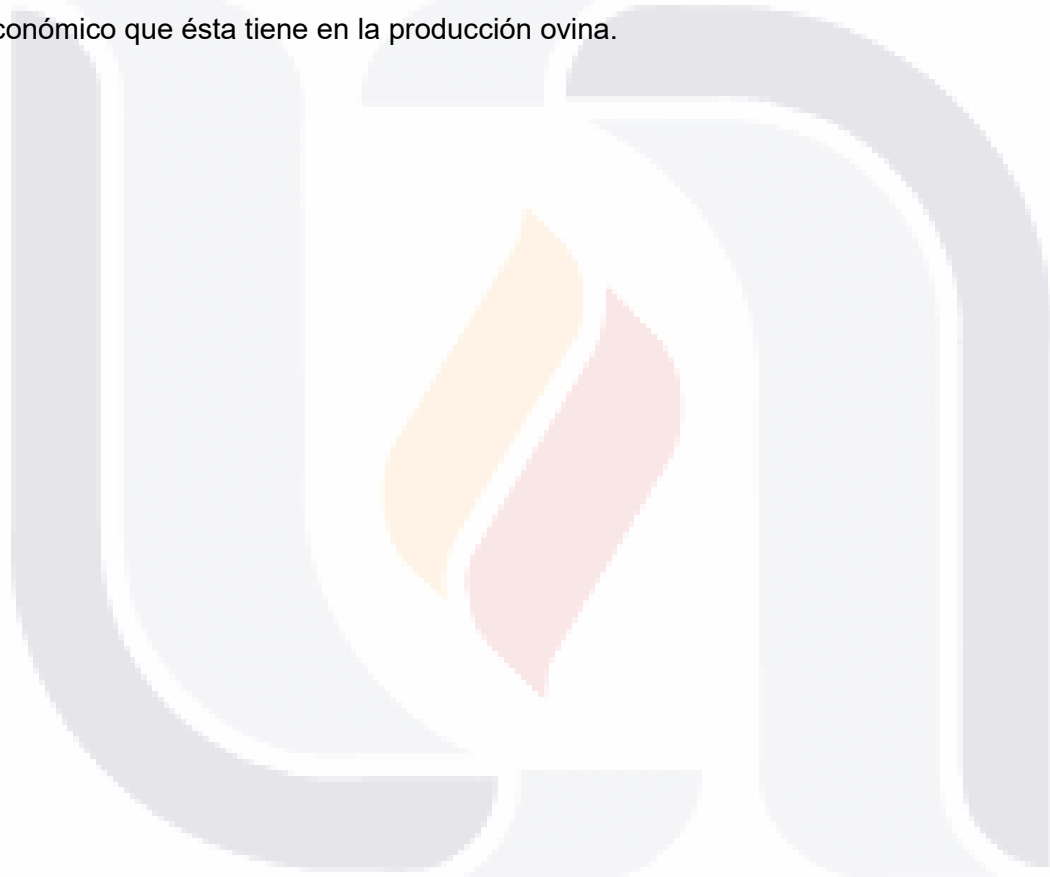
se incrementará paulatinamente a lo largo del tiempo y en una mayor proporción de animales (Reviriego *et al.*, 2000; Dhand *et al.*, 2007). *La contaminación de comederos y bebederos con heces*, así como la *limpieza de corrales mayor a tres meses* son otros factores considerados como de Moderada y Débil asociación en el presente estudio, no son mencionados directamente en otros estudios, pero que son referidos en la literatura como aspectos que favorecen la infección de MAP en rumiantes y que deben ser considerados al implementar un programa de control y bioseguridad en el rebaño. (Whitlock, 2010; Windsor y Whittington, 2010)

Dentro de los factores determinados y categorizados con una débil asociación, si bien no presentan una significancia estadística, apoyan de alguna manera la determinación de los factores que presentan una alta y moderada relación en el presente estudio. En el caso del factor *Animales recién paridos en contacto con adultos del resto del rebaño*, es ampliamente coincidente con otros estudios tanto en ovinos como en bovinos, donde este contacto favorece la transmisión de la PTB y donde se establece que los programas de bioseguridad y control de la enfermedad deben poner una especial atención en este rubro (Dhand, 2007, Begg y Whittington, 2010; Dore *et al.*, 2012). El factor relativo a *No hacer diagnóstico de casos clínicos por un Médico Veterinario*, es un factor que como se menciona en otros estudios, el contar con servicio médicos, favorece la disminución paulatina de la frecuencia de la presentación de la enfermedad al establecer estrategias de control para su control (Mainar y Vázquez, 1998).

Con base en la determinación de los factores de riesgo, es necesario establecer estrategias viables en cada rebaño, encaminadas a mejorar las condiciones de manejo que permitan disminuir el efecto de estos factores, donde en concordancia a los resultados obtenidos y lo expresado en otros estudios, estas estrategias, una vez determinado el grado de infección de rebaño, deben enfocarse principalmente en cortar la transmisión de la enfermedad hacia los animales jóvenes, disminuir la diseminación de MAP por medio de las heces de los animales infectados y mantener una condición nutricional adecuada, siempre considerando el impacto económico que el establecimiento de diferente medidas pueda tener para el ganadero (Bakker, 2010; Bakker, 2010; Whitlock, 2010, Dore, *et al.*, 2011). Las estrategia de control de la trasmisión de la enfermedad, van desde la limpieza frecuente de corrales, modificaciones en infraestructura y equipo como son la implementación de comederos y bebederos con características que impidan su contaminación con heces, la limpieza de implementos y calzado del personal que puedan

ser vectores de contaminación del alimento por heces; la reorganización de los procesos del sistema de producción donde la separación temprana de los corderos y la eliminación del rebaño de animales con sintología inicial clínica de la enfermedad, son medidas que impactan positivamente a la reducción de la prevalencia entre otras (Rossiter y Burhans, 1996; Robee, 2011, Whitlock, 2010).

En base a los resultados obtenidos y las valoraciones realizadas en el presente estudio, se puede establecer que, en el estado de Aguascalientes, México, es necesario plantear medidas de control de la PTB, además de realizar evaluaciones del impacto productivo y económico que ésta tiene en la producción ovina.



## 8 CONCLUSIONES

Se confirma el diagnóstico etiológico y la presencia de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* en rebaños con casos sugerentes a PTB, así como la presentación de una elevada frecuencia a presencia de anticuerpos contra MAP (elevada seroprevalencia), en rebaños ovinos del Valle de Aguascalientes.

La alta prevalencia de la enfermedad está fuertemente asociada con la falta de programas sanitarios o de bioseguridad, de falta de control o lotificación en la producción que rompan la ruta de infección fecal-oral, así como un deficiente manejo nutricional que causen un estrés por deficiencias, así como el tamaño y antigüedad del rebaño que han promovido la diseminación y permanencia del agente.

El presente estudio no es concluyente de la situación sanitaria de PTB en el total del rebaño del estado, sin embargo, se demuestra ser una patología de alto impacto en la producción ovina de diversos rebaños del estado de Aguascalientes, proporcionando información inicial, para promover el establecimiento de programas de control de la enfermedad a nivel rebaño o regional y para futuros estudios complementarios.

## REFERENCIAS CONSULTADAS

- AGLOYCA. (2010). Padrón de Socios de la Asociación Ganadera Local de Ovinocultores y Caprinocultores de Aguascalientes. México.
- Alexander, D.C., Turenne C.Y., Behr M.A. (2009). Insertion and deletion events that define the pathogen *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*. *Journal of bacteriology*. 191:1018-1225.
- Angelidou E, Kostoulas P, Leontides L. (2014). Flock-level factors associated with the risk of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) infection in Greek dairy goat flocks. *Prev Vet Med*. 117:233-241.
- Arteaga, C.J.D. (2008). La Ovinocultura en México, situación actual, retos y perspectivas. Memorias del *II Congreso: Rentabilidad de la Ganadería Ovina*. Querétaro, México. Abril 9-18.
- Bairnsdale, D.F., and Bendigo, A.L. (2006). Clinical signs and post mortem lesions of ovine Jhone's disease. *Agriculture Notes, State of Victoria, Department of primary industries*, Australia.
- Bakker, D. (2010). Paratuberculosis control measures in the Europe. In: Behr MA and Collins DE editors. *Paratuberculosis, Organism, Disease, Control*. (pp.306-318) CAB International.
- Barkema, H.W., Hesselink, J.W., McKenna, S.L.B., Benedictus, G. and Groenendaal H. (2010). Global prevalence and economics of infection with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in ruminants. In: Behr MA and Collins DE editors. *Paratuberculosis, Organism, Disease, Control* (pp 10-19). CAB International.
- Bastida, F., Juste, R.A. (2011). Paratuberculosis control: a review with a focus on vaccination. *J Immune Based Ther Vaccines*. 9:8.
- Behr, A.B. (2010). Paratuberculosis and Crohn's disease. In: Behr MA and Collins DE editors. *Paratuberculosis, Organism, Disease, Control* (pp.40-49). CAB International.

- Begg, D.J., Whittington, R.J. (2010). Paratuberculosis in Sheep. In: Behr MA and Collins DE editors. *Paratuberculosis, Organism, Disease, Control* (pp.157-168). CAB International.
- Bennett, R., McClement, I., McFarlane, I. (2010). An economic decision support tool for simulating paratuberculosis control strategies in a UK suckler beef herd. *Preventive Veterinary Medicine*. 94:286-293
- Berghaus, R.D., Lombard, J.E., Gardner, I.A., Farver, T.B. (2005). Factor analysis of a Johne's disease risk assessment questionnaire with evaluation of factor scores and a subset of original questions as predictors of observed clinical paratuberculosis. *Prev. Vet. Med.* 72, 291-309.
- Bielanski, A., J. Algire, G. C. B. Randall, and O. Surujballi. (2000). Risk of transmission of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* by embryo transfer of in vivo and in vitro fertilized bovine embryos. *Theriogenology* 66:260-266.
- Bolske, G., Herthnek, D. (2010). Diagnosis of Paratuberculosis by PCR. In: Behr MA and Collins DE editors. *Paratuberculosis, Organism, Disease, Control* (pp.267-283). CAB International.
- Bosward, K. L., Dhand, N. K., Begg, D.J., Thomson, P.C., Emery, D.L., Whittington, R.J. (2010). Optimization of a whole blood gamma interferon assay for the detection of sheep infected with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *J Vet Diagn Invest*. 22:210-7
- Buergelt, C. D., A. W. Layton, P. E. Ginn, M. Taylor, J. M. King, P. L. Habecker, E. Mauldin, R. Whitlock, C. Rossiter, and M. T. Collins. (2000). The pathology of spontaneous paratuberculosis in the North American bison (*Bison bison*). *Vet. Pathol.* 37:428-438.
- Cayrou, C., Turenne C., Behr, M.A., Drancourt, M. (2010). Genotyping of *Mycobacterium avium* complex organisms using multispacer sequence typing. *Microbiology*. 156:687-694
- Chávez, G.G., Trigo, T.F., Svastova, P. and Pavlik, P. (2004). Identificación del polimorfismo genético de aislamientos de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* de caprinos del centro de México. *Vet. Méx.* 35:75-84.

- Chávez, G. G. (2005). En: Rodríguez V.R.I. editor. Enfermedades de Importancia económica en la producción animal. McGraw Hill- UADY México.
- Chávez, G. G., Morcella, C., Favila, H.L. y Maldonado, C.E. (2008). Métodos diagnósticos en Paratuberculosis. *Memorias del Primer Taller de Diagnostico en Paratuberculosis*. CEIEPA/UCEDISCO, FMVZ- UNAM. Tequisquiapan. México. Oct 6-8.
- Chiodini, R., Chamberlin W.M., Sarosiek, J., McCallum, R.W. (2012). Crohn's disease and the mycobacterioses: A quarter century later. Causation or simple association? *Critical Reviews in Microbiology*. 38:52-93.
- Clarke, C.J., Patterson, I.A.P., Armstrong, K.E. and Low, J.C. (1996). Comparison of the absorbed ELISA and agar gel immunodiffusion test with clinicopathological finding in ovine clinical paratuberculosis. *Vet. Rec.* 139: 618-621.
- Coelho, A.C., Pinto, M.L., Silva, S., Coelho, A.M., Rodrigues, J., Juste, R.A. (2007). Seroprevalence of ovine paratuberculosis infection in the Northeast of Portugal. *Sm. Rum. Res.* 71, 298-303.
- Collins, M.T. (2011). Diagnosis of paratuberculosis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 27:581-371.
- Collins, D.M., De Zoete, M., Cavaignac, S.M. (2002). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains from cattle and sheep can be distinguished by a PCR test based on a novel DNA sequence difference. *J. Clin. Microbiol.* 40: 4760-4762.
- Cook, K.L., Britt, J.S., Bolster, C.H. (2010). Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in biofilms on livestock watering trough materials. *Vet Microbiol.* 141: 103-109.
- Coussens, P.M., Lamont, E.A., Kabara, E., Srewevatsan, S. (2010). Host-Pathogen interactions and intracellular survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. In: Behr MA and Collins DE editors. *Paratuberculosis, Organism, Disease, Control* (pp.109-125). CAB International.
- Davis, J. M., Ramakrishnan, L. (2009). The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection. *Cell.* 136: 37-49.



- De Juan, L., Alvarez, J., Romero, B., Bezos, J., Castellanos, E., Aranaz, A., Mateos, A. and 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 5927-5932.
- De Lisle, G. (2010). Ruminant aspects of Paratuberculosis vaccination. In: Behr MA and Collins DE editors. *Paratuberculosis, Organism, Disease, Control* (pp.344-352). CAB International.
- Dean AG, Sullivan KM, Soe MM. (2010). OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health. [www.OpenEpi.com](http://www.OpenEpi.com)
- Dennis, M.M., Reddacliff, L.A., Whittington, R.J. (2011), Longitudinal study of clinico-pathological features of Johne's diseases in sheep naturally exposed to *Mycobacterium avium* subs *paratuberculosis*. *Vet. Pathol.* 48:565-575.
- Dhand, N.K., Eppleston, J., Whittington, R.J., Toribio, J.A.L.M. (2007). Risk factors for ovine Johne's disease in infected sheep flocks in Australia. *Prev. Vet. Med.* 82: 51-71.
- Doosti, A., Moshkelani, S. (2010). Application of IS900 nested-PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* directly from faecal specimens. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine.* 13:92-97.
- Doré, E., Pare´, J., Coˆ te´, G., Buczinski, S., Labrecque, O., Roy, J.P., Fecteau, G. (2011). Risk Factors Associated with Transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* to Calves within Dairy Herd: A Systematic Review. *J Vet Intern Med.* 26:32–45.
- Elguezabal, N., Bastida, F., Sevilla, I.A., González, N., Molina, E., Garrido, J.M., Juste, R.A. (2011) Estimation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Growth Parameters: Strain Characterization and Comparison of Methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 8615-8624.
- Eppleston, J., Windsor, P., Whittington, R. (2011). Effect of unvaccinated Merino wether lambs on shedding of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in flocks vaccinating for ovine Johne's disease. *Aust Vet J.* 89:38-40.

- Estévez, D. I. (2004). Identificación de aislamientos de *Mycobacterium avium* subespecies paratuberculosis en pequeños rumiantes de México mediante RFLP. Tesis de Maestría. FMVZ. UNAM.
- Estévez, D. I., Hernández, C. R., Trujillo, G.A.M. and Chávez, G. G. (2006). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in goat and sheep flocks in México. *Small Rum. Res.* 72:209-213.
- Favila-Humara, L., Hernández, C. R., Chávez G. G. (2008). Detección de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en leche de cabras por PCR en México. *Memorias del Primer Taller de Diagnostico en Paratuberculosis*. CEIEPA/UCEDISCO, FMVZ-UNAM. Tequisquiapan. México. Oct 6-8.
- Favila, H.L.C. (2007). *Detección de Mycobacterium avium paratuberculosis en leche de vacas y cabras seropositivas del centro de México*. Tesis de Maestría. FMVZ. UNAM.
- Favila, H.L.C., Chávez, G.G., Carrillo, C.E.M., Hernández, C.R. (2010). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* detection in individual and bulk tank milk samples from bovine herds and caprine flocks. *Foodborne Pathog Dis.* 7:351-5
- Fernandez-Silva, J.A., Correa, V.N.M., Fernando, R.N. (2014). Systematic review of the prevalence of paratuberculosis in cattle, sheep, and goats in Latin America and the Caribbean. *Trop Anim Health Prod.* 46:1321–1340
- Fecteau, M.E., Hovingh, E., Whitlock, R.H., Sweeney, R.W. (2013). Persistence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in soil, crops, and ensiled feed following manure spreading on infected dairy farms. *Can Vet J.* 54:1083-5.
- García E. (2004). *Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köpen*. 5ª ed, México. Instituto de Geografía UNAM.
- Gillan, S., O'Brien, R., Hughes, A.D. and Griffin, J.F.T. (2009). Identification of Immune Parameters to Differentiate Disease States among Sheep Infected with *Mycobacterium avium* subsp *Paratuberculosis*. *Clinical and vaccine Immunology.* 17:108-17
- Glock, B., Panciera, R., Scruggs, D. and Clarck, T. (2007). *Practical Necropsy Guide*. Elanco Animal Healt. USA.

- Gonzalez, J., Geijo, M.V., Garcia-Pariente, C., Verna, A., Corpa, J.M., Reyes, L.E., Ferreras, M.C., Juste, R.A., Marin, J.F.G. and Perez, V. (2005). Histopathological classification of lesions associated with natural paratuberculosis infection in cattle. *J. Comp. Pathol.* 133: 184-196.
- Grant, I.R. (2010). *Mycobacterium avium* subsp Paratuberculosis in Animal-derived foods and the environment. In: Behr MA and Collins DE editors. *Paratuberculosis, Organism, Disease, Control* (pp.157-168). CAB International.
- Hendrick, S. H., D. F. Kelton, K. E. Leslie, K. D. Lissemore, M. Archambault, R. Bagg, P. Dick, and T. F. Duffield. (2006). Efficacy of monensin sodium for the reduction of fecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in infected dairy cattle. *Prev. Vet. Med.* 75:206-220.
- Hendrick, S. H., T. F. Duffield, K. E. Leslie, K. D. Lissemore, M. Archambault, R. Bagg, P. Dick, and D. F. Kelton. (2006b). Monensin might protect Ontario, Canada dairy cows from paratuberculosis milk-ELISA positivity. *Prev. Vet. Med.* 76:237-248.
- Holmes, I.R.L., Jubb, T.F. AND Callinan, A.P.L. (2004). Infection rates in reactors to an absorbed ELISA used in a test and cull program for bovine Johne's disease. *Aus Vet J.* 88:233-235.
- Huygen, K., Bull, T., Collins, D.M. (2010). Development of new Paratuberculosis vaccine. In: Behr MA and Collins DE editors. *Paratuberculosis, Organism, Disease, Control* (pp. 353-368). CAB International.
- Ikonomopoulos, J., C. Balaskas, B. Kantzoura, E. Fragiadaki, I. Pavlik, M. Bartos, J. C. Lukas, and M. Gazouli. (2007). Comparative evaluation of positive tests to *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in clinically healthy sheep and goats in South-West Greece using molecular techniques, serology, and culture. *Vet. Journal* 174:337-343.
- Jaimes, N.G., Santillán, F.M.A., Hernández Cruz, O.A., Córdova López, z D., Guzmán Ruiz, C.C., Arellano Reynoso, B., Díaz Aparicio, E., Tenorio Gutiérrez, V.R., Cuéllar Ordaz, A. (2008). Detección de *Mycobacterium avium* subespecie

*paratuberculosis*, por medio de PCR-anidada a partir de muestras de heces de ovinos. *Revista Veterinaria México*. 39:377–386.

Jungersen, G., Huda, A., Hansen, J.J. and Lind P. (2002). Interpretation of the Gamma Interferon Test for Diagnosis of Subclinical Paratuberculosis in Cattle. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9: 453 - 460.

Juste, R.A., Garrido, J.M., Geijo, M., Elguezabal, A.G., Atxaerandio, R., Sevilla, I. (2005). Comparison of blood polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle and sheep. *J. Vet. Diag. Invest.* 17:354-359.

Juste, R.A., Hearn, M.A., Molina, E., Geijo M., Vazquez, P., Sevilla, I.A., Garrido, J.M. (2009). Significant reduction in bacterial shedding and improvement in milk production in dairy farms after the use of a new inactivated paratuberculosis vaccine in a field trial. *BMC Res Notes*. 2:233

Juste, R., Pérez, V. (2011). Control of Paratuberculosis in Sheep and Goats. *Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*. 27:127–138.

Kawaji, S., Taylor, D.L., Mori, Y. and Whittington, R.J. (2007). Detection of *Mycobacterium Avium* Subsp. *paratuberculosis* in ovine faeces by direct quantitative PCR has similar or greater sensitivity compared to radiometric culture. *Vet. Microbiol.*125: 36-48.

Kawaji, S., Begg, D.J., Plain, K.M., Whittington, R.J. (2011). A longitudinal study to evaluate the diagnostic potential of a direct faecal quantitative PCR test for Johne's disease in sheep. *Vet Microbiol.* 148:35-44.

Kennedy, D., Citer, L. (2010). Paratuberculosis control measures in Australia. In: Behr MA and Collins DE editors. *Paratuberculosis, Organism, Disease, Control* (pp.330-343). CAB International.

Khare, S., Adams, L.G., Osterstock, J., Roussel, A., David, L. (2008). Effects of shipping and storage conditions of fecal samples on viability of *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 46:1561-1562.

Khol, J., Kralik, P., Slana, I., Beran, V., Aurich, C., Baumgartner, W., Pavlik, I. (2010). Consecutive excretion of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*

in semen of a breeding bull compared to the distribution in feces, tissue and blood by IS900 and F57 quantitative real-time PCR and culture examinations. *J Vet Med Sci.* 72: 1283-1288.

Kreeger, J. M. (1991). Ruminant paratuberculosis century of progress and frustration. *J. Vet. Diagn. Investig.* 3:373-382.

Kudahl, A.B., Nielsen, S: S; Østergaard, S. (2008). Economy, Efficacy, and Feasibility of a Risk-Based Control Program Against Paratuberculosis. *Journal of Dairy Science.* 91:4599-4609.

Kumthekar, S., Manning, E.J., Ghosh, P., Tiwari, K., Sharma, R.N., 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.* 25:527-530.

Kurade, N.P., Tripathi, B.N., Rajukumar, K. and Parihar, N.S. (2004). Secuential development of histologic lesions and their relationship with bacterial isolation, fecal shedding, and immune responses during progresives stages of experimental infection of lambs with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Pathol.* 41:378:387.

Li, L.L., Bannantine, J.P., Zhang, Q., Amonsin, A., May, B.J., Alt, D., Banerji, N., Kanjilal, S. and Kapur, V. (2005). The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 102:12344-12349.

Lombard, J.E. (2011). Epidemioloy and economics of Paratuberculosis. *Veterinary clinics of North America. Food animal practice.* 27:525-535.

Lugton, I.W. (2004). Review of possible links between the clinical expression of paratuberculosis and deficiency of macro and micro nutrients. *Aust. Vet. J.* 82:490-496.

Lugton, I.W. (2004). Cross-sectional Cross-sectional study of risk factors for the clinical expression of ovine Johnhe's disease on New South Wales farm. *Aust. Vet. J.* 82:355-365.

- Lybeck, K.R., Storset, A.K., Djønnø, B., Valheim, M., Olsen, I. (2011). Faecal shedding detected earlier than immune responses in goats naturally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Res Vet Res*. 91:32-39.
- Mainar, J.R.C., Vasquez, B.J.A. (1998). Factors associated with seroprevalence to *Mycobacterium paratuberculosis* in small-ruminant farms in the Madrid region (Spain). *Prev. Vet. Med.* 34:317-27.
- Maio, E., Carta, T., Balseiro, A., Sevilla, I.A., Romano, A., Ortiz, J.A., Vieira-Pinto, M., Garrido, J.M., de la Lastra, J.M., Gortázar, C. (2011). Paratuberculosis in European wild rabbits from the Iberian Peninsula. *Res Vet Sci*. 91:212-218.
- Makintosh, C.G., Griffin, J.F. (2010). Paratuberculosis in Deer, Camelids and other ruminants. In: Behr MA, Collins DM, Edit. *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control* (pp.179-187). CAB International.
- Manning, E. J. B. and M. T. Collins. (2010). Epidemiology of Paratuberculosis. In: Behr MA, Collins DM, Edit. *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control* (pp.22-28). CAB International.
- Manning, E. J. B., Cushing, H. F., Hietala, S., & Wolf, C. B. (2007). Impact of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Infection on Serologic Surveillance for Johne's Disease in Goats. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 19:187–190.
- McGregor H, Dhand NK, Dhungyel OP, Whittington RJ. (2012). Transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: Dose-response and age-based susceptibility in a sheep model. *Prev Vet Med*. 107:72-84.
- Méndez, G.M., Perea, A.R., Enríquez, V.A., García, C.L. (2009). Análisis descriptivo de casos recibidos para diagnóstico de paratuberculosis ovina y caprina en el laboratorio de patología animal de Calamanda, México. In *VI Congreso Latinoamericano de la Asociación de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos (ALEPR y CS)*. Ciudad de Querétaro, México.
- Menzies P. (1998). Johne's Disease in Sheep. *Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, Ontario*. [www.omafra.gov.on.ca/english/livestock/sheep/facts/johnsdis.htm](http://www.omafra.gov.on.ca/english/livestock/sheep/facts/johnsdis.htm).

- Merkal, R.S. and Curran, B.J. (1974). Growth and metabolic Characteristics of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Appl. Microbiol.* 28:276-279.
- Miranda, B.M.V. (2008). *Evaluación del impacto económico de la paratuberculosis en ganado bovino lechero (sistema intensivo), en el complejo agropecuario industrial Tizayuca, Hidalgo*. Tesis de Maestría. FMVZ, UNAM. México.
- Moloney, B.J. and Whittington, R.J. (2008). Cross species transmission of ovine Johne's disease from sheep to cattle: an estimate of prevalence in exposed susceptible cattle. *Aust. Vet. J.* 86: 117-123.
- Morris, C. A., S. M. Hickey, and H. V. Henderson. (2006). The effect of Johne's disease on production traits in Romney, Merino and Merino x Romney-cross ewes. *New Zealand Vet. J.* 54:204-209.
- Motiwala, A.S., Amonsin, A., Strother, M., Manning, E.J.B., Kapur, V., Sreevatsan, S. (2004). Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* isolates recovered from wild animal species. *J. Clinic. Microbiol.* 42: 1703-1712.
- Mutharia, L.M., Klassen, M.D., Fairles, J., Barbut, S., Gill, C.O. (2010). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in muscle, lymphatic and organ tissues from cows with advanced Johne's disease. *Int J Food Microbiol.* 136: 340-344.
- Nebbia, P., Robino, P., Zoppi, S., De Meneghi, D. (2006). Detection and excretion pattern of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in milk of asymptomatic sheep and goats by Nested-PCR. *Small Ruminant Res.* 66:116–120.
- NRC (National Research Council). (2003). *Diagnosis and Control of Johne's Disease*. Washinton, D.C. USA. The National Academic Press. Washington, D.C. USA.
- Nielsen, S.S., Kolmos, B. and Chistoffersen, A.B. (2004). Comparison of contamination and growth of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* on two different media. *J. Appl. Microbiol.* 96: 149-153.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Nielsen, S. S., Toft., N. (2007). Assessment of management-related risk factors for paratuberculosis in Danish dairy herds using Bayesian mixture models. *Preventive Veterinary Medicine*. 81:306-317.
- Nielsen, S. S., Toft., N. (2008). Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: A review of accuracies of ELISA, interferon-gamma assay and faecal culture techniques. *Vet. Microbiol.* 129:217-235.
- Nielsen, S.S.; Toft., N. (2009). A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. *Prev. Vet. Med.* 88:1-14.
- Nielsen, S.S. (2010). Immune-Based diagnosis of Paratuberculosis. In: Behr MA and Collins DE editors. *Paratuberculosis, Organism, Disease, Control* (pp284-293). CAB International.
- NOM-033-ZOO-1995. Norma Oficial Mexicana: Sacrificio humanitario de animales domésticos y silvestres, México. Diario Oficial de la Federación.
- Norton., S, Johnson, W.O., Jones, G., Heuer, C. (2010). Evaluation of diagnostic tests for Johne's disease (*Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*) in New Zealand dairy cows. *J Vet Diagn Invest.* 22:341-51.
- OIE (World Organisation for Animal Health). (2004). *Manual de pruebas de diagnóstico y de vacunas para los animales Terrestres. Vol I.*
- Over, k., Crandall, P.G., O'Bryan, C.A., Ricke, S.C. (2011). Current perspectives on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, Johne's disease, and Crohn's disease: A Review. *Critical Reviews in Microbiology.* 37:141-156.
- Patton, E.A. (2011). Paratuberculosis Vaccination. *Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice.* 27:573-580.
- Perez, V., Chavez, G., Gutierrez, M., Tellechea, J., Badiola, J.J. and Garcia-Marin, J.F. (1994). Evaluation of the AGID and -interferon tests in lambs infected with *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, p. 91-96. In R. J. Chiodini, M. T. Collins, and E. O. Bassey (ed.), *Proceedings of the 4th International Colloquium on Paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis Inc., Cambridge, United Kingdom, July 17-21.*



- Pérez, V., Garcia Marin, J.F., Badiola, J.J. (1996). Description and classification of different types of lesion associated with natural paratuberculosis infection in sheep. *J. Comp. Pathol.* 114:107-122.
- Perez, V., Tellechea, J., Corpa, J. M., Gutierrez, M. and Garcia-Marin, J.F. (1999). Relation between pathologic findings and cellular immune responses in sheep with naturally acquired paratuberculosis. *Am. J. Vet. Res.* 60:123-127.
- Perry, G.H., Vivanco, H., Holmes, I., Gwozdz, J.M. and Bourne, J. (2006). No evidence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in in vitro produced cryopreserved embryos derived from subclinically infected cows. *Theriogenology.* 66:1267-1273.
- Pillars, R.B., Grooms, D.L., Gardiner, J.C., Kaneene, J.B. (2011). Association between risk-assessment scores and individual-cow Johne's disease-test status over time on seven Michigan, USA dairy herds. *Prev Vet Med.* 98:10–8.
- Pribylova, R., Slana, I., Kaevska, M., Lamka, J., Babak, V., Jandak, J., Pavlik, I., (2011). Soil and plant contamination with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* after exposure to naturally contaminated mouflon feces. *Curr Microbiol.* 62:1045-1010.
- Ramírez, V.R., Rodríguez, B., & Fernández S.J. (2011). Diagnóstico clínico e histopatológico de paratuberculosis bovina en un hato lechero en Colombia. *Revista MVZ Córdoba,* 16:2742-2753.
- Robbe, A. S., Stabel, J.R. and Morrical, D.G. (2007). Skin test and gamma interferon enzyme-linked immunosorbent assay results in sheep exposed to dead *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* organisms. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19: 88 - 90.
- Robbe, A.S. (2011). Control of Paratuberculosis in Small Ruminants. *Vet Clin Food Anim.* 27:609–620.
- Rossiter, C.A., Burhans, W.S. (1996). Farm-specific approach to paratuberculosis (Johne's disease) control. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 12, 383-392.

- Salgado, M., Manning, E.J., Monti, G., Bölske, G., Söderlund, R., Ruiz, M., Paredes, E., Leiva, S., Van Kruningen, H., Kruze, J. (2011). European hares in Chile: A different Lagomorph reservoir for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*? *J Wildl Dis.* 47:734-738.
- Schoenbach, V.J. (2000). Causal Inference. In Schoenbach VJ, Rosamond WD, Editors. *Understanding the Fundamentals of Epidemiology - an evolving text* (pp.269-288). Ed. Capen Hill: University of North Carolina.
- Sechi, L.A., Scanu, A.M., Molicotti, P., Cannas, S., Mura, M., Dettori, G., Fadda, G. and Zanet S. (2005). Detection and Isolation of *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* from Intestinal Mucosal Biopsies of Patients with and without Crohn's Disease in Sardinia. *J. Gastroenter.* 100:1529-136.
- Sergeant, E.S., Baldock, F.C. (2002). The estimated prevalence of Johne's disease infected sheep flocks in Australia. *Aust Vet J.* 80:762-768.
- Sergeant, E.S.G., Marshall, D.J., Eamens, G.J., Kearns, C. and Whittington, R.J. (2003). Evaluation of an absorbed ELISA and an agar-gel immuno-diffusion test for ovine paratuberculosis in sheep in Australia. *Prev. Vet. Med.* 61: 235-248.
- Sezzi, E., Lillini, E., de Sanctis, B., Scorsino, G., Valentini, A., Pariset, L. and De Grossi, L. (2007). Paratuberculosis in sheep: diagnostic methods and genetic susceptibility. *Proceedings of the Ninth International Colloquium on Paratuberculosis.* Tsukuba, Japon
- SIAP (2010) Servicio de Información Agroalimentaria del Gobierno de México.  
URL:<http://www.sagarpa.mx/quienesomos/datosabiertos/siap/Paginas/estadistica.aspx>
- Sigurdardottir, O. G., Press, C.M., Saxegaard, F. and Evensen, O. (1999). Bacterial isolation, immunological response, and histopathological lesions during the early subclinical phase of experimental infection of goat kids with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Pathol.* 36:542-550.
- Singh, S.V., Singh, A.V., Singh, P.K., Kumar, A., Singh, B. (2011). Molecular identification and characterization of *Mycobacterium avium* subspecies

- paratuberculosis* in free living non-human primate (Rhesus macaques) from North India. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 34:267-71.
- Snow, G. A. (1970). Mycobactins: iron-chelating growth factors from mycobacteria. *Bacteriol. Rev.* 34:99-125.
- Stevenson K. (2010). Comparative differences between Strains of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*. In: Behr, M., Collins, M. (Ed.) *Paratuberculosis, Organism, Disease, Control* (pp.126-137). CAB International.
- Strickland, S. J., H. M. Scott, M. C. Libal, A. J. Roussel, and E. R. Jordan. (2005). Effects of seasonal climatic conditions on the diagnosis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy cattle. *J. of Dairy Sci.* 88:2432-2440.
- Storset, A. K., Berg, I., Djonne, B. (2005). Evaluation of the gamma interferon test for diagnosis of paratuberculosis in goats. *Vet. Immun. and Immun.* 107:87-94.
- Sweeney, R.W. (2011). Pathogenesis of paratuberculosis - *Veterinary Clinics: Food Animal Practice.* 27: 537-546
- Tafti, A. K., Rashidi, K. (2000). The pathology of goat paratuberculosis: Gross and histopathological lesions in the intestines and mesenteric lymph nodes. *Journal of Veterinary Medicine Series B-Infectious Diseases and Veterinary Public Health.* 47:487-495.
- Tiwari, J.A. VanLeeuwen, I.R. Dohoo, G.P. Keefe, J.P. Haddad, J.P., Scott, H.M., Whiting, T. (2009). Risk factors associated with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* seropositivity in Canadian dairy cows and herds. *Preventive Veterinary Medicine.* 88:32-41.
- Toribio, J.A., Sergeant, E. (2007). A comparison of methods to estimate the prevalence of ovine Johne's infection from pooled faecal samples. *Aust. Vet. J.* 85: 317-324.
- Tortora, P.J. (2008). Enfermedades emergentes para el rebaño ovino mexicano. // *Congreso: Rentabilidad de la Ganadería Ovina.* Querétaro, México. Abril 9-18.

- Trusfield, M. (2005). Describing disease occurrence, Surveys and Observacional estudios. In, *Veterinary Epidemiology*. 3<sup>rd</sup> ed. UK. Blackwell publishing.
- Turenne, C. Y., Wallace, R., Jr, & Behr, M. A. (2007). *Mycobacterium avium* in the postgenomic era. *Clinical microbiology reviews*, 20:205–229.
- Turenne, C.Y. and Alexander, D.C. (2010). *Mycobacterium avium* complex in: Behr MA, Collins DM, (Ed.) *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control*. (pp.60-72) CAB International.
- Ventura, A.J.R. (2010). Evaluación de tres técnicas de diagnóstico en la detección de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* en ovinos. Tesis de Maestría en Ciencias. Posgrado Interinstitucional en Ciencias Pecuarias. Universidad de Guadalajara, Guadalajara, México.
- Whan, L., Ball, H.J., Grant, I.R., Rowe, M.T. (2005). Occurrence of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in untreated water in Northern Ireland. *Appl. Envir. Microbiol.* 71:7107-7112.
- White, C.I., Birtles, R.J., Wigley, P., Jones, P.H. (2010). *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in free-living amoebae isolated from fields not used for grazing. *Vet. Rec.* 166:401-2.
- Whitlock, R.H., Wells, S.J., sweeney, R.W and Van Tiem, J. (2000). ELISA and fecal culture for Paratuberculosis (Johne´s disease): sensitivity and specificity of each method. *Vet. Mocrbol.* 77: 387-398
- Whitlock, R.H., (2010). Paratuberculosis control measures in the USA. In: Behr MA and Collins DE editors. *Paratuberculosis, Organism, Disease, Control* (pp.319-329) CAB International.
- Whittington, R.J., Reddacliff, L.A., Marsh, I., McAllister, S., Saunders, V. (2000). Temporal patterns and quantification of excretion of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in sheep with Johne's disease. *Aust. Vet. J.* 78: 34-37.
- Whittington, R. J., C. A. Taragel, S. Ottaway, I. Marsh, J. Seaman, and V. Fridriksdottir. (2001). 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.* 79:311-322.
- Whittington, R.J., Marshall, D.J., Nicholls, P.J., Marsh, A.B., Reddacliff, L.A. (2004). Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in the environment. *Appl. Envir. Microbiol.* 70: 2989-3004.
- Whittington, R., McGregor, H. (2005). Epidemiology of Ovine Johne's Disease. 2. Pasture Contamination Level and Age Susceptibility. *Meat and Livestock Australia*, Sydney. <http://hdl.handle.net/2123/950>
- Whittington, R.J. and Windsor, P.A. (2009). In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a critical review and meta-analysis. *Vet. Journal.* 179:60-69.
- Whittington. R. (2009). Factors Affecting Isolation and Identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from Fecal and Tissue Samples in a Liquid Culture System. *Journal of clinical microbiology*, 47:614-622.
- Whittington. R., 2010. Cultivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. In: Behr MA, Collins DM, Edit. *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control* (pp.244-266). CAB International.
- Whittington, R. J., Marsh, I. B., Saunders, V., Grant, I. R., Juste, R., Sevilla, I. A., Manning, J.B.E., Whitlock, R. H. (2011). Culture Phenotypes of Genomically and Geographically Diverse *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Isolates from Different Hosts. *Journal of Clinical Microbiology.* 49:1822 – 1830.
- Windsor, P.A., Whittington, R.J. (2010). Evidence for age susceptibility of cattle to paratuberculosis. *Vet. Journal.* 184, 37–44.
- Wu, C.W., Livesey, M., Schmoller, S.K., Manning, E.J.B., Steinberg, H., Davis, W.C., Hamilton, M.J., Talaat, A.M. (2007). Invasion and persistence of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* during early stages of Johne's disease in calves. *Infec. and Immun.* 75:2110-2119.

## ANEXOS

Anexo: A
----------

### Prueba de ELISA

Se empleará la prueba de ELISA indirecta para la detección de los animales seropositivos empleando el antígeno protoplasmático de paratuberculosis conocido como PPA3 (Allied, Mo.). Para la adsorción del antígeno en las placas de ELISA se depositarán 100  $\mu$ l del antígeno a una concentración de 40  $\mu$ g/ml con tampón carbonato, se manteniéndose a 4° C durante toda la noche para después realizar 3 lavados con solución salina con Tween; las placas secas se mantienen a -20° C hasta el momento de su utilización. Con el fin de incrementar la especificidad de la prueba, los sueros problema y los controles se pre adsorben con una solución de *Mycobacterium phlei* al 5%, en una proporción de 1:1 durante 16 hrs. En cada pocillo de la placa para ELISA se depositan 99  $\mu$ l de PBS-TG y se añade 1  $\mu$ l de suero de manera pareada. Las placas se incuban a temperatura ambiente dentro de una cámara húmeda durante 2 horas, posteriormente se realizan 3 lavados con PBS-TG y se depositan 100  $\mu$ l de anti-IgG ovina marcada con peroxidasa de rábano (HRP) (Sigma Aldrich) a una dilución de 1:4500 con PBS-TG y se incuban en cámara húmeda a temperatura ambiente, al término de 2 horas se realizan 3 lavados con PBS-TG. Inmediatamente se añaden 100  $\mu$ l de ABTS (Sigma Aldrich) recién preparado el cual se dejó actuar en oscuridad sobre un agitador orbital durante 20 minutos. La lectura se realizará en un espectrofotómetro de 8 canales empleando un filtro de 405 nm.

Para determinar la positividad de los sueros problema, el promedio de la densidad óptica de cada suero se dividirá entre el promedio de la densidad óptica del control positivo, cuando el cociente resultante sea mayor o igual a 0.80 se considerará seropositiva la muestra. Es importante destacar que este protocolo de ELISA ha sido descrito anteriormente y presenta una especificidad y sensibilidad de 75% y 64%, respectivamente (García MJF *et al*, 1991).

### Reactivos requeridos para el desarrollo de la prueba de ELISA

- Suspensión de *Mycobacterium phlei*  
5 g de *M. phlei*  
Solución salina al 8.5% (NaCl 8.5%) c.b.p. 1 l
- Buffer Carbonato  
5.3 g de Bicarbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )

Agua destilada c.b.p. 1 l

Ajustar el pH a 9.6

- Antígeno

0.04 mg de antígeno PPA3 (Allied Monitor, USA)

1 ml de buffer carbonato

- PBS-TG (Solución salina amortiguada tween gelatina)

8 g de Cloruro de sodio (NaCl)

0.2 g de cloruro de potasio (KCL)

1.44 g de fosfato dibásico de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )

0.24 g de fosfato monobásico de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )

Agua destilada c.b.p. 1 l

Ajustar el pH a 7.4

Esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 minutos.

Agregar 1 g de gelatina bacteriológica y 500  $\mu\text{l}$  de Tween 80, el cual puede preferentemente debe esterilizarse por medio de filtración.

- Conjugado

Diluir 1:4500 el anticuerpo antiIgG marcado con HRP en PBS-TG

- Tampón citrato 0.05 M

- Solución de ácido cítrico monohidratado

22 g de ácido cítrico monohidratado ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_3$ )

Agua destilada c.b.p. 1 l

- Solución de citrato sódico

22.49 g de citrato de sodio ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ )

Agua destilada c.b.p. 1 l

Mezclar 660 ml de solución de ácido cítrico con 470 ml solución de citrato sódico, aforar a 2 l con agua destilada. Ajustar el pH a 4.0. No almacenar esta solución por más de 2 semanas.

- Cromógeno

50 ml Tampón citrato pH 4

5.48 mg de ABTS

19  $\mu\text{l}$  de solución madre (10ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  + 120 ml de agua destilada)

Preparar al momento de utilizarlo en un recipiente protegido de la luz del sol (OIE, 2004; Chávez *et al*, 2008).

Anexo: **B**

Cultivo bacteriológico.

El cultivo bacteriológico a partir de heces o de muestras de tejido intestinal y/o nódulos linfáticos es uno de los métodos más frecuentemente empleados para el diagnóstico de MAP, y considerado como el “Gold estándar”

En el caso del cultivo bacteriológico como técnica de diagnóstico de paratuberculosis, este se realizará, en el caso de animales que presenten signos clínico sospechosos a la enfermedad dentro de los diferentes rebaños que participan en el estudio.

Los medios en los que se cultivara en forma simultanea cada una de las muestras obtenidas, serán: 1.-Lowenstein-Jensen(L-J) sin piruvato y con micobactina 2.- L-J sin piruvato y sin micobactina (Anexo B=). Como método de diagnóstico diferencial con otros tipos de micobacterias que puedan estar presentes ya que MAP es dependiente de la micobactina.

Los cultivos se realizarán a partir de las muestras tomadas en las siguientes 2 formas:

a.- A partir de muestra de excremento en animales que hayan resultado positivos a PTB en la prueba de IDGA.

b.- A partir de mucosa de tejido intestinal (Válvula íleo-cecal)

Para el caso de las muestras de excremento obtenidas se procederá a procesarlas de la siguiente manera para proceder a su descontaminación: Se tomarán 2 gramos de heces y se transfiere a un tubo que contenga 35 ml de agua destilada estéril, se mezclan y se mantienen durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, del sobrenadante presente se remueve unos 10ml y se colocan en tubos estériles de 50 ml. Las muestras se centrifugaron a 1700 x g durante 20 min., una vez concluido el proceso de centrifugación se procede a decantar el sobrenadante obteniendo una pastilla, la cual se re-suspenderá en 30 ml de solución de hexadecilpiridinio (HPC) al 0.75%.

Esta suspensión se deja en proceso de descontaminación durante 16 horas a temperatura ambiente, manteniendo los tubos en posición vertical. Posterior a lo cual con una pipeta de transferencia estéril se toma el material de la interfase inoculándose de 3 a 4 gotas y manteniendo el tubo en forma horizontal para su distribución a lo largo del medio de cultivo.



Los tubos se dejan así durante una semana con los tapones sin apretar para permitir la absorción y evaporación de la humedad en la superficie del medio; posteriormente se cerrarán firmemente manteniéndolos en posición vertical durante 50 semanas. El crecimiento bacteriano se verificará al menos cada 4 semanas.

Para el caso de cultivo a partir de tejido. Se tomarán 4g de mucosa de la válvula íleo-cecal y se colocarán en un vial estéril con 50 ml de tripsina al 2.5%, la mezcla se ajusta a un pH neutro, con ayuda de una solución de NaOH al 4%, se deja agitando durante 30 minutos a temperatura ambiente en un mezclador magnético. Posteriormente se filtra a través de una gasa y centrifugando el filtrado a 2000 g por 30 minutos, el sobrenadante se descarta y el sedimento es re-suspendido en 20 ml de una solución de HPC al 0.75%.

Esta suspensión se deja en proceso de descontaminación durante 16 horas a temperatura ambiente, manteniendo los tubos en posición vertical. Posterior a lo cual con una pipeta de transferencia estéril se toma el material de la interfase inoculándose de 3 a 4 gotas y manteniendo el tubo en forma horizontal para su distribución a lo largo del medio de cultivo.

Los tubos se dejan así durante una semana con los tapones sin apretar para permitir la absorción y evaporación de la humedad en la superficie del medio; posteriormente se cerrarán firmemente manteniéndolos en posición vertical durante 50 semanas. El crecimiento bacteriano se verificará al menos cada 4 semanas (OIE, 2004; Chávez *et al*, 2008, NRC, 2003).

Preparación del medio Löwenstein Jensen con y sin micobactina

Ingredientes

Medio Base:	37.3g
Glicerina:	12 ml
Agua destilada:	600ml
Huevo:	1 litro
Anfotericina B:	50 mg.
Cloranfenicol:	500 mg.
Penicilina:	1,000,000 UI
Micobactina:	2 mg

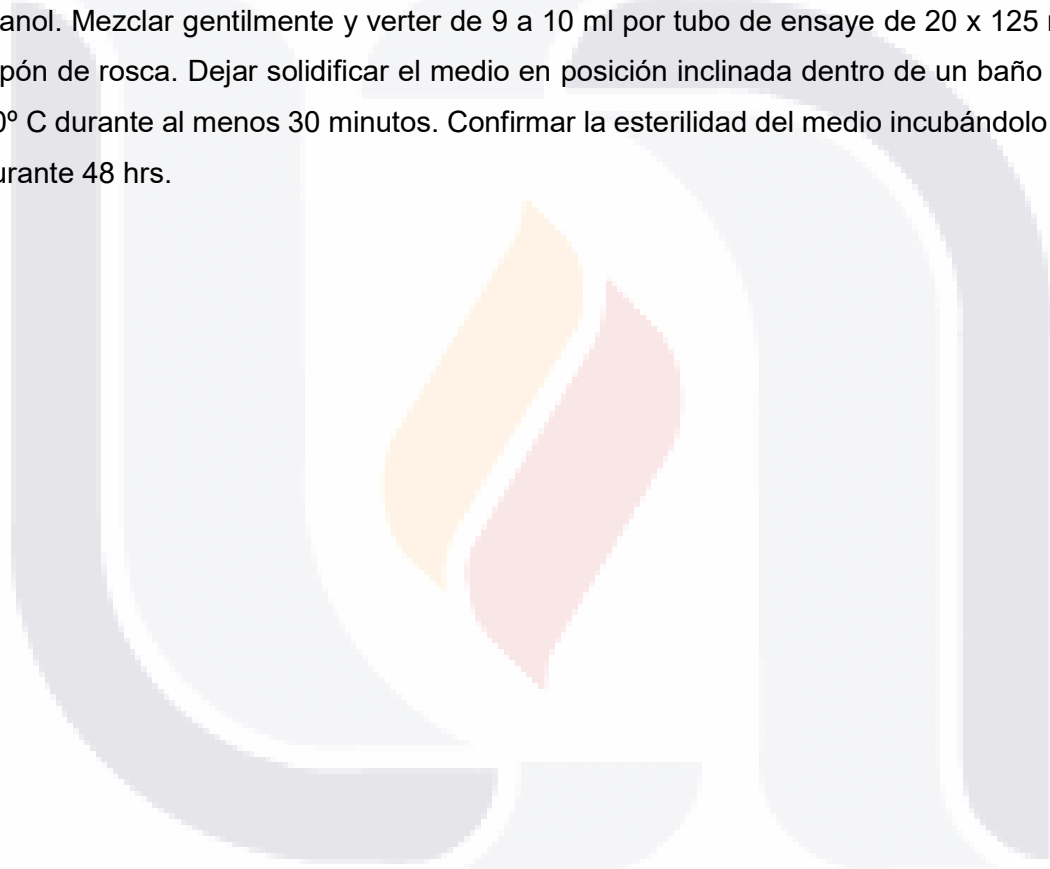
Preparación del huevo:

Lavar los huevos en agua caliente con detergente, enjuagar con agua limpia sin jabón y dejar secar los huevos al aire sobre una toalla estéril. Sumergir los huevos en etanol

al 75% durante 30 minutos. Secar los huevos entre capas de toallas estériles. Romper los huevos en la parte superior de un vaso de precipitado estéril y vaciarlos en un frasco de licuadora estéril y mezclar. Filtrar a través de dos capas de gasa en un embudo estéril.

#### Preparación del medio

Disolver el medio base en el agua destilada, agregar la glicerina. Calentar la solución mientras se agita continuamente hasta que hierva. Esterilizar en autoclave (15 min a 121° C). Cuando esta solución se enfríe aproximadamente a 50° C, añadir asepticamente 1 l de huevo, antibióticos y en caso pertinente, la micobactina previamente disuelta en 4 ml de etanol. Mezclar gentilmente y verter de 9 a 10 ml por tubo de ensaye de 20 x 125 mm con tapón de rosca. Dejar solidificar el medio en posición inclinada dentro de un baño María a 80° C durante al menos 30 minutos. Confirmar la esterilidad del medio incubándolo a 37 °C durante 48 hrs.



Anexo: C

PCR IS900 PARA EL DIAGNÓSTICO DE MAP

Para la realización de la prueba de PCR, se emplearán los iniciadores IS900P3N (5'-GGG TGT GGC GTT TTC CTT CG-3') e IS900P5N (5'-ATTTGCGCCGCCACCGCCACG-3'). El protocolo del termociclador propuesto será en 1 ciclo inicial de desnaturalización a 94° C por 5 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 40 s, alineamiento a 68° C por 40 s, extensión a 72° C por 40 s y finalmente un ciclo de 72° C por 5 min. Para así realizar posteriormente una electroforesis en gel de agarosa al 2% con TAE y 5 µl de bromuro de etidio (Chávez *et al*, 2004; Favila *et al*, 2008; NRC, 2003; OIE 2004).

Proceso:

Encender la cabina para PCR (*My PCR Prep Station, Mystaire*) y encender la luz UV girando el cronómetro a tope (aproximadamente 15 min).

Mientras tanto, descongelar una alícuota de mezcla para PCR, los iniciadores, el control positivo y las muestras de ADN a amplificar, colocándolos sobre un contenedor para transporte con temperatura de congelación (*cooler*).

Una vez terminado el tiempo de descontaminación de la campana con LUV, levantar la puerta para que inicie el flujo de los filtros y pueda empezar a trabajar.

Introducir a la campana el contenedor con los reactivos para evitar que estén a temperatura ambiente. Tomar los tubos para PCR necesarios de acuerdo al número de muestras, e identificarlos. Adicionalmente se toman 2 tubos más, 1 para el control positivo (por ejemplo, ADN de cultivo de Orix obtenido mediante choque térmico) y 1 para el negativo (agua).

Agregar en el microtubo para PCR:

20 µl de mezcla para PCR Roche,

1 µl de oligonucleótido P3N (5'gggtgtggcggtttccttcg 3') a una concentración 0.5 µM

1 µl de oligonucleótido P5N (5'atttcgccgccaccgccacg 3') a una concentración 0.5 µM

3 µl de ADN de la muestra (leucocitos, heces, tejido, leche, colonia bacteriana MAP)

Cerrar los tubos y dar un pulso de 10 seg.

Colocar los microtubos en el termociclador. Seleccionar el programa C 03 IS900 (ver indicaciones para uso del termociclador)

Las condiciones del programa son:

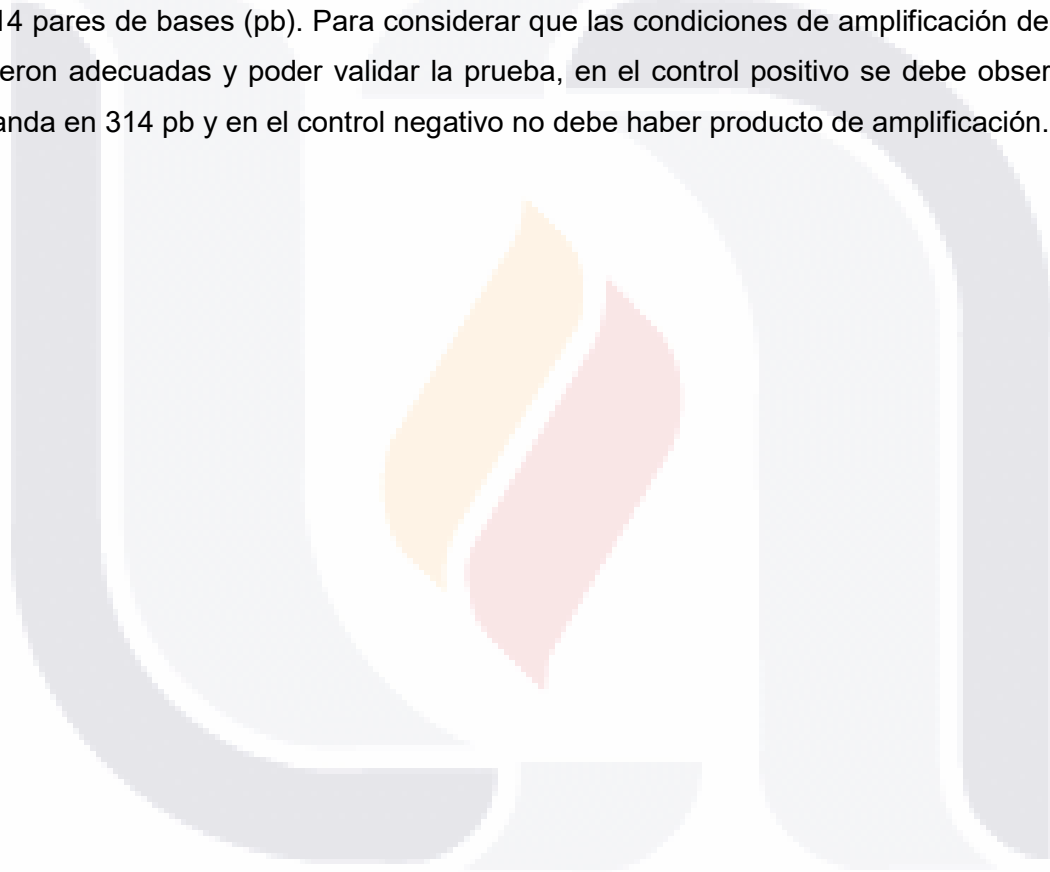
- a) 94 °C 5 min, 1 ciclo.
- b) 94 °C 40 seg, 56 °C 40 seg, 72 °C 40 seg, 35 ciclos.
- c) 72 °C 5 min, 1 ciclo.
- d) mantenimiento de las muestras en el termociclador a 10 °C.

\*El programa de amplificación dura aproximadamente 2 horas y media.

Realizar electroforesis en gel de agarosa 1% con TAE 1X, 85 volts por 45-60 min.

Teñir con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) y visualizar en el transiluminador.

Interpretación: para considerar una muestra como positiva se debe visualizar una banda de 314 pares de bases (pb). Para considerar que las condiciones de amplificación de la PCR fueron adecuadas y poder validar la prueba, en el control positivo se debe observar una banda en 314 pb y en el control negativo no debe haber producto de amplificación.



Anexo: D
----------

Categorías de prevalencia.

## Baja prevalencia:

- No presencia ni diagnóstico de casos clínicos.
- Resultado menor a 3% en ELISA positivos.
- Manejo y control de factores de riesgo asociados.

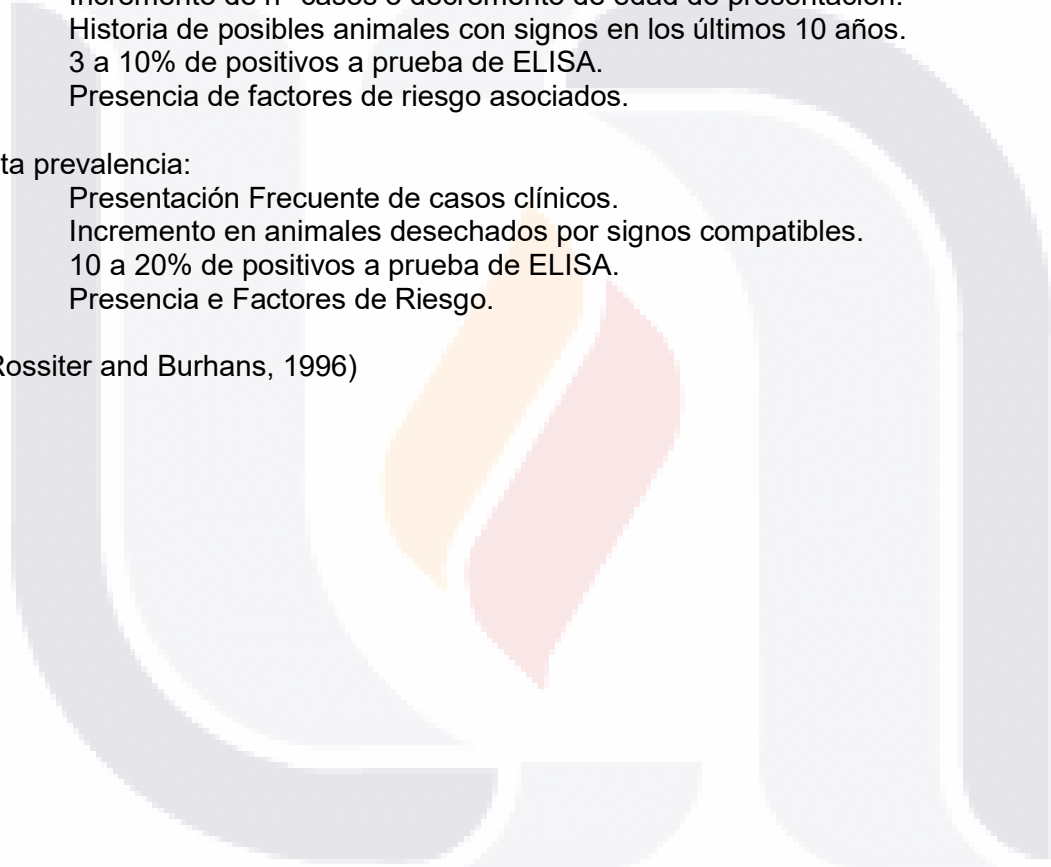
## Moderada prevalencia:

- Presentación ocasional de casos clínicos en adultos.
- Incremento de n° casos o decremento de edad de presentación.
- Historia de posibles animales con signos en los últimos 10 años.
- 3 a 10% de positivos a prueba de ELISA.
- Presencia de factores de riesgo asociados.

## Alta prevalencia:

- Presentación Frecuente de casos clínicos.
- Incremento en animales desechados por signos compatibles.
- 10 a 20% de positivos a prueba de ELISA.
- Presencia e Factores de Riesgo.

(Rossiter and Burhans, 1996)



Anexo: E
----------

Protocolo de realización de necropsia.

- Se inicia con la borrega expuesta en decúbito lateral izquierdo.
- Se hace una inspección externa del cadáver se toma identificación y reseña.
- Examen de la conjuntiva, cornea. Observando coloración, opacidad corneal, inflamaciones o ulceraciones.
- Examen externo de la cavidad oral. Analizando dentadura y posibles alteraciones, coloración, lesiones, úlceras u otras.
- Separar las extremidades izquierdas hacia la línea dorsal, junto con la piel a partir de un corte en la línea media ventral desde la mandíbula a la pelvis, desarticulando el fémur del coxis, analizando el líquido sinovial, tejido subcutáneo, posibles hemorragias, inflamaciones, aplicación de inyecciones etc.
- Se retira la musculatura abdominal del lado expuesto y el omento. Evaluando presencia de líquido, fibrina, inflamación y situación de las vísceras
- De igual manera se retira la caja torácica del costado expuesto cortando cerca del esternón y unos cm debajo de la espina dorsal, hasta la entrada de la tráquea.
- Se corta el diafragma hasta exponer por completo las vísceras torácicas.
- Se hace un análisis de los órganos "In situ".
- Se hace un corte submaxilar y se libera la lengua, tráquea y esófago, examinando el área de la faringe.
- Se libera la tráquea junto con pulmones y corazón, para analizarlos fuera del cadáver, cuidando no seccionar el esófago.
- Se incide la tráquea en forma longitudinal observando la integridad de la mucosa, observando cambios postmortem o lesiones patológicas, se palpa el tejido pulmonar y se corta a lo largo de los pulmones, siguiendo la ruta de los bronquios y el parénquima.
- Se separa el corazón liberándolo del pericardio y se hacen cortes a lo largo de él, a manera de exponer ambos ventrículos seccionando musculatura y válvulas.
- Se observa, se palpa y se inspecciona el hígado, evaluando coloración, cambios de tamaño y consistencia de los ductos biliares, se separa del cuerpo y se realizan incisiones para evaluar los ductos u otras alteraciones.
- Se procede a inspeccionar el tracto digestivo, observan alteraciones aparentes, la grasa mesentérica y posición de los órganos.

- Se anuda el esófago y se procede a seccionar y retirar el rumen, retículo omaso y abomaso para inspeccionarlos aparte, se inciden y se analiza la mucosa, observando posibles inflamaciones, úlceras o presencia de cuerpos extraños; se determina el Ph y contenido ruminal.
  - Se extraen los intestinos, analizando los nodos mesentéricos, observando elongaciones, edematizaciones etc. y sus alteraciones, serosas, acúmulos de gas, inflamación, congestión etc.
  - Los ganglios se separan y se inciden longitudinalmente analizando la corteza, medula y posibles alteraciones.
  - Se incide el intestino longitudinalmente y se expone, observando la mucosa, cambios en ella, irritaciones y acumulo de tejido linfóide en placas de Peyer, ulceraciones etc.
  - Se analizan los contenidos, textura y conformación de las heces y contenidos intestinales, posibles exudados, decoloraciones etc.
  - Se revisan riñones, uréteres y vejiga, observando textura, forma, posibles alteraciones.
  - Se revisan órganos reproductivos in situ y analizando posibles alteraciones.
  - Se incide la articulación femoro-tibio-rotuliana, u otras si se cree necesario, observando las características y cantidad del líquido presente en ellas.
  - Se abre el cráneo extrayendo el cerebro, previa inspección de membranas, presencia de congestión u otra alteración.
  - Se analizan los nervios de la cadena ganglionar y en caso de ser requerido se extrae la medula del cordón espinal para su inspección.
  - Se registran todas las lesiones presentes correspondientes a la inspección.
  - Se rotulan las muestras obtenidas y se conservan en la forma adecuada (refrigeración etc.)
  - Se cierra el cadáver y se dispone en la forma adecuada, incineración, se entierra etc.
- (Glock et al 2007; Chávez et al, 2008)

Anexo F

**CUESTIONARIO DE EVALUACIÓN DE PRESENCIA DE FACTORES DE RIESGO EN  
EXPLOTACIONES OVINAS**  
(Versión octubre 2009 GEPG)

Fecha: \_\_\_\_\_

Explotación:  
\_\_\_\_\_

Ubicación de la explotación:  
\_\_\_\_\_

Nombre del encuestador:  
\_\_\_\_\_

Nombre del encuestado:  
\_\_\_\_\_

Puesto o función: \_\_\_\_\_

***Instrucciones de encuesta:***

Señalar la respuesta adecuada a cada una de las preguntas.

Las preguntas pueden ser respondidas por la persona encuestada o por supervisión del encuestador para verificar la certeza de algunas de ellas (se debe indicar en cada respuesta el origen de ella: E encuesta, V verificación personal).

**Categorías:**

**Elementos generales del sistema de producción.**

	<b>PREGUNTA</b>	<b>Respuesta</b>	<b>V/E</b>
1	Tiempo de antigüedad de instalada la explotación:	(1 a 5 años) (mayor a 6 años)	
2	El origen de los Animales fundadores de la explotación es de una Granja Reconocida por calidad y seriedad.	(Si) (No)	
3	El objetivo de producción de la explotación es:	(cría) (Compra venta)	
4	El sistema de producción es:	(Intensivo), (Mixto)	
5	El tamaño del rebaño total es:	(< 500) (>501)	
6	El tamaño del rebaño de adultos es:	(< 500) (>501)	
7	Tipo de Razas explotada	(Cruza o criolla) (Raza Pura)	



8	Se producen otras especies en la explotación.	( SI) (NO)	
9	Se dedicaba la granja antes a otra actividad pecuaria:	( SI) (NO)	
10	Hay cercanía de la explotación con otras granjas de rumiantes.	(Menor a-500m) (Más de 500m)	
11	Interacción del rebaño con otras explotaciones de rumiantes domésticos.	(NO)(Caprinos)	
12	Como productor ¿Tiene conocimientos de producción en la especie?	(Suficiente) (Escasa)	
13	Como se capacito	(Empírico) (Cursos formales)	

**Prácticas generales de manejo del rebaño.**

	<b>PREGUNTA</b>	<b>Respuesta</b>	<b>V/E</b>
1	La mayoría del rebaño se compone por hembras de edad:	(1-2) (3y más)	
2	Origen de los sementales	(interno)(compra)	
3	Origen de los reemplazos de hembras.	(interno)(compra)	
4	Ultima vez que adquirió vientres.	(Menos de 3 año) ( más de 4)	
5	Los animales comprados están probados para PTB.	(Si) (No)	
6	Hay flujo de animales (Compra-venta) en el rebaño además de las destinadas a criadero.	(Si) (No)	
7	Hay un programa ordenado de reemplazos.	(Si) (No)	
8	La tasa de reemplazo es:	(<20%) (>20%)	
9	La densidad de población por corrales: (Criterio: 1.5 a 2.5 m <sup>2</sup> x hembra con cordero)	(Alta) (Baja)	
10	Hay lotificación productiva.	(Si) (No)	
11	Hay áreas separadas para partos y lactancia en general	(Si) (No)	
12	Hay áreas de parto individuales.	(Si) (No)	

13	Las áreas de parto son comunes con hembras vacías o gestantes.	(Si) (No)	
14	Las áreas de lactación son comunes con hembras vacías o gestantes.	(Si) (No)	
15	Existen slats en etapas de parto, lactancia o cría en la explotación.	(Si) (No)	

**Prácticas de Manejo Nutricional y Alimentación.**

	<b>PREGUNTA</b>	<b>Respuesta</b>	<b>V/E</b>
1	La principal fuente de alimentación es:	(Pradera o potrero)(Comedero en corral)	
2	Manejo de la pradera o Potrero (Rotación)	(Si) (No)	
3	Comen en misma pradera/potero adultos y recría	(Si) (No)	
4	Se suplementa en corrales/pesebre	(Si) (No)	
5	La calidad nutricional de los alimentos (Potreros, praderas o en pesebre) es	(Optima) ( deficiente)	
6	Condición Corporal de hembras de acuerdo a etapa productiva.	(Si) (No)	
7	Hay estrés alimenticio en hembras gestantes y en lactancia (alimentación deficiente)	(Si) (No)	
8	El número y/o espacio de comederos es.	(Adecuado) (Insuficiente)	
9	Alimentación con subproductos de origen animal.	(Si) (No)	
10	El origen de los alimentos o materia prima es:	(Propia) (Comprada)	
11	Los cultivos se fertilizan con heces:	(Si) (No)	
12	La fuente de agua es:	(Pozo) (bordo/ otra6)	
13	Los bebederos son:	(Bebedero Individual)(Piletas)	
14	Hay presencia de heces en los bebederos.	(Si) (No)	
15	Hay presencia de heces en los comederos.	(Si) (No)	
16	Los implementos para alimentar son los mismos que se emplean para el manejo de heces.	(Si) (No)	

17	Los implementos para alimentar son los mismos para TODOS los animales de la granja.	(Si) (No)	
----	-------------------------------------------------------------------------------------	-----------	--

**Control sanitario**

	<b>PREGUNTA</b>	<b>Respuesta</b>	<b>V/E</b>
1	Hay Barreras y programas de Bioseguridad general.	(Si) (No)	
2	Hay Medidas y o programas específicas de Medicina preventiva.	(Si) (No)	
3	Hay Control de fauna nociva	(Si) (No)	
4	Hay perros sueltos en la explotación que vayan de un corral a otro.	(Si) (No)	
5	Contacto con Fauna silvestre	(Si) (No)	
6	Presencia de visitantes a la explotación e interacción de estos con los animales o instalaciones.	(Si) (No)	
7	Frecuencia de limpieza de instalaciones generales	(semanal-Mensual)(mayor a 3 meses)	
8	Limpieza de área de partos y lactancia	(semanal-Mensual)(mayor a 3 meses)	
9	La eliminación de excretas es	(Apila en explotación) (venta y Cultivos)	
10	Eliminación de cadáveres es	(Fosa/Incineración)(Fuera de la explotación)	
11	El diagnóstico y prescripción de tratamiento de casos clínicos es realizado por:	(Empleado/Dueño) (MVZ)	
12	El tratamiento de casos clínicos es aplicado por:	(Empleado/Dueño) (MVZ)	
13	El diagnóstico de casos clínicos es realizado por medio de:	(Examen físico)(pruebas)	
14	Se realizan necropsias para determinar causas de mortalidad:	(Si) (No)	
15	Existencia de Mortalidad y casos sugerentes a Paratuberculosis.	(Si) (No)	
16	Desde cuando ha tenido casos con signos sugestivos a PTB.	(1-5 años) (6 o más años)	

17	Existencia de casos sugerentes a Paratuberculosis en al área de partos y lactancia.	(Si) (No)	
18	Hay posibilidad de hembras positivas (a ELISA) en área de parto y lactancia.	(Si) (No)	
19	Hay Contacto de corderos con heces de adultos	(Si) (No)	
20	La ubre y área perianal está limpia de heces al parto	(Si) (No)	
21	Contaminación de alimentos por heces.	(Si) (No)	
22	Contaminación de bebedero, bordos o piletas por heces (Rumiantes)	(Si) (No)	
23	Contaminación de fuentes de agua x heces (Rumiantes)	(Si) (No)	
24	Contaminación de alimentos o áreas de corderos por calzado de trabajadores sucio con heces de hembras adultas.	(Si) (No)	

**Administración y Personal**

	<b>PREGUNTA</b>	<b>Respuesta</b>	<b>V/E</b>
1	Número de trabajadores en la explotación	(1-2) (3 o más)	
2	Quién determina la organización del trabajo.	(Dueño/Encargado) (MVZ)	
3	Como productor/ encargado ¿Tiene conocimientos de producción en la especie?	(Si) (No)	
4	Como se capacito	(Empírica/experiencia) (Formalmente)	
5	Definiciones claras de actividades.	(Si) (No)	
6	Orden en el flujo de trabajo de corrales por trabajadores.	(Si) (No)	
7	Hay capacitación del personal que labora en el rebaño	(Si) (No)	
8	Seguimiento de registros y/o controles.	(Si) (No)	
9	Hay visitantes de otras explotaciones a esta o compradores.	(Si) (No)	

