



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



**DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA Y FACTORES RIESGO DE
PARATUBERCULOSIS BOVINA (MAP) EN GANADO LECHERO EN HATOS DEL
ESTADO DE PUEBLA**

**TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE MAESTRA EN
MEDICINA VETERINARIA Y PRODUCCIÓN ANIMAL**

PRESENTA:

MVZ. RUBY SANDY MORENO MEJIA

DIRECTORES DE TESIS

DR. ARNULFO VILLANUEVA CASTILLO

JUNIO DEL 2018

DEDICATORIAS

Josué 1:6

Dedico esta tesis a Dios, al universo que conspira a mi favor,

a mis padres Rosa y Roberto que lo dan todo para que yo sea quien soy y pueda cumplir con mi propósito,

a mis hijos Mario Alexis, Aylin Arabelle e Isis Minerva porque su llegada a echo mi vida maravillosa y cada día más fuerte,

a mis hermanos Nelly y Adrian por su complicidad y apoyo,

y a mi amado esposo Arnulfo, por ser mi pilar e inspiración.

AGRADECIMIENTOS

1 Corintios 1:68

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, a la Secretaria de Investigación y Estudios de Posgrado, a mis profesores, al Comité de Fomento y Salud Animal del Estado de Puebla, al CEIEPAA, a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado de la BUAP, así como mis directores de tesis Arnulfo Villanueva Castillo y Gilberto Chávez Gris, y asesores Rosa de Carmen Xicoténcatl Palacios y Oberlin Soberanis Ramos, a mis sinodales Jorge Ezequiel Hernández Hernández, Gabriel Gerardo Aguirre Espíndola, Fabiola Rodríguez Andrade y José Antonio Díaz Reyna.

INDICE

DEDICATORIAS	i
AGRADECIMIENTOS	ii
Índice de Tablas	v
Índice de Figuras	vi
Resumen	vii
Abstract	viii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	1
I.2 JUSTIFICACIÓN.....	2
II. HIPÓTESIS.....	3
III. OBJETIVOS	4
III.1 Objetivos específicos.	4
III.2 Objetivos particulares.....	4
IV. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
4. La enfermedad	5
4.1. Características generales.....	5
4.3. Excreción de MAP en animales infectados y transmisión	5
4.4. Etapas de la infección según la excreción de MAP	7
4.5. Factores de riesgo del animal.....	8
4.6 Etapa subclínica.....	9
4.7. Etapa clínica.....	11
4.9. EPIDEMIOLOGÍA.....	13
4.9.1. Factores de riesgo del agente etiológico.....	13
4.9.2. Factores de riesgo del ambiente.....	13
4.9.3. Excreción de MAP en animales infectados y transmisión	14
4.10. IMPACTO ECONÓMICO	16
4.10.1 Las pérdidas económicas debidas a la paratuberculosis	16
4.11. DIAGNÓSTICO	18
4.11.1. Pruebas de dermorreacción	19

4.11.2. Pruebas serológicas	19
4.11.6. Técnica de Ziehl Neelsen	25
4.11.7. Cultivo bacteriano.	25
4.11.8. Inmunohistoquímica.....	26
4.11.9. Otros métodos diagnósticos	27
4.12. CONTROL Y PREVENCIÓN.....	28
4.12.1. Control de la enfermedad	28
5. MATERIALES Y MÉTODOS	30
5.1. Localización.....	30
5.2. Tipo de Estudio y Tamaño De Muestra	30
5.3. Criterios de Inclusión y Exclusión.....	30
5.4. Muestreo Serológico	30
5.5. Técnica de laboratorio diagnostico ELISA.	31
5.6. Resultados e interpretación	31
5.7. Variables a considerar para el modelo estadístico sobre factores de riesgo.	32
5.8. Análisis Estadístico.	33
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
VII. CONCLUSIONES	53
VIII. BIBLIOGRAFÍA.	54
ANEXO.....	62

Índice de Tablas

Tabla 1. Variables relacionadas a POR mediante la prueba de Kruskal Wallis 41

Índice de Figuras

Figura 1. Resultados de la prueba de ELISA realizada a 427 animales adultos productores de leche de 10 diferentes municipios del Estado de Puebla.	35
Figura 2. Porcentaje de animales seropositivos a MAP por sistemas de producción en el Estado de Puebla.	37
Figura 3. Porcentaje de hatos infectados de los diferentes municipios con respecto a los productores que permitieron el muestreo a sus animales.	38
Figura 4. Presencia de diarreas en los diferentes hatos encuestados.	43
Figura 5. Presencia de animales deshidratados en los diferentes hatos encuestados.	44
Figura 6. Número de productores que establecen si las crías están en contacto con el ganado adulto o con su materia fecal.	45
Figura 7. Comportamiento de la condición corporal de los animales y su relación con la producción.	46
Figura 8. Prácticas de manejo relacionadas con la actividad y los patrones de comportamiento asociados a MAP.	47
Figura 9. Prácticas de manejo relacionadas con la actividad y los patrones de comportamiento asociados a MAP.	49
Figura 10. Práctica de limpieza por parte de los productores de los bebederos dentro de sus sistemas de producción.	49
Figura 11. Prácticas de manejo relacionadas con la actividad y los patrones de comportamiento asociados a MAP.	50
Figura 12. Prácticas de manejo relacionadas con la actividad y los patrones de comportamiento asociados a MAP.	51
Figura 13. Prácticas de manejo relacionadas con la actividad y los patrones de comportamiento asociados a MAP.	52

Resumen

La paratuberculosis se produce en los primeros años de vida, y muchos animales infectados se convierten en portadores crónicos. A menos que sean diagnosticados y eliminados o segregados de la explotación, la paratuberculosis puede existir en un hato sin ser detectada durante años. En México se cuenta con información que indica que esta enfermedad es de alta relevancia, Además, la paratuberculosis provoca pérdidas en la producción de los animales infectados de forma asintomática. El objetivo de esta investigación es determinar de la seroprevalencia y factores de riesgo de paratuberculosis bovina (MAP) en ganado lechero. El estudio se llevara a cabo en la región de San Gregorio Atzompa, Palmar de Bravo, Tehuacán, Tecamachalco, Tochtepec, Cañada Morelos, Libres y Cuyoaco, con un promedio de 66 productores con 427 muestra por región, en el Estado de Puebla, muestreo serológico al azar con prueba de ELISA, y encuesta epidemiológica, para el análisis de resultados se utilizó un modelo bivariado para determinar asociación del diagnóstico de Paratuberculosis, ya las que no presentaron distribución normal se utilizó Kruskal Wallis, se observó una prevalencia del 64.2%, de las 29 variables analizadas solo DESHI (animales deshidratados) y CONTACTO (becerros en contacto animales adultos) fueron significativas ($P>0.05$). La paratuberculosis es una enfermedad que causa grandes pérdidas económicas en la ganadería, por lo que, se requieren de pruebas diagnósticas sensibles y específicas para lograr la detección y posterior eliminación de los casos clínicos y subclínicos de los hatos, para que, de esta manera se reduzca la exposición de los animales jóvenes que son los más susceptibles a infectarse con MAP.

Palabras clave: prevalencia, paratuberculosis, factores de riesgo, ganado lechero.

Abstract

Paratuberculosis is produced in the first years of life, and many infected animals become chronic carriers. Unless they are diagnosed and removed or detached from the exploitation, paratuberculosis can exist in a herd undetected for years. In Mexico it has information indicating that this disease is of high relevance, moreover, paratuberculosis causes losses in the production of animals infected asymptotically. The objective of this research is to determine the seroprevalence and risk factors of bovine paratuberculosis (MAP) in dairy cattle. The study will take place in the region of San Gregorio Atzompa, Palmar de Bravo, Tehuacan, Tecamachalco, Tochtepec, Cañada Morelos, free and Cuyoaco, with an average of 66 producers with 427 shows by region, in the State of Puebla, sampling serological randomly test ELISA, and epidemiological survey, the analysis of results with a bivariate model was used to determine Association of Paratuberculosis diagnosis, because that did not show normal distribution Kruskal Wallis, was used There was a prevalence of the 64.2%, of the 29 variables analyzed only DESHI (dehydrated animals) and contact (calves in contact animals adult) were significant ($P > 0.05$). Paratuberculosis is a disease that causes great economic losses in livestock, so will require sensitive and specific diagnostic tests for the detection and subsequent elimination of clinical and subclinical herds cases, so that, in this way reduce the exposure of young animals that are most susceptible to infection with MAP.

Keywords: prevalence, risk factors, earned dairy, paratuberculosis.

I. INTRODUCCIÓN

La paratuberculosis, también conocida como enfermedad de Johne es una infección bacteriana del tracto intestinal, crónico y contagioso, que afecta principalmente a ovinos, bovinos esencialmente ganado lechero, caprinos y otras especies de rumiantes. También se ha señalado la enfermedad en caballos, cerdos, ciervos, alpacas, llamas, conejos, armiños, zorros y comadreja. (Driemeier *et al.*, 1999). El mismo autor menciona que la paratuberculosis se caracteriza por una emaciación progresiva del animal y una diarrea cada vez más grave. El agente causal es una bacteria denominada *Mycobacterium avium subesp. Paratuberculosis* (MAP), descrita por primera vez hace más de 100 años en Alemania. La paratuberculosis es una enfermedad inscrita en la lista del Código Sanitario para los Animales Terrestres de la Organización Mundial de Sanidad Animal de la OIE (2011). La paratuberculosis puede ser una zoonosis, si el humano consume alimentos contaminados, principalmente la leche, se ha detectado ocasionalmente el agente causal de la enfermedad de John (MAP) en algunos pacientes con la enfermedad de Crohn. Esta es una afección inflamatoria intestinal de los humanos, crónica y dolorosa, con diarreas, que se asemeja a la enfermedad de Johne (OIE, 2011). La enfermedad presenta una fase subclínica inaparente que puede prolongarse por años. Los animales generalmente se infectan a una edad temprana, principalmente en los primeros 35 días de vida, manifestándose los signos clínicos en la etapa productiva. Sin embargo, en crías provenientes de madres infectadas o de un ecosistema muy contaminado, puede observarse sintomatología entre los 12 y 18 meses de edad (Coromoto *et al.*, 2006; Zapata *et al.*, 2010).

I.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La paratuberculosis se produce en los primeros años de vida, y muchos animales infectados se convierten en portadores crónicos. A menos que sean diagnosticados y eliminados o segregados de la explotación, la paratuberculosis puede existir en un hato sin ser detectada durante años. Sólo algunos portadores

desarrollan la enfermedad de forma visible, por lo general después de varios años y los síntomas pueden confundirse con el de otras enfermedades. Además, la paratuberculosis provoca pérdidas en la producción de los animales infectados de forma asintomática. Se calcula que los portadores asintomáticos producen 15 - 16% menos de leche, con pérdidas aproximadas de 590 a 1270 kg de leche por lactancia. No existe un tratamiento eficaz. Solo la implementación de medidas para el control o erradicación del organismo, la prevalencia de la infección gradualmente aumenta en el hato y se enferman clínicamente mayor cantidad de animales.

I.2 JUSTIFICACIÓN

En México se cuenta con información que indica que esta enfermedad es de alta relevancia, ya que conjuntamente con la tuberculosis bovina, la brucelosis y la infestación por garrapatas del género *Boophilus*, contribuye al decremento en la producción e inocuidad de alimentos. En un estudio realizado en 2005, sobre el impacto económico de la MAP en bovinos lecheros del centro del país, se calculó que este ascendía a \$10,345.00 pesos por vaca al año, con una prevalencia del 8.87% en una población de casi 30,000 bovinos, donde el mayor impacto se asoció a la pérdida en la producción láctea (CONASA, 2010). Pero en el Estado de Puebla no se han reportado en los últimos años trabajos encaminados a conocer la presencia de MAP.

II. HIPÓTESIS

Ho. Ausencia de anticuerpos contra paratuberculosis bovina en el ganado lechero en el estado de Puebla.

Ha. Presencia de anticuerpos contra paratuberculosis bovina en el ganado lechero en el estado de Puebla.

III. OBJETIVOS

III.1 Objetivos específicos.

Determinar de la seroprevalencia y factores de riesgo de paratuberculosis bovina (MAP) en ganado lechero del Estado de Puebla.

III.2 Objetivos particulares

Realizar el diagnostico serológico de paratuberculosis bovina (MAP) en el ganado lechero en el Estado de Puebla a través de la prueba de Elisa.

Identificar los factores de riesgo asociados a la presencia de MAP en los hatos lecheros mediante la aplicación de encuestas epidemiológicas a los propietarios o encargados.

IV. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4. La enfermedad

La paratuberculosis fue primero descrita en Alemania en 1895 por Johne y Frothingham. Ellos demostraron la presencia de bacilos acidorresistentes en animales infectados y se pensó que la enfermedad fue una forma atípica de tuberculosis. Twort aisló el organismo causal en 1910 y lo llamó *Mycobacterium enteriditis chronicae pseudotuberculosis bovis johne*. La enfermedad más tarde se conoció como paratuberculosis o enfermedad de Johne (JD) y el agente causal *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*. El nombre de *Mycobacterium johnei* ha sido también usado en el pasado (Report, 2000).

4.1. Características generales

La paratuberculosis es una enfermedad bacteriana producida por MAP, que afecta a rumiantes, principalmente bovinos, ovinos, caprinos y otras especies de rumiantes produciendo una enteritis crónica e incurable, que termina irremediablemente con la muerte del animal (Forshell, 2001; Munjal *et al.*, 2004).

MAP es un importante patógeno animal ampliamente diseminado en el ambiente que también ha sido asociado con la enfermedad de Crohn en humanos. Tres genotipos de MAP fueron reconocidos, pero las diferencias genómicas no han sido descritas completamente (Castellanos *et al.*, 2009).

MAP es más resistente a la pasteurización que *M. tuberculosis* y ha sido identificado en suministros de leche pasteurizada y evidentemente no será destruido en leche por pasteurización a 65°C por 30 minutos o a 72°C en 15 segundos. La característica de esta micobacteria para resistir a la destrucción del medio ambiente (puede sobrevivir nueve meses o más fuera del animal) hacen la prevención y el control más difícil. (Report, 2000).

4.3. Excreción de MAP en animales infectados y transmisión

MAP es excretado en heces pero también puede ser encontrado en el calostro y leche de vacas asintomáticas, a su vez, sirviéndose de una fuente adicional de infección. También ha sido discutida la transmisión vía semen, por transferencia de embriones, y de rumiantes salvajes como reservorios (Khol *et al.*, 2010). Existe también la transmisión intrauterina descrita en venados por Whittington y Windsor (2009), en la que se mencionó que los fetos provenientes de hembras positivas al ELISA, estaban infectados de MAP resultando positivos al cultivo fecal.

El largo periodo de incubación de la enfermedad permite la excreción de la micobacteria en heces de animales por arriba de los 18 meses antes de los signos clínicos aparentes, pero la excreción es particularmente alta (arriba de 5×10^{12} micobacterias por día) durante la expresión clínica de la infección (Report, 2000).

En rebaños con prevalencias más elevadas, los animales comienzan a excretar MAP en promedio desde muy corta edad. En rebaños con una prevalencia <0.05 , $0.05-0.1$, $0.1-0.2$ y ≥ 0.2 , la proporción de animales a principio de excreción fecal es antes de los 2 años de edad. Por lo tanto, una considerable proporción de animales de corta edad están excretando MAP, especialmente en rebaños con alta prevalencia. Por consiguiente, los animales jóvenes infectados deberían ser la mayor preocupación en el control de la paratuberculosis. (Weber *et al.*, 2010).

La infección puede ser transmitida por cualquier contacto directo o indirecto de animales infectados con susceptibles. La transmisión ocurre principalmente por la ruta oral-fecal. Los bacilos son ingeridos comúnmente en grandes números cuando los animales jóvenes se amamantan de tetas contaminadas con heces de animales infectados. Estas heces pueden contaminar pasturas, comida y agua (Report, 2000). Se cree que la fuente más importante entre MAP y su transmisión al rebaño es el comercio entre rebaños infectados, por lo tanto una estrategia que los propietarios del rebaño pueden usar para minimizar el riesgo de introducir la

infección es solo comprando hembras de remplazo de hatos que estén exentos (o que tienen una prevalencia baja) de infección. (Carpenter *et al.*, 2004).

Naugle *et al.* (2004) Realizaron un cuestionario que consistió en características generales del hato respecto a JD, como prácticas de manejo; cambios que ocurrieron en los 5 años pasados referentes a prácticas de manejo recomendadas para el control; el conocimiento de la enfermedad por parte del productor; el estado de la infección del hato percibida por el productor; y la historia de muestreos en el hato. El cuestionario fue enviado por correo a 810 productores de ganado lechero de Ohio en septiembre del 2002; 266 cuestionarios fueron regresados (32.8% respondidos) por lo que un riesgo importante de esta enfermedad es el bajo interés de los productores.

Según Berghaus *et al.* (2005), el control de la paratuberculosis es una cuestión por la resistencia del agente causal hacia el ambiente, el largo periodo latente, y la incapacidad de los métodos diagnósticos para detectar animales infectados durante etapas tempranas de la enfermedad.

4.4. Etapas de la infección según la excreción de MAP

La infección con MAP en ganado puede ser categorizada en cuatro etapas: 1).- el ganado está infectado aunque no hay signos clínicos observados y MAP no puede ser detectado en heces, 2).- MAP puede ser detectado en heces, aunque los signos clínicos de la enfermedad no son evidentes, el ganado puede permanecer en estas etapas sin desarrollar la enfermedad clínica o puede progresar a la etapa clínica, típicamente después de al menos 2 años de infección. La excreción fecal de MAP puede ser intermitente y su detección en cultivo fecal es imperfecta, especialmente cuando algunos microorganismos son excretados en las heces, 3).- en el ganado se observan signos clínicos con pérdida de peso y diarrea, a veces avanza al 4).- con signos de enfermedad clínica incluyendo letargo, emaciación, y diarrea profusa. El desarrollo de los signos clínicos generalmente se diferencia entre animales (Raizman *et al.*, 2009).

Las vacas lecheras, comparadas con el ganado de carne, parecen tener una prevalencia más alta de la enfermedad, presumiblemente porque al incrementar su densidad en la vivienda, se contribuye a un nivel más alto de exposición al agente causal dentro de hatos infectados (Berghaus *et al.*, 2005).

4.5. Factores de riesgo del animal

Los factores de riesgo incluyen sistemas de producción intensiva, bajo consumo de alimento, estrés relacionado a transporte, lactación y parto, principalmente. El contacto estrecho de animales susceptibles con heces contaminadas es una influencia importante y puede aumentar los reportes de una prevalencia más alta en ganado lechero que en ganado de carne (Report, 2000).

El periodo de periparto es acompañado por supresión de algunos parámetros de la función inmunológica. La inmunosupresión asociada con el periodo de periparto puede afectar la habilidad de las vacas para resistir nuevas infecciones que pueden ocurrir en este tiempo. Varios factores pueden influenciar el grado de inmunosupresión al parto, incluyendo cambios en nutrición, elevación en niveles de cortisol y fluctuaciones de hormonas reproductivas. Factores de estrés metabólico como desbalance energético negativo, proteína y calcio asociado con el parto y el principio de la lactación puede jugar un papel importante en la pérdida de la función de las células inmunológicas observadas alrededor del parto, aunque estos efectos no han sido claramente definidos (Harp *et al.*, 2004).

En un estudio experimental realizado en venados rojos, fueron infectados con 4 dosis orales de 10^{-9} unidades formadoras de colonias de MAP de origen bovino. Los animales destetados desarrollaron paratuberculosis clínica y fueron sacrificados por eutanasia 20-28 semanas post-infección. Los casos subclínicos ocurrieron en animales adultos. Todos los animales destetados afectados clínicamente desarrollaron un severo engrosamiento intestinal y lesiones histopatológicas típicamente de paratuberculosis. Al sacrificio se observaron

lesiones como hipertrofia en el nódulo linfoide del yeyuno en casi el 50% de los animales destetados, y en animales de un año de edad, solo el 1% tuvo lesiones; finalmente ningún adulto tuvo lesiones. MAP fue cultivado de muestras de intestino y/o nódulos linfoides del 94% de animales destetados, de todos los animales de un año de edad y del 90% de ciervas adultas al sacrificio. El 76% de animales destetados, 78% de animales de un año y 15% de las venadas adultas fueron positivas a anticuerpos. Hay una relación fuertemente relacionada a la resistencia a la enfermedad clínica y subclínica pero no hacia la infección de MAP, después de la fuerte infección oral. El conocimiento de la susceptibilidad relativa de diferentes grupos de edades puede asistir en el manejo y control de paratuberculosis en granjas de venados. (Mackintosh *et al.*, 2010).

En un estudio practicado en dos grupos Merino de lana fina con alta prevalencia de la enfermedad durante la infección de MAP, los ovinos adultos fueron clasificados por sus signos clínicos, patológicos, al cultivo fecal, pruebas de inmunidad humoral (AGID) e inmunidad mediada por células (prueba de dermorreacción). Se buscaron correlaciones con el fenotipo por polimorfismo en los genes seleccionados de las funciones inmunes. Fue detectada una posible asociación entre los alelos particulares de la proteína de los macrófagos asociada a resistencia natural y el complejo mayor de histocompatibilidad con respecto a la susceptibilidad o resistencia a JD. Si los resultados de este estudio preliminar son confirmados en más trabajo, el uso de carneros con genotipos resistentes puede asistir en el control de JD (Reddacliff *et al.*, 2005).

La inmunidad del huésped juega un rol muy importante, por ejemplo, en los bovinos, los animales seropositivos al virus de la diarrea viral bovina sin previa vacunación, se pueden relacionar con una seroprevalencia más alta a MAP, en cambio los animales que fueron vacunados se les asoció a una seroprevalencia menor (Tiwari *et al.*, 2006).

4.6 Etapa subclínica

La infección es a través de las heces contaminadas, mediante la invasión de los bacilos hacia la mucosa, comprobándose la lesión granulomatosa en el intestino delgado, colon y recto (Bernardelli, 2000). Aunque las lesiones intestinales se desarrollan durante el periodo subclínico de infección, hay pocos signos externos de enfermedad. Los nódulos linfáticos reducen drásticamente los sitios de infección de MAP frecuentemente exhibiendo hiperplasia con un número elevado de células *T* e infiltración de macrófagos (Coussens *et al.*, 2004).

La paratuberculosis causa una hipersensibilidad tipo IV mediada por células, que no requiere la participación de anticuerpos, que resulta en daño tisular. Incluidas en estas reacciones se encuentran las respuestas celulares inflamatorias de tipo retardado y los efectos citotóxicos mediados por células (Trigo, 2002).

Los monocitos bovinos exhiben una actividad más grande para fagocitar MAP (un porcentaje más alto de células infectadas y más bacilos por célula infectada) que la línea celular de macrófagos bovinos. Después de la ingestión, el número de MAP viables dentro de monocitos aumenta durante los primeros 4 días y después declina entre el día 4 al 8 después de la infección. En contraste, la línea celular de macrófagos no es permisiva para la multiplicación bacilar. El número de bacilos visibles microscópicamente aumenta con el tiempo en monocitos pero no en los macrófagos. Esta observación sugiere que la replicación y la inactivación de bacilos pueden ocurrir en los monocitos. Las diferentes habilidades de monocitos bovinos y la línea celular de macrófagos para ingerir y frenar el crecimiento intracelular de MAP proveen contrastar un sistema de modelos para investigar como MAP entra y persiste dentro de su nicho preferido, el fagocito mononuclear (Woo *et al.*, 2006).

En estudios previos, se creía que el ATP secretado por los monocitos infectados con MAP serían citotóxicos para los monocitos bovinos y mataría a los bacilos intracelulares. Sin embargo se observó que la eliminación del ATP

extracelular mediante la adición de apirasa (enzima que actúa sobre el ATP) incrementó la viabilidad de los monocitos infectados. Aunque la apirasa también disminuyó la supervivencia intracelular de MAP. En contraste, la adición a corto plazo de ATP al medio de cultivo aumenta el número de MAP viables en los monocitos infectados. Estos datos sugieren que la liberación de ATP a partir de monocitos bovinos infectados aumenta, en vez de disminuir, la supervivencia intracelular de MAP (Woo *et al.*, 2009).

4.7. Etapa clínica

La vía principal del proceso inmunitario es la inmunidad mediada por células con la intervención de macrófagos y liberación de los mediadores químicos llamados citoquinas, estos producirán atrofia muscular, emaciación, alopecia, disturbios renales y leucopenia. Estos signos ocurren en las primeras etapas de la enfermedad; con el transcurso del tiempo, deberá coexistir con la inmunidad humoral, liberando inmunoglobulinas (IgG) y consecuentemente produciendo edema y algunos procesos diarreicos (Bernardelli, 2000; Coussens *et al.*, 2004).

El síndrome de mala absorción es causado por la proliferación de MAP por infiltración de tipo mononuclear. Como consecuencia de ello se producen pérdidas de proteínas, debido a la enteritis, observándose una marcada disminución del peso del animal enfermo (Bernardelli, 2000).

Las características claves de la inmunidad del hospedero ante la infección de MAP incluyen una adecuada y temprana respuesta proinflamatoria y citotóxica que eventualmente da paso a una respuesta predominante basada en anticuerpos. Los síntomas de la enfermedad clínica frecuentemente aparecen subsecuentemente al decrecer de la respuesta proinflamatoria y citotóxica. La forma en la que se producen anticuerpos es la constante exposición del antígeno presentado por macrófagos infectados hacia células inmunológicas. (Coussens *et al.*, 2004).

El dogma actual es que, en estados tempranos de la enfermedad la respuesta mediada por células predomina, considerando que en el estado clínico de la enfermedad la respuesta humoral prevalece, posiblemente señalando el cambio en la reactividad inmunológica relacionada al progreso de la enfermedad. Se han desarrollado los isotipos específicos de las inmunoglobulinas M (IgM), IgA, e Ig1 e Ig2 de MAP para el ELISA. La respuesta serológica de las vacas con diferentes etapas de paratuberculosis fue usada para evaluar el cambio en las respuestas inmunológicas. En la etapa clínica, las respuestas de la proteína purificada derivada de paratuberculosis (PPDP) e IgG1 se incrementan comparadas con aquellas de la etapa asintomática. Así, el patrón clásico es encontrado solo para antígenos PPDP y el isotipo IgG1. Para otros antígenos e isotipos y el total de niveles de IgG, el patrón respuesta es diferente e indica que no hay asociación uniforme con el incremento en las respuestas de anticuerpos durante el progreso de la etapa asintomática a la clínica en la paratuberculosis bovina (Koets *et al.*, 2001).

La susceptibilidad a la infección se produce en los rumiantes jóvenes de menos de 30 días, observándose la sintomatología clínica en animales de 2 a 5 años de edad, pudiéndose agravar el proceso por la mala nutrición, deficiencias minerales, parto, estrés, parasitosis, etc (Bernardelli, 2000).

No todos los animales infectados experimentan pérdida de peso, por el lento desarrollo de la infección de MAP. Solo los animales que son incapaces de controlar la infección se espera que reduzcan de peso como consecuencia de la infección de MAP. La pérdida de control se asocia con ocurrencia de anticuerpos mediados por reacciones inmunológicas, las cuales indican el progreso de la infección. Sin embargo, los niveles de anticuerpos, pueden fluctuar en leche y suero en la fase transicional entre control y pérdida de control. Ha sido demostrado que los animales con fluctuación de niveles de anticuerpos tienen un alto rendimiento en leche, se considera que, animales con una persistente

ocurrencia de anticuerpos pueden experimentar reducción en el rendimiento de la leche (Kudahl *et al.*, 2009).

4.9. EPIDEMIOLOGÍA

4.9.1. Factores de riesgo del agente etiológico

El estudio de la localización e inmunogenicidad de los miembros de la proteína polimórfica familiar PPE que es única para las micobacterias ha sido ligada a virulencia de *Mycobacterium tuberculosis*. La presencia de proteínas PPE en la pared celular ha sido investigada por exposición de proteínas de superficie de MAP viables hacia el sustrato enzimático. El suero de animales naturalmente infectados se analiza para detectar la presencia de anticuerpos específicos contra la proteína recombinante PPE. Dos proteínas PPE, Map3420c, y Map1506 fueron detectadas en masa y confirmadas por estar expuestas en la superficie de MAP viables por inmunohistoquímica. El suero de animales infectados naturalmente contiene anticuerpos contra Map3420c. Estos hallazgos mostraron la expresión *in vitro* de dos proteínas PPE. Adicionalmente la exposición de la superficie e inmunohistogenicidad de las proteínas PPE de MAP fue demostrada (Newton *et al.*, 2009).

Por otra parte, se han identificado y caracterizado 3 antígenos secretados por MAP de 9, 15 y 34 kDa (Map2609, Map2942c y Map0210c, respectivamente) por expresión genómica con un suero de vacas clínicamente infectadas de manera natural. Los antígenos de 9, 15 y 34 kDa que exhiben una homología muy grande a los antígenos de *Mycobacterium tuberculosis*, además estos antígenos mostraron ser reconocidos por anticuerpos de ganado bovino infectado, cuando se muestreó un número limitado de sueros de ganado infectado clínica y subclínicamente (Willemsen *et al.*, 2006).

4.9.2. Factores de riesgo del ambiente

Ha sido reconocida una asociación entre alta prevalencia de la infección de MAP en rumiantes y el tipo de suelo. Sin embargo, algunos reportes estuvieron basados en información anecdota sin inclusión del control de los rebaños y carecieron de estimación cuantitativa del riesgo. La paratuberculosis en borregos y cabras en España fue asociada con el tipo de suelo. Aunque la razón para la asociación no es clara, los autores de este estudio sugirieron que una combinación de bajo pH en el suelo y la carencia de nutrientes en el suelo pueden ser responsables. Una asociación entre paratuberculosis, bajo pH en el suelo y contenido de hierro en el suelo fue encontrada en hatos lecheros en Michigan. Éste fue el primer reporte en el que las características especiales del suelo fueron significativamente asociados a paratuberculosis. Los suelos con estas características tuvieron más probabilidad de estar dentro del grupo de seroprevalencia más grande que la media. La supervivencia de MAP puede aumentar en suelos con contenido arenoso. Estos resultados pueden ser utilizados para modificar los programas de control de la paratuberculosis. (Ward y Pérez, 2004).

4.9.3. Excreción de MAP en animales infectados y transmisión

MAP es excretado en heces pero también puede ser encontrado en el calostro y leche de vacas asintomáticas, a su vez, sirviéndose de una fuente adicional de infección. También ha sido discutida la transmisión vía semen, por transferencia de embriones, y de rumiantes salvajes como reservorios (Khol *et al.*, 2010). Existe también la transmisión intrauterina descrita en venados por Whittington y Windsor (2009), en la que se mencionó que los fetos provenientes de hembras positivas al ELISA, estaban infectados de MAP resultando positivos al cultivo fecal.

El largo periodo de incubación de la enfermedad permite la excreción de la micobacteria en heces de animales por arriba de los 18 meses antes de los signos clínicos aparentes, pero la excreción es particularmente alta (arriba de 5×10^{12} micobacterias por día) durante la expresión clínica de la infección (Report, 2000).

En rebaños con prevalencias más elevadas, los animales comienzan a excretar MAP en promedio desde muy corta edad. En rebaños con una prevalencia <0.05 , $0.05-0.1$, $0.1-0.2$ y ≥ 0.2 , la proporción de animales a principio de excreción fecal es antes de los 2 años de edad. Por lo tanto, una considerable proporción de animales de corta edad están excretando MAP, especialmente en rebaños con alta prevalencia. Por consiguiente, los animales jóvenes infectados deberían ser la mayor preocupación en el control de la paratuberculosis (Weber *et al.*, 2010).

La infección puede ser transmitida por cualquier contacto directo o indirecto de animales infectados con susceptibles. La transmisión ocurre principalmente por la ruta oral-fecal. Los bacilos son ingeridos comúnmente en grandes números cuando los animales jóvenes se amamantan de tetas contaminadas con heces de animales infectados. Estas heces pueden contaminar pasturas, comida y agua (Report, 2000). Se cree que la fuente más importante entre MAP y su transmisión al rebaño es el comercio entre rebaños infectados, por lo tanto una estrategia que los propietarios del rebaño pueden usar para minimizar el riesgo de introducir la infección es solo comprando hembras de remplazo de hatos que estén exentos (o que tienen una prevalencia baja) de infección (Carpenter *et al.*, 2004).

Naugle *et al.* (2004) Realizaron un cuestionario que consistió en características generales del hato respecto a JD, como prácticas de manejo; cambios que ocurrieron en los 5 años pasados referentes a prácticas de manejo recomendadas para el control; el conocimiento de la enfermedad por parte del productor; el estado de la infección del hato percibida por el productor; y la historia de muestreos en el hato. El cuestionario fue enviado por correo a 810 productores de ganado lechero de Ohio en septiembre del 2002; 266 cuestionarios fueron regresados (32.8% respondidos) por lo que un riesgo importante de esta enfermedad es el bajo interés de los productores.

Según Berghaus *et al.* (2005), el control de la paratuberculosis es una cuestión por la resistencia del agente causal hacia el ambiente, el largo periodo latente, y la incapacidad de los métodos diagnósticos para detectar animales infectados durante etapas tempranas de la enfermedad.

4.10. IMPACTO ECONÓMICO

4.10.1 Las pérdidas económicas debidas a la paratuberculosis

Esta enfermedad es endémica en los Estados Unidos, con al menos 22% de los hatos lecheros clasificados como positivos a JD. Las pérdidas en deshechos, producción y reproducción causados por JD son significantes. Las pérdidas económicas potenciales atribuibles a esta enfermedad son substanciales (Strickland, 2005).

Es una enfermedad con considerables consecuencias económicas; la pérdida del ganado lechero con paratuberculosis es alrededor de 100 dólares por vaca en hatos moderadamente infectados, levantándose por arriba de los 200 dólares por vaca en hatos altamente infectados. Estas pérdidas principalmente se deben a la disminución en la producción de leche y aumento en los costos por reemplazo. Un estudio estimó los costos en términos de reducción de la productividad por solo 200 a 250 millones de dólares por año, que debieran considerarse subestimados debido al total de los costos durante el transcurso de esta enfermedad. Las principales causas de desecho, como mastitis e infertilidad, fueron significativamente más altas en vacas infectadas con MAP que en animales no infectados. En la producción de leche, fue observada una disminución del 16% en vacas lecheras afectadas clínicamente entre lactación actual y lactación anterior (Report, 2000).

El desecho a tiempo apropiado permite el reemplazo de un animal por otro con una producción potencial más alta. En contraste, el desecho temprano puede también eliminar animales de los hatos antes que alcancen su producción potencial, resultando en conjunto en una pérdida económica. Los partos mejoran

la producción de leche por la iniciación de una nueva lactación, por un periodo de meses. Las crías provenientes de los partos son para la venta o reemplazos. (Smith *et al.*, 2010).

Los animales con JD pueden ser desechados al principio de los signos clínicos, tanto por la diarrea como por el desaprovechamiento del alimento. Los animales también pueden ser desechados por la decreciente producción de leche, lo que está asociado con la progresión de la enfermedad. Los programas de control estructurados, frecuentemente recomiendan el desecho inmediato de estos animales con alta excreción para evitar la contaminación del ambiente y la transmisión de MAP hacia los demás animales del hato, particularmente becerros. Los animales desechados han mostrado ser una herramienta potencialmente efectiva para reducir la prevalencia, pero aumentando el desecho de animales no se espera eliminar la infección de MAP en un hato lechero. En general, una combinación de técnicas de diagnóstico imperfectas y el lento desarrollo de los signos clínicos frecuentemente resulta en un retardo en el desecho o retención de animales con baja excreción por la ausencia de signos clínicos en estos animales y el alto costo de la crianza o compra de reemplazos (Smith *et al.*, 2010).

Se piensa que la enfermedad clínica puede causar un balance negativo en energía y proteína, lo que disminuye la fertilidad en vacas lecheras. Sin embargo, no todos los estudios han encontrado una asociación entre JD y variables reproductivas. Un estudio prospectivo encontró que los animales positivos al ELISA tienen significativamente alto número de días abiertos. Diversos estudios más antiguos encontraron que las vacas infectadas con MAP fueron desechadas más jóvenes, frecuentemente por infertilidad reportada por el dueño o los intervalos entre partos más largos que en las vacas no infectadas (Smith *et al.*, 2010).

Las vacas con cultivo fecal positivo, que continúan su lactación actual producen 276 dólares menos en el ingreso de la leche que las vacas que fueron

negativas al cultivo fecal. Las vacas con cultivo fecal positivo son 3 veces más probables a ser desechadas que las vacas negativas al cultivo fecal (Raizman *et al.*, 2009).

El efecto de la infección con MAP repercute sobre el peso y el valor a la matanza en animales de desecho. Comparado con vacas no afectadas presumiblemente con al menos dos pruebas de ELISA que fuera negativa, el peso a la matanza y el valor se reducen del 10 al 17%, respectivamente, que en vacas con ELISA positivo a la matanza. Si las vacas son también positivas al cultivo fecal, el peso a la matanza y el valor se reduce del 15 y 31% respectivamente. El peso a la matanza y el valor se reducen en 20 y en 31% adicional, respectivamente, en casos presencia de enteritis o edema. Por consiguiente, la suma de las pérdidas de peso es arriba del 31% y las pérdidas del valor a la matanza pasan del 48%. Las vacas con cultivo fecal negativo tuvieron resultados reducidos a la matanza solo si fueron positivos al ELISA en 2 pruebas. Por consiguiente, las pérdidas del peso a la matanza y del valor son causados por MAP (Kudahl *et al.*, 2009).

Existe una pérdida total de 155 dólares por lactación para vacas con cultivo fecal positivo que no son desechadas del ható comparado con las vacas del ható con cultivo fecal negativo. Entre vacas desechadas, la pérdida de la vacas con cultivo fecal positivo fue de 50 dólares menos para la edad al desecho y de 120 dólares para la reducción del valor de la carne en total fue una pérdida de 441 dólares por vacas desechadas con cultivo fecal positivo comparadas con las vacas desechadas con cultivo fecal negativo. Las pérdidas como resultado de una baja lactación y desecho temprano de los animales pueden alarmar a los productores y motivarlos a implementar las medidas apropiadas de control de la enfermedad (Raizman *et al.*, 2009).

4.11. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la paratuberculosis es basado en la detección del microorganismo o de la respuesta inmune. El cultivo bacteriano de muestras fecales de cabras y ovejas es un método que demora más tiempo (Munjaj *et al.*, 2004).

La paratuberculosis puede ser diagnosticada por detección de anticuerpos séricos (pruebas serológicas), por identificación de la bacteria (cultivos bacteriológicos) y por pruebas de ADN. Una prueba serológica comúnmente utilizada para detectar paratuberculosis subclínica es el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). La habilidad del ELISA para detectar animales infectados es baja (baja sensibilidad), pero su habilidad para detectar animales no infectados es alta (alta especificidad). No obstante se suele utilizar el ELISA solo o en combinación con el cultivo fecal. Es la técnica de diagnóstico frecuentemente más usada para identificar paratuberculosis subclínica en hatos de ganado. Para mejorar la efectividad del ELISA como una herramienta para los programas de prevención y control de la paratuberculosis es importante identificar factores que puedan estar asociados o influenciados con los resultados del ELISA (Elzo *et al.*, 2006).

4.11.1. Pruebas de dermorreacción

También se puede utilizar la prueba de dermorreacción (inmunidad mediada por células). En venados, se ha realizado la prueba cervical comparativa para el diagnóstico de JD usando 25,000 UI de tuberculina aviar y 50,000 UI/ml de tuberculina bovina. La interpretación (lectura) se basa en el incremento en el grosor de piel que llega a medir hasta 7.8 mm en el sitio de aplicación de la tuberculina aviar y hasta 2.2 mm en el sitio de aplicación de la tuberculina bovina (Mackintosh *et al.*, 2010).

4.11.2. Pruebas serológicas

El uso de pruebas serológicas en el diagnóstico de paratuberculosis se considera que tiene un valor limitado. La principal razón es que la seroconversión

ocurre relativamente tarde en el curso de la infección. Entre los ensayos de anticuerpos disponibles se encuentran: la prueba de fijación del complemento (CFT), agar gel inmunodifusión (AGID) y el ELISA. Éstos tienen un poder discriminatorio similar para la detección de ovinos con paratuberculosis clínica, considerando que la AGID y el ELISA parecen ser más sensibles en identificar ovinos infectados subclínicamente que la CFT. La detección de una respuesta inmunitaria mediada por células origina una producción detectable de anticuerpos en ovinos y bovinos infectados experimentalmente con MAP. El ensayo de interferón gamma mide la respuesta inmunitaria mediada por células y ha sido evaluado para el diagnóstico de paratuberculosis en bovinos y ovinos. Los resultados indicaron que esta prueba puede ser una importante herramienta para la detección de ovinos subclínicamente infectados con MAP (Gwozdz *et al.*, 2000). El ensayo de interferón gamma detecta experimentalmente más ovejas infectadas y más temprano que cualquiera de las pruebas serológicas. La superioridad del ensayo de interferón gamma en detectar ovejas infectadas en una pequeña población experimental garantiza su evaluación más rápida en una población más grande de ovejas naturalmente expuestas a MAP. Sin embargo, ninguno de los ensayos de anticuerpos es capaz de detectar a todas las ovejas histológicamente confirmadas con infección de MAP (Gwozdz *et al.*, 2000).

En programas de control para MAP, el estado de infección en un rebaño es frecuentemente calculado en el hato con un ELISA al que le falta sensibilidad y especificidad pero que es rápida y barata. En el estado de Nueva York ha sido utilizado el ELISA no amortiguado modelo cinético (KELA) (mide la intensidad y velocidad de la reacción) para el control de MAP. Se determinó la sensibilidad y especificidad relativa del KELA para detección de excreción fecal de MAP de una población de vacas lecheras tomando en cuenta posibles errores como diferentes cantidades de antígenos y prevalencia de MAP en un hato. El KELA no puede distinguir entre los animales que no excretan MAP y animales con baja excreción (\leq a 30 unidades formadoras de colonias) y así el valor predictivo del KELA para detectar animales que excretan MAP en heces van de moderados a elevados (\geq

30 UFC). Los valores erróneos del KELA disminuyen para hatos con aumento en la prevalencia de MAP dentro del hato. Para el mejor valor predictivo positivo de un KELA para excreción fecal moderada a alta, los valores erróneos serían determinados basándose en la prevalencia aparente en cada hato (Schaik *et al.*, 2005).

4.11.3. Kit comercial de ELISA

Los kits comerciales de ELISAs utilizados en Estados Unidos, frecuentemente reportados son Herdchek©, IDEXX Laboratories, Westbrook ME , Parachek™ , Biocor Animal Health, Omaha Nebraska, actualmente por Pfizer Animal Health; SVANOVIR™ ELISA, Svanova Biotech, Uppsala, Sweden son utilizados para detectar anticuerpos contra MAP. Las pruebas se realizan conforme a las instrucciones del fabricante (Newton *et al.*, 2009).

Los dos primeros fueron ampliamente autorizados para su uso en Norte América, el tercero fue autorizado para su uso en Europa. A pesar del hecho de que son comercializados como herramientas de diagnóstico a nivel de grandes rebaños, también son utilizados en pequeños rebaños. Generalmente, hay una asociación escasa entre los tres ELISAs. Sin embargo, cuando los resultados son comparados con animales con cultivo positivo en tejidos de ganado, los ELISAs tienen una mejor asociación. Sin embargo, la proporción de pruebas positivas es significativamente diferente entre los tres ELISAs. La asociación más mínima entre los tres ELISAs es tan clara como el hecho de que estas pruebas son de baja sensibilidad. La implicación es más grande cuando las pruebas son usadas a nivel individual para la toma de decisiones, que no es el método recomendado en las etiquetas del producto. Individualmente, si el resultado obtenido de un ELISA es positivo, usando un diferente ELISA en un animal pre-clínico, tiene una probabilidad alta de dar un resultado diferente debido al bajo valor predictivo positivo de los resultados de la prueba (McKenna *et al.*, 2006).

El suero debía ser colectado anualmente, pero a veces en intervalos más grandes, de todos los animales de 2 años o más, en rebaños partícipes y propuestos por un laboratorio participante en el Programa. En el laboratorio, las muestras son analizadas utilizando un ELISA. Para cada placa de ELISA (Paracheck, CSL, Parkville), la densidad óptica de los pozos es corregida por sustracción del valor igual a 0.1 más el promedio de la DO de dos pozos controles negativos. Cuando la DO corregida es mayor a 0, es registrado como un resultado positivo, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Jubb, 2005).

Se reporta que las muestras de suero que se evaluaban por la técnica de ELISA, se observó un 50% de sensibilidad y 99% de especificidad. En el kit de prueba para anticuerpos contra MAP; de laboratorios IDEXX, de Westbrook se espera identificar el 50% de animales infectados con MAP, y 99% de animales no infectados. Por lo tanto, si 20 de 100 animales estuviera infectado en un hato con MAP, entonces se esperaría que: 10 identificaran (50%) Correctamente como infectados y 79 (99%) como no infectados, y 10 (50%) Incorrectamente identificadas de los animales infectados como no infectados y uno (1%) de los animales no infectados como infectado (Elzo *et al.*, 2006).

La base del éxito en la realización de la técnica de diagnóstico se encuentra en la calidad del antígeno, la calidad del conjugado y la calidad de los sueros testigos positivos y negativos a utilizar, independientemente de la certeza, confiabilidad y repetitividad de los resultados en los que intervienen el técnico y equipo utilizado (Martin *et al.*, 1987; Saunders *et al.*, 1977; Sweeney *et al.*, 1995).

4.11.4. Efectos de la condición climática estacional en el diagnóstico de paratuberculosis

Strickland *et al.* (2005) no encontraron evidencia significativa para relacionar la temperatura estacional con el aumento en el riesgo de obtener un cultivo fecal positivo a MAP. Ninguno de los efectos estacionales fue significativo

en cualquiera de los valores obtenidos mediante ELISA en la proporción de vacas seropositivas a MAP.

4.11.5. Relación entre excreción de MAP y resultados del ELISA

Un estudio indicó que la sensibilidad de la clasificación del programa voluntario para el estatus de JD en el hato fue de 33 a 84%; considerando la sensibilidad del ELISA y el tamaño del hato, si fue usado con confirmación de cultivo fecal, el rango fue de 70 al 93%. En adición, se predijo que sin cultivo fecal la especificidad para calcular la prevalencia del hato disminuiría 11% (Carpenter *et al.*, 2004).

La sensibilidad del ELISA para la detección de anticuerpos séricos a MAP en vacas ha sido evaluada extensivamente. Aunque hay suposición acerca de los valores estimados y la prueba de referencia apropiada, la evidencia indica que la sensibilidad del ELISA es altamente dependiente de la infección de MAP (Carpenter *et al.*, 2004).

Considerando las etapas propuestas por Raizman *et al.* (2009), las podemos reducir en tres:

- Etapa I pre-clínica no excreta la bacteria en heces
- Etapa II pre-clínica excreta la bacteria en heces
- Etapa III clínica excreta la bacteria en heces

Los rangos estiman de 15% (etapa I) a 85% (etapa 3). En la etapa II la sensibilidad esta positivamente correlacionada con el número de MAP excretado en heces. En adición, la sensibilidad del ELISA puede disminuir con el paso del tiempo debido a un cambio en el espectro de la enfermedad causado por el desecho de animales con alta excreción fecal. Finalmente la sensibilidad del ELISA también depende de los valores de corte designados para la interpretación de los resultados de cada prueba, pues hay variantes del ELISA por los diferentes laboratorios que la fabrican. La sensibilidad de solo un cultivo fecal en la etapa II de la infección, se considera por algunos autores, más grande que el ELISA; sin

embargo la sensibilidad es dependiente en ambos del número de MAP excretado en heces y el método de cultivo utilizado. La estimación de la sensibilidad de solo un cultivo fecal por métodos convencionales va de un rango de 30 a 50% (Carpenter *et al.*, 2004).

El beneficio de las pruebas al introducir rebaño, usando el ELISA solo o en combinación con cultivo fecal fue es mínimo si los animales fueron comprados en un lugar de conocimiento de baja prevalencia en los rebaños. El valor de la prueba por ELISA solo o en combinación con cultivo fecal es más grande en rebaños con alta prevalencia para todos los tamaños del rebaño (Carpenter *et al.*, 2004).

Las muestras fecales pueden ser cultivadas usando medio Herrold con yema de huevo y micobactina J y antibióticos. La sensibilidad del ELISA en suero y leche relativo a cultivo fecal es aproximadamente 74.3% y 60%, respectivamente. Los valores correspondientes para la especificidad del ELISA (98.6–99.3%) se basan en el porcentaje de cabras no infectadas de MAP en suero y leche. Las proporciones de resultados positivos para suero y las pruebas fecales son significativamente diferentes, mientras que las proporciones de resultados positivos para leche y las pruebas fecales no son significativamente diferentes. La leche en el ELISA tuvo un nivel moderado de acuerdo con resultados cultivo fecal. El ELISA en pruebas de leche de cabras puede ser una alternativa eficiente en base a costos, preciso para cultivo fecal (Salgado *et al.*, 2007). Durante la etapa activa de infección y antes del principio de enfermedad clínica, el ganado generalmente desarrolla anticuerpos contra MAP pero puede existir reacción cruzada entre anticuerpos contra otras micobacterias. Esta reacción cruzada de anticuerpos puede ser eliminada por absorción de la prueba con antígenos de *Mycobacterium phlei* antes del comienzo del ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (Milner *et al.*, 1990).

En la incubación de la muestra diluida en el pozo tapizado de antígeno, el anticuerpo específico para MAP forma un complejo con los antígenos. Después

del lavado de los pozos para retirar la materia flotante, se agrega peroxidasa conjugada de rábano (HRPO) que unida a inmunoglobulinas compromete al antígeno de fase sólida. En el paso final de la prueba, el conjugado sobrenadante es lavado y retirado, y el sustrato es añadido en los pozos. La tasa de conversión del sustrato es proporcional a un total de inmunoglobulinas unidas. El subsiguiente color, medido espectrofotométricamente, es proporcional a un total de anticuerpos presentes en la prueba experimental (OIE, 2004).

4.11.6. Técnica de Ziehl Neelsen

Se utiliza la tinción de Ziehl Neelsen para el diagnóstico de enfermedades que cursen con infecciones micobacterianas. Esta técnica tiene la finalidad de detectar el bacilo de la paratuberculosis en muestras de heces a partir de colorantes que tienen afinidad hacia la pared celular del bacilo, utilizando el equipo de colorantes que consta de tres reactivos: Fucsina Fenicada (Kinyoun), Alcohol Ácido Orth, y Azul de Metileno Loeffler (Lynch *et al.*, 1978).

4.11.7. Cultivo bacteriano.

La bacteria se puede cultivar de las heces, las áreas engrosadas de la pared intestinal y los ganglios linfáticos ileales, mesentéricos e ileocecales. Los medios adecuados incluyen el de yema de huevo Herrold, modificado de Dubos y los medios Middlebrook 7H9, 7H10 y 7H11; la micobactina es necesaria para el crecimiento bacteriano. MAP crece lentamente; las colonias pueden demorar 5 a 14 semanas en aparecer. Sobre el medio de Herrold, las colonias inicialmente son muy pequeñas, incoloras, semiesféricas y translúcidas, con márgenes redondos parejos y una superficie lisa y brillante. Con el tiempo, las colonias se vuelven más grandes, más opacas, ásperas y mamiladas. Se informa que las cepas de ovejas son lisas, uniformes y mayormente pigmentadas. El resultado del cultivo se relaciona con el resultado del ELISA (Smith *et al.*, 2010).

MAP puede ser cultivado de varias partes de intestino delgado y grueso, bazo, nódulos linfáticos, epidídimo y de glándulas vesiculares. Los resultados en algunos estudios demuestran una completa distribución extraintestinal de la bacteria y que los sementales deberían ser considerados una fuente importante de infección de paratuberculosis durante su estrecho contacto con otros sementales, vacas y novillos a través del proceso natural de apareamiento (Khol *et al.*, 2010).

Por otra parte, se muestrearon hatos lecheros neerlandeses (Francia) que habían cerrado por al menos tres años sin historia de paratuberculosis en un estudio con medio sólido para la certificación del hato. De 90 hatos estudiados, eventualmente 61% se encontraron infectados con MAP. El número de hatos infectados disminuyó con cada ronda de pruebas. Asumiendo que todos los hatos infectados fueron detectados por el noveno muestreo, se calculó el porcentaje de hatos que verdaderamente no estuvieron infectados después de cada ronda de muestreo. El cultivo y las muestras fecales proveen una alta sensibilidad, alta especificidad y bajo costo de la prueba para los programas de certificación del hato (Kalis *et al.*, 2004).

El cultivo bacteriano también se puede realizar en leche, y los resultados han sido significativamente diferentes. En un estudio realizado en cabras, el cultivo fecal fue comparado con cultivo hecho a partir de leche. En el grupo de cabras con diarrea intermitente y severa, el 66% fue positivo al cultivo en leche y el 10% con un resultado negativo en el ELISA fue positivo en cultivo de leche (Dimareli-Malli, 2010).

4.11.8. Inmunohistoquímica

Esta técnica únicamente sirve de ayuda para confirmar el diagnóstico, y no puede ser utilizada en animales vivos. El objetivo de esta técnica es encontrar proteínas específicas (presentes en la pared celular de la micobacteria), dentro del tejido del huésped, frecuentemente en la porción terminal del íleon y los nódulos linfáticos mesentéricos (Newton *et al.*, 2009).

El análisis inmunohistoquímico de los tejidos, se puede llevar a cabo usando antisuero colectado de conejos inmunizados con diferentes preparaciones de MAP. Ésta ha identificado un gran porcentaje de animales infectados (rango de 57 a 93%) y tejidos positivos (rango de 28 a 46%) (Huntley *et al.*, 2005).

4.11.9. Otros métodos diagnósticos

4.11.9.1. Estudio macroscópico

La necropsia se basa en hallazgos macroscópicos en inspección de vísceras de los ovinos sacrificados, principalmente observando intestinos y nódulos linfáticos mesentéricos. La evidencia de la presencia de la enfermedad, son los signos clínicos tales como diarreas crónicas y pérdida de peso corporal y las lesiones anatomopatológicas: ileocolitis granulomatosa. Existen tres formas de la presentación de la enfermedad: tuberculoide, lepromatosa, e intermedia (Tejedor, 1997).

4.11.9.2. Examen histopatológico

Al examinar un animal mediante la necropsia se pueden tomar muestras de tejido para examen histológico. Un examen histológico positivo de JD se da cuando se encuentran organismos acidorresistentes en las lesiones granulomatosas típicas de JD (Jubb, 2005).

Las muestras de las lesiones son fijadas en formol al 10% salino para examinar las secciones teñidas con hematoxilina y eosina (HE) y Ziehl Neelsen (Z-N). Las muestras de la parte anterior, media y posterior del yeyuno y válvula ileocecal y de las porciones anterior, media y posterior de sus correspondientes nódulos linfáticos son fijadas para histopatología. La severidad de la lesión histopatológica puede ser apreciada como leve y no específica, sugiriendo

paratuberculosis leve, pero los microorganismos ácido-resistentes no son vistos con frecuencia, también hay forma leve, moderada y severa (Jubb, 2005).

En los animales con paratuberculosis hay aumento del tamaño de los nódulos linfáticos del yeyuno con lesiones granulomatosas (células gigantes y células epitelioides) y yeyuno engrosado. Las lesiones histopatológicas típicas de paratuberculosis severa, incluyen vellosidades intestinales aplastadas, y grandes áreas de lesiones granulomatosas con presencia de bacilos en yeyuno, válvula ileocecal y nódulos linfáticos asociados. Los casos subclínicos ocurren en animales mayores de un año de edad y adultos. (Mackintosh *et al.*, 2010).

4.12. CONTROL Y PREVENCIÓN

4.12.1. Control de la enfermedad

Los programas de control de paratuberculosis en América, por lo general son se forma voluntaria en el control de la JD y han sido implementados en diferentes Estados en USA desde 1999 para el control de la diseminación de JD entre y dentro de los hatos ganaderos. Como parte del programa, el ganado lechero y de carne, implementó medidas de manejo, para prevenir: (1) transmisión de la infección aproximadamente alrededor del parto, (2) contaminación del ambiente (3) introducción de ganado proveniente de hatos infectados. La base para el programa es la reducción del contacto con MAP hacia ganado joven de reemplazo y sobre la detección y desecho de animales infectados. El programa fue desarrollado basándose en la mejor información científica al tiempo disponible, y con validez de pruebas clínicas o estudios longitudinales no disponibles, para asegurar que el programa trabajaría como se planeó (Ferrouillet *et al.*, 2009).

En Minnesota, el programa voluntario inició en el 2000 para investigar si el control de la enfermedad a través de la implementación de prácticas de manejo en el hato fue efectivo en reducir la transmisión de JD. Este programa llamado “Proyecto de demostración de JD en el hato”, fue estimado mediante una evaluación de riesgo anual producido por un Estado certificado o veterinario

federal. Las vacas adultas fueron muestreadas regularmente usando un análisis serológico y cultivo fecal bacteriano para evaluar el progreso hecho a todo lo largo del programa de control. Un subcomité nacional del grupo de trabajadores de la asociación de salud animal de los Estados Unidos (USAHA) fue subsecuentemente formado para diseñar el proyecto de demostración de JD en los hatos para evaluar la efectividad y viabilidad del programa voluntario de control de JD bovina. Este proyecto fue fundado por USDA-APHIS-VS iniciado en el 2003 (Ferrouillet *et al.*, 2009).

La prevalencia en estos hatos como especialmente en hatos grandes tiene un alto riesgo de infección. En el estudio del sistema Nacional de monitoreo de la salud animal del ganado lechero se emitió una falsa estimación de la prevalencia del hato (falso negativo) probablemente porque el muestreo de 30 hembras falló al detectar la infección en hatos con baja prevalencia (Carpenter *et al.*, 2004).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Localización

El estudio se llevara a cabo en la región de San Gregorio Atzompa, Palmar de Bravo, Tehuacán, Tecamachalco, Tochtepec, Cañada Morelos, Libres y Cuyoaco, con un promedio de 66 productores con 427 muestra por región, en el Estado de Puebla.

5.2. Tipo de Estudio y Tamaño De Muestra

El tipo de estudio fué transversal polietapico y estratificado, el muestreo serológico será al azar por conglomerados monoetápico y la determinación del tamaño mínimo de muestra serealizó utilizando la fórmula de Cannon y Roe (Jamarillo y Martínez, 2010).

5.3. Criterios de Inclusión y Exclusión.

INCLUSIÓN: Se muestrearan bovinos de la raza Holsetin Friesian, hembras mayores de dos años y los machos que se estén en la explotación como sementales.

EXCLUSIÓN: Los animales menores de dos años y los machos que no son contemplados como sementales.

5.4. Muestreo Serológico.

La toma de muestra de sangre se realizará por la punción de la vena coxígea con el empleo de tubos al vacío con tapón rojo marrón sin anticoagulante. Las muestras se transportaron a 4 °C al Laboratorio de Serología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la BUAP. Donde se centrifugaran por 5 minutos a 3000/min para extraer el suero. Separando el suero en tubos cónicos de tipo Eppendorf en congelación a -20°C hasta su procesamiento serológico, que se

realizara en el laboratorio especializado de Tehuacán del Comité de fomento y salud Animal.

5.5. Técnica de laboratorio diagnostico ELISA.

Se utilizará la prueba de ELISA siguiendo el protocolo del laboratorio de diagnóstico del CEIEPAA, FMVZ, UNAM, Querétaro.

5.6. Resultados e interpretación

Subsecuentemente el color es medido espectrofotométricamente (densidad óptica, filtro de 650 nm). La densidad óptica es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos presentes en la muestra de la prueba. La ausencia o presencia de anticuerpos contra MAP es determinada por la razón de la prueba para positivo (S/P) para cada muestra;

$$S/P = \frac{DO \text{ muestra} - \bar{x} \text{ CN}}{\bar{x} \text{ CP} - \bar{x} \text{ CN}}$$

Dónde:

S= a la densidad óptica de la muestra menos la densidad óptica del promedio de los controles negativos.

P= a la densidad óptica del promedio de los controles positivos menos densidad óptica del promedio de los controles negativo.

El control positivo es estandarizado y representa un nivel significativo de anticuerpos contra MAP en el suero. Según el manual, las muestras de suero con valores S/P < 0.25 deberían ser clasificadas como negativos para anticuerpos contra MAP, y los valores S/P >0.25 deberían ser considerados positivos. Sin embargo, la razón S/P también puede ser transformada en 5 puntuaciones basadas en la clasificación de Collins:

- 1) 0= negativo, para razón S/P de 0 a 0.09; anticuerpos a MAP no detectados;
- 2) 1= sospechoso, para razón S/P de 0.10 a 0.24; bajo nivel de anticuerpos séricos contra MAP pero arriba de lo normal de los niveles anteriores;

- 3) 2= positivo bajo, para razón S/P de 0.25 a 0.39; bajo nivel de anticuerpos séricos contra MAP pero arriba del punto de corte estándar para la prueba positiva;
- 4) 3= positivo, para razón S/P de 0.4 a 0.99; nivel moderado de anticuerpos séricos contra MAP; y
- 5) 4= positivo alto, para razón S/P de 1.00 a 10.00; alto nivel de anticuerpos séricos contra MAP (Elzo *et al.* 2006).

El punto de corte del ELISA en el set tiene una alta especificidad. El punto de corte puede ser aminorado, por consiguiente potencialmente incrementa su habilidad para detectar animales infectados tempranamente en el curso de la enfermedad, sin embargo la especificidad sería eliminada. Se busca descubrir porque el bajo nivel de casos clínicos continuó ocurriendo en el programa de control y pruebas para JD en Victoria, y en particular, si se reduce el punto de corte del ELISA se podrían tener casos clínicos identificados más tempranamente (Jubb, 2005).

5.7. Variables a considerar para el modelo estadístico sobre factores de riesgo.

Estas variables de evaluaran a partir de los resultados obtenidos de las encuestas epidemiológicas aplicadas a los productores que participaron en el muestreo, las variables a evaluar para este estudio son:

1. Municipio (MUN),
2. Localidad (LOC),
3. Tipo de explotación (PRD): Ganadería familiar o Tecnificado,
4. Número de Trabajadores (NUMTR),
5. Número total de animales del hato (THATO),
6. Número de vacas en producción (VACAS),
7. Número de sementales en el hato (SEMNT),
8. Producción láctea en litros/Día⁻¹/vaca (LTS),
9. Presencias de diarreas (DIARREAS),

10. Presencia de animales emaciados (FLACOS),
11. Presencia de animales deshidratados (DESHI),
12. Detección de baja producción láctea (BPROD),
13. Contacto de los becerros con las madres (CONTACTO),
14. Aplicación de calostro (CALOSTRO),
15. Utilización de hembras nodriza (NODRIZA),
16. Tipo de alimentación al becerro (ALIM) leche materna o sustituto de leche,
17. Los animales son alimentados en el suelo (SUELO),
18. Origen del agua para los animales (AGUA), pozo o potable,
19. Frecuencia de limpieza de los comederos (COME), diario, cada tercer día, semanal,
20. Frecuencia de limpieza de bebederos (BBDERO), diario, cada tercer día, semanal,
21. Manejo de las heces (HECES),
22. Comparten instalaciones (Comparten),
23. Existe programa de reemplazos (REEM),
24. Realizan algún tipo de diagnóstico (DX),
25. Cuentan con parideros (PARID),
26. Frecuencia de limpieza de los parideros (FREECLIM),
27. Cuentan con equipo de limpieza (ELIMP),
28. Cuentan con otra especie (OESP),
29. Vacunas sus animales regularmente (VACUNA),
30. Porcentaje de presencia (POR).

5.8. Análisis Estadístico.

Las variables se sometieron a un análisis descriptivo univariado, mediante las frecuencias absolutas y relativas, medidas de tendencia central y de dispersión. Se realizará un análisis bivariado para determinar la asociación entre el diagnóstico de MAP y las diferentes variables independientes y covariables. Las variables categóricas se compararan utilizando la prueba de χ^2 , exacta de Fisher y para las variables continuas las pruebas t de Student para variables con

distribución normal, en las que no presenten distribución normal la prueba de Kruskal Wallis. Se calcularán las razones de momios (RM) y los intervalos de confianza al 95%, a fin de demostrar diferencias significativas entre los hatos infectados y los no infectados por MAP.

Se desarrollará un modelo de regresión logística para determinar la asociación entre el diagnóstico de MAP y las diferentes variables independientes y covariables, basados en aspectos de plausibilidad biológica y significancia estadística, el modelo de regresión logística con las variables que presenten una $p \leq 0.2$, se analizarán la salida de las variables que modificaban el efecto hasta obtener un modelo mediante el uso de la prueba χ^2 de la log verosimilitud, el cual se evaluará por medio de una prueba de likelihood con el uso de la pseudo R^2 , y la prueba de Hosmer y Lemeshow. Se revisarán los supuestos del modelo de regresión logística con el fin de que los procedimientos de inferencia sean válidos. Se buscará el mejor modelo que se ajuste a los datos, que tenga parsimonia, es decir, que explique el fenómeno a estudiar de la mejor manera posible.

Las variables a estudiar son: (LUC), (PRD), (NUMTR), (LTS), (DIARREA), (FLACAS), (DESHI), (BPROD), (CONTACTO), (CALOSTRO), (NODRIZA), (ALIM), (SUELO), (AGUA), (COME), (BBDERO), (HECES), (COMT), (RFEM), (PARID), (FRECLIM), (ELIMP), (OESP), (VACUNA); y la variable respuesta es POR.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

De acuerdo los resultados de la prueba de ELISA realizada a un total de 427 animales de 10 municipios de los cuales se dedican a la producción de leche fueron los siguientes: 260 animales negativos y 167 se identificaron como positivos a la prueba de ELISA P35 realizada en el laboratorio de diagnóstico del CEIEPAA, FMVZ, UNAM, Querétaro, con un promedio de 9 animales por hato y un 64.2% de presencia de MAP en los hatos muestreados, como se informó en el 2012 por Martínez *et al.*, del cual establece un inmuno-ensayo enzimático par el diagnostico de paratuberculosis en bovinos con 491 sueros, con respecto a los sueros positivos como negativos de la presente investigación fueron relacionados con los valores promedio establecidos por la técnica de Martínez *et al.*, (2012) mediante tablas de contingencia de 2x2 (figura 1) y también por Wolf *et al.*, (2015) donde establece una prevalencia del 43.5% en hatos semitecnificados y 7.5% en tecnificados.

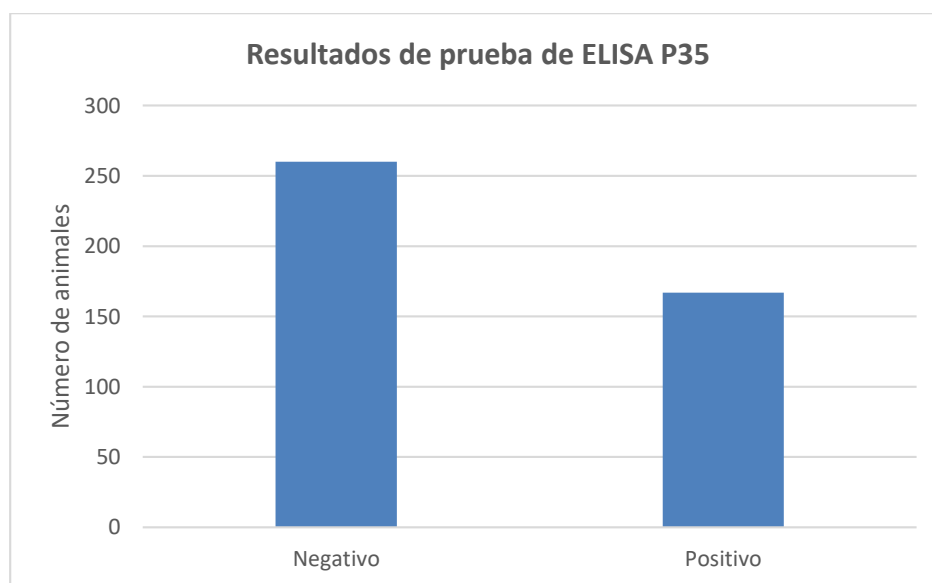


Figura 1. Resultados de la prueba de ELISA realizada a 427 animales adultos productores de leche de 10 diferentes municipios del Estado de Puebla.

Se identificó los tres sistemas de producción Tecnificado, semitecnificado y ganadería familiar, mostrando que el sistema tecnificado (49.68%) es el que mantiene mayor número de animales que presenta MAP bajo la prueba de ELISA que el sistema familiar (38.3%). La capacidad del resultado positivo o negativo de la prueba para predecir de forma precisa el estado de una animal o población con respecto a una infección, es la consideración más importante para la validación de un ensayo, por lo que se deben considerar factores que pueden influir en el resultado, en este caso al desarrollar el ELISA para determinar la presencia de anticuerpos contra MAP (Figura 2), se sabe que en ocasiones los animales negativos a ELISA pueden resultar positivos a PCR o al asilamiento bacteriológico, debido a que etapas tempranas de la infección la respuesta inmune predominante es de tipo celular, y la eliminación del bacilo en excremento comienza a darse de manera intermitente Otra razón por la cual la producción de anticuerpos se puede ver afectada es la causa de la pérdida de respuesta inmune ante la infección; esta actividad supresora es denominada anergia, y se presenta cuando los animales son viejos o la infección está en su etapa final, de manera que estos animales pueden estar excretando el bacilo y no ser detectados con las pruebas serológica (Martínez *et al.*, 2012).

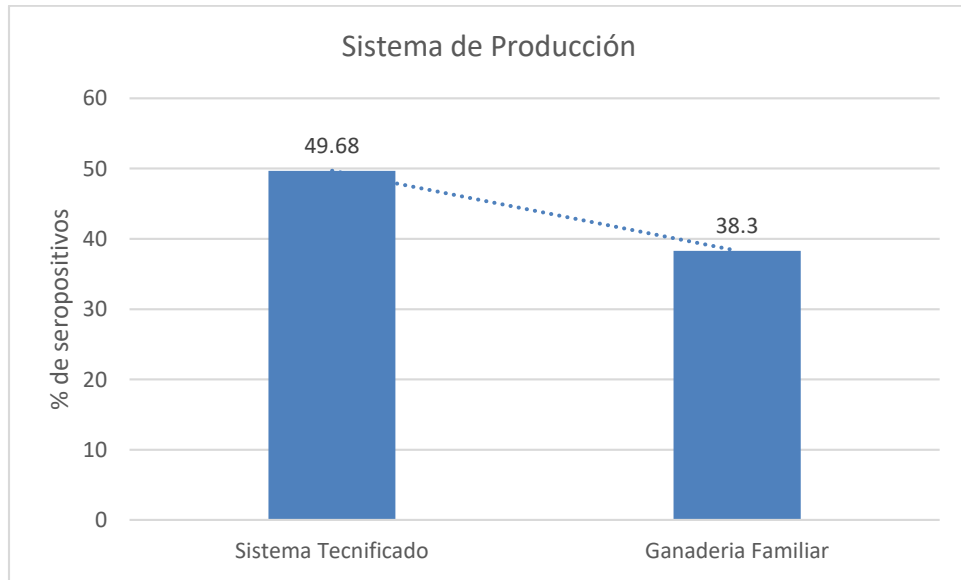


Figura 2. Porcentaje de animales seropositivos a MAP por sistemas de producción en el Estado de Puebla.

Los municipios muestreados fueron 10 de los cuales no todos los hatos muestreados presentaron la presencia de MAP, como es el ejemplo de Cuyoaco y Palmar de Bravo (0%), para los municipios con mayor porcentaje fueron Tochtepec, Cañada Morelos, san Andrés Cholula, Tehuacán, con 80.64, 92, 95, 100, respectivamente (Figura 3). Coincidentes con Martínez *et al.*, (2012) donde establece que Estudios de tipo epidemiológicos transversales realizados en ganado bovino de los Estados de Guanajuato y San Luis Potosí; indican que existe una seroprevalencia de paratuberculosis del 10.71 y 31.3% respectivamente; en el presente trabajo se incluyeron muestras de animales que procedían de los Estados de Hidalgo, Aguascalientes y Estado de México, de las cuales se obtuvieron 68 animales positivos de los 491 animales evaluados con el ELISA con antígeno protoplasmático de Map 3065, esto corresponde a una frecuencia de 13.84%, si bien este dato no proviene de un estudio con diseño epidemiológico, pone de manifiesto que la enfermedad, se encuentra ampliamente distribuida en hatos de distintos Estados del País y que se requiere el realizar estudios con los que se pueda determinar la situación real de la enfermedad, y el impacto económico que representa para la ganadería nacional.

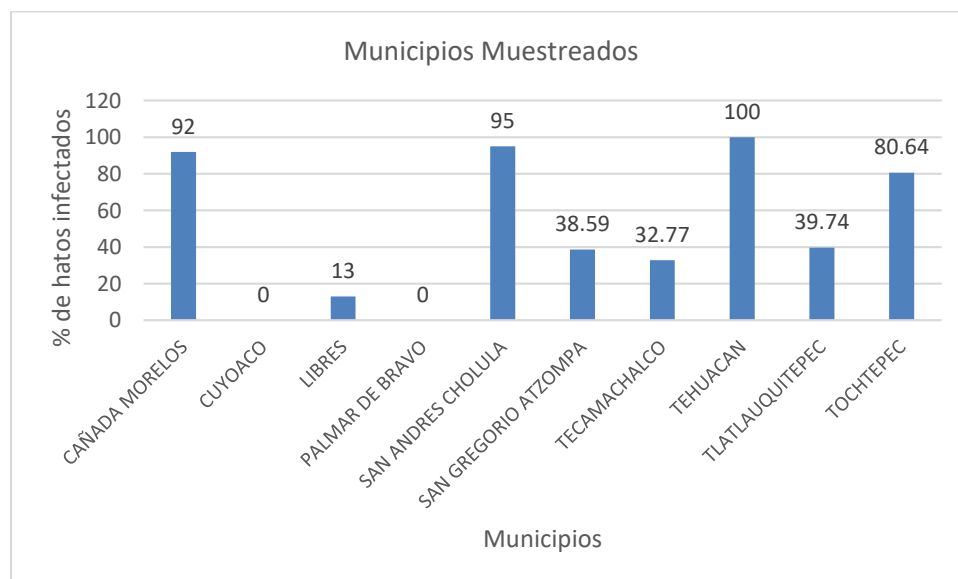


Figura 3. Porcentaje de hatos infectados de los diferentes municipios con respecto a los productores que permitieron el muestreo a sus animales.

De acuerdo con el análisis estadísticos solo se encontraron diferencias estadísticas en las variables PRD, DESHI, ALIM, COME, PARID, VACUNA ($P>0.05$) para el análisis de regresión logística, en el resto se observaron diferencias numéricas. Estos resultados son parecidos a los datos nacionales de la enfermedad en el Reino Unido aunque han sido escasos, los estudios sobre el efecto de la paratuberculosis establecen estimaciones de la prevalencia con una magnitud de pérdidas y una baja eficiencia de los sistemas de producción, esta información se ha concentrado en pequeñas regiones geográficas de este país. En cierta medida, las pérdidas asociadas con relación a la paratuberculosis están muy relacionado con el sistema de producción. Sin embargo, con la reciente introducción de un programa de control voluntario de paratuberculosis en el Reino Unido, el volumen de datos analizados ha ido en aumento y ahora es suficiente para el análisis. Es probable que estas pruebas se utilizará para identificar a los animales con paratuberculosis subclínica en lugar de animales clínicamente afectados que serían estar mostrando signos de la enfermedad (Pritchard *et al.*, 2016; Corbett *et al.*, 2017).

Con lo que respecta a la descripción del comportamiento de la variable POR se relacionó de la siguiente manera mediante la prueba de Kruskal Wallis (Tabla 1) solo se encuentra significancia las variables de DESHI y CONTACTO, los factores de riesgo relacionados con la gestión para la transmisión de Map incluyen el alojamiento en grupo de vacas parturientas con las vaca en un solo corral de parto, uso del mismo colchón entre partos de un mismo grupo, contaminación fecales de ubres de vacas parturientas, y uso de la misma cama de maternidad que no se limpian entre cada parto. Un mayor riesgo está determinado por hatos más grandes en número, donde se le considera de alta asociación, además de pasturas contaminadas con el abono de animales adultos que también se puede considerar un factor de riesgo debido a la prolongada supervivencia de Map dentro de estas mezclas. Con respecto a la bioseguridad, es un componente esencial de la prevención de enfermedades en general y es igualmente importante

en la prevención de la paratuberculosis, con la compra de animales considerados una vía importante de transmisión de Map entre las granjas (Pritchard *et al.*, 2016).

Tabla 1. Variables relacionadas a POR mediante la prueba de Kruskal Wallis

	VARIABLES	N	MEDIA	D.E.	Kruskal-Wallis/H
1	LOC	58	8.241	4.842	43.98
2	MUN	57	5.33	2.942	
3	PRD	58	1.724	1.268	4.26
4	THATO	57	38.44	66.77	
5	vacas	57	0.11	35.28	
6	LACTA	57	3.86	6.385	
7	SEMNT	57	0.2456	0.5757	
8	LTS	58	20.043	7.356	17.41
9	DIARREA	58	1.8448	0.3652	0.13
10	FLACOS	58	1.8621	0.3478	0.41
11	DESHI	58	1.9138	0.2831	0.04
12	BPROD	41	1.4634	0.5049	0.2
13	CONTACTO	56	1.7143	0.4558	0.001
14	CALOSTRO	52	1.0962	0.2977	2.94
15	NODRIZA	52	1.75	0.4372	0.54
16	ALIM	51	1.0588	0.2376	2.18
17	SUELO	56	1.9464	0.2272	0.26
18	AGUA	58	2.2069	0.487	0.22
19	COME	58	1.4483	0.6535	16.24
20	BEBEDERO	56	4.982	2.857	13.91
21	HECES	57	1.8772	0.3311	0.67
22	COMT	57	1.6491	0.4815	0.47
23	REEM	57	1.7193	0.4533	1.47
24	DX	23	1.7826	0.4217	
25	PARID	40	1.5	0.5064	0.84
26	FRECLIM	18	1.833	0.514	3.83
27	ELIMP	58	1.4655	0.5032	1.14
28	OESP	58	1.569	0.4995	0.19
29	VACUNA	57	1.5614	0.5006	0.75

Con respecto a la presencia de diarreas en los animales adultos se observó que solo 8 del total de productores encuestados informa que han tenido presencia de diarreas (Figura 4), aunque no es un indicador que numéricamente no represente severidad se puede comentar que es un alto riesgo en tener animales succínicamente diagnosticados con diarrea de origen como Map, Karsten *et al.*, (2015) encontraron que la exposición a las vacas adultas con diarrea y que alimenten con calostro a los becerros o a múltiples becerros es un factor de riesgo altamente significativo, como establecieron en un grupo de 226 vacas adultas que alimentaban becerros como nodriza se comprobó positivos a Map por ELISA, además realizaban sus compras de otros hatos por más de 20 años, todos los becerros fueron positivos, por lo tanto es de alto riesgo alimentar con calostro proveniente de animales con diarrea.

En un estudio longitudinal en 21 hatos lecheros canadienses sobre el efecto de cambiar prácticas de manejo, se identificaron factores no relacionados con la higiene que influyeron en la tasa de incidencia de Map. En otro estudio transversal en Brasil se identificó la maternidad como factor de riesgo y en un estudio de caso-control en Suiza se encontró varios factores relacionados a contaminación con estiércol de animales adultos y su manejo en la zona de parto fue asociado a la prevalencia dentro de este hato. En otro estudio en Minnesota en tres hatos lecheros proporcionaron evidencia que terneros nacidos en el corral de parto individual tenían una proporción más baja de riesgo para Map con menos resultados positivos en los años posteriores en comparación con las vacas en corrales de parto en grupo (Karsten *et al.*, 2016; Kirkeby *et al.*, 2016).

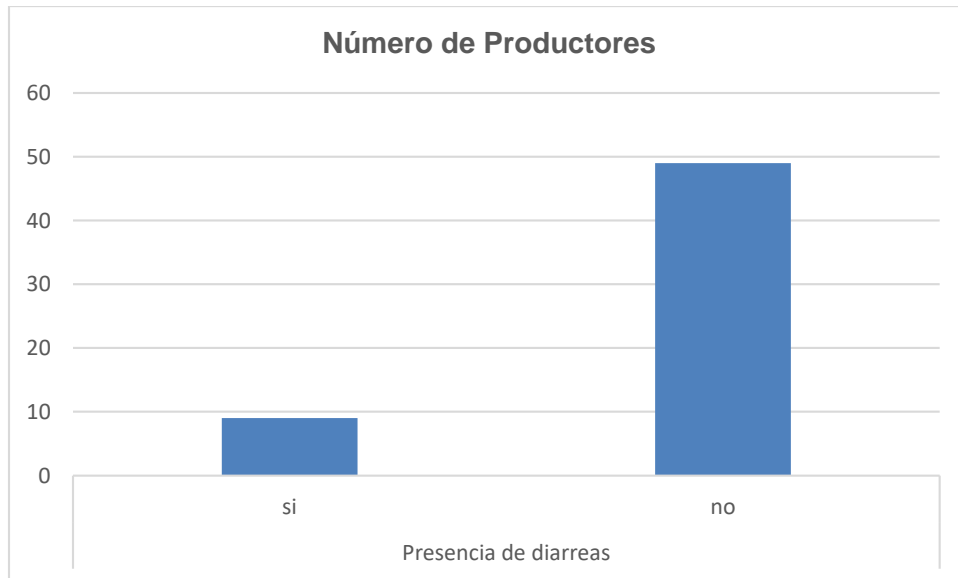


Figura 4. Presencia de diarreas en los diferentes hatos encuestados.

Aunque en los resultados muestran bajo información con respecto a la presencia de animales deshidratados producto de Map (Figura 5) se considera un factor de riesgo ya que becerros que presumiblemente están expuestos a las heces del ganado con el agente infeccioso pueden adquirirlo por ingestión de las bacterias del medio ambiente esta información es importante porque Map puede persistir en el ambiente desde los 5° C por más de 9 meses y a 15° C por lo menos 3.5 meses y en un ambiente seco, en un ambiente totalmente sombreado por hasta 55 semanas. El estiércol almacenado donde se producen lagunas, Map es viable hasta 8 semanas y el ADN después de 175 días. Transmisión del agente parece interrumpirse más eficazmente en las crías recién nacidas ya que están en contacto con cualquier materia que puede contener heces de ganado adulto, leche o calostro, polvo, agua, alimentación, u otras fuentes. Aunque estudios han mostrado evidencia de una susceptibilidad depende de la edad, con un alto riesgo de infección cuando ocurre la exposición al agente infeccioso en el nacimiento, los becerros son susceptibles a la infección más allá de los 12 meses de edad. Esto es particularmente importante si las fuentes de agua están infectadas o el ambiente está muy contaminado. Debido a las muchas maneras posibles en que becerros pueden verse expuestos a Map (Figura 6), existen numerosas

recomendaciones para disminuir el riesgo a nuevas infecciones en los haos lecheros se han publicado y resumido en muchas publicaciones, tratando de cubrir la mayoría de las rutas de infección, pero estas directrices se han convertido en asuntos muy complejos y pueden abrumar y sobrecargar los productores, estos consideran que la mayoría de los procedimientos son caros y difíciles de implementar para mantener las medidas recomendadas. Debido al largo intervalo entre la exposición al agente infeccioso y enfermedad detectable y debido a las diferentes rutas de transmisión, es difícil cuantificar la importancia de las recomendaciones relacionadas a minimizar la exposición del becerro por el agente infeccioso y parece haber una falta de conocimiento por lo tanto hay poco publicado sobre esta cuestión (Karsten *et al.*, 2015; Wolf *et al.*, 2016).

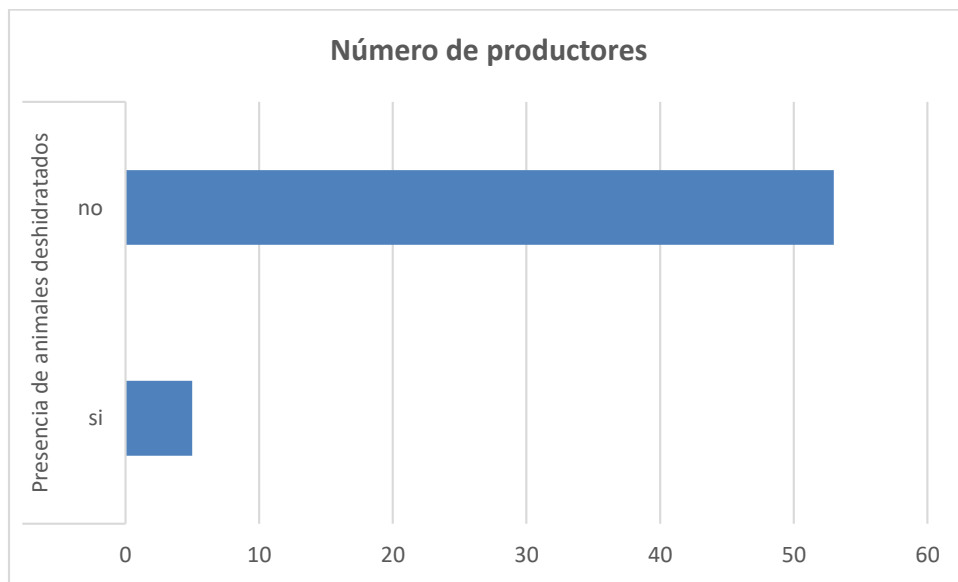


Figura 5. Presencia de animales deshidratados en los diferentes hatos encuestados.

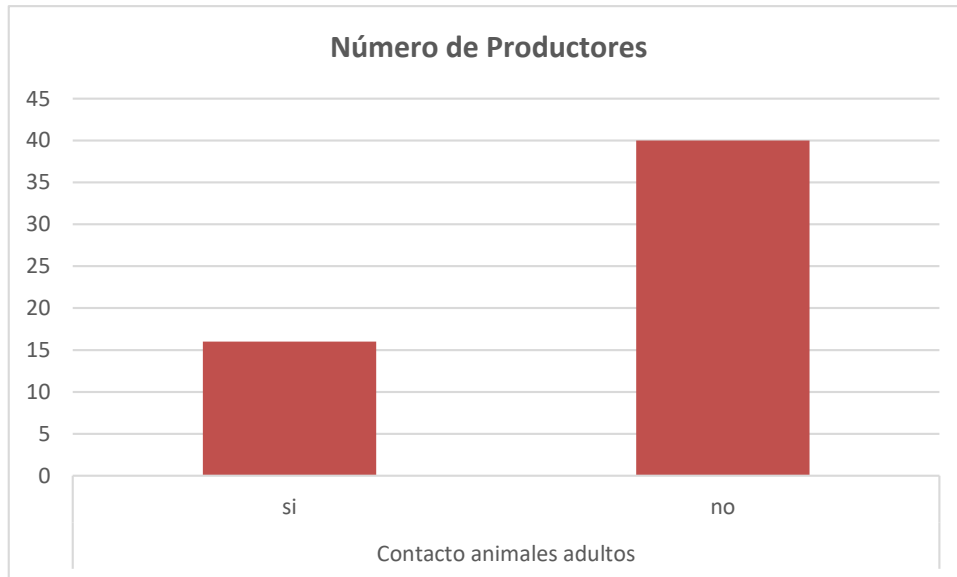


Figura 6. Número de productores que establecen si las crías están en contacto con el ganado adulto o con su materia fecal.

Con lo que respecta al comportamiento de la condición corporal de los animales se observó en la encuesta que si hay presencia de animales flacos, pero en el caso de los animales en producción si hay una reducción considerable de la producción de leche establecida por los productores (Figura 7) estos resultados sugieren que la infección subclínica de paratuberculosis está asociado a la reducción en la producción como lo comenta Pritchard *et al.*, (2016) donde establece que observaron una disminución de 103 a 485 kg (equivalente 1.4 a 5.5%) se estima de 40 a 305 días abiertos, según número de lactancia, y estas pérdidas son consistentes con otros estudios. Sin embargo, algunas estimaciones publicadas han sido inconsistentes porque los resultados están influenciados por factores como el tipo de parto, etapa de lactancia, etapa de la enfermedad, prevalencia en el hato y la elección de la prueba de diagnóstico usada. La asociación entre el estado de la prueba y la producción, varía desde un 2 a un 18% de baja en la producción teniendo animales infectados en los hatos evaluados (Whist *et al.*, 2014).

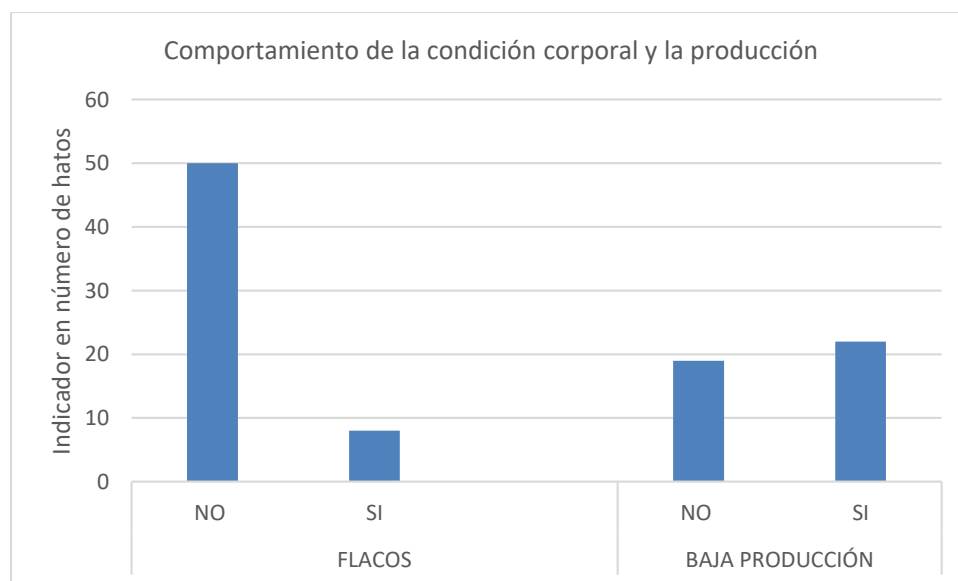


Figura 7. Comportamiento de la condición corporal de los animales y su relación con la producción.

Con lo que respecta las prácticas de la utilización de calostro, uso de nodrizas y alimentación artificial al becerro se pudo observar que solo 5 productores no lo utilizan, 12 productores si usan y 12 no utilizan, y 48 productores si alimentan y 48 no alimentan de forma artificial (Figura 8), comportamiento parecido a algunas investigaciones sobre demografía de hato y factores de riesgo asociados con la introducción y transmisión de Map donde se realizó la prueba de ELISA resultando positiva. Los factores de riesgo identificados en estos estudios incluyeron hatos grandes, importación de ganado des el extranjero, y no usaban jaulas de partos individuales, razón suficiente para establecer medidas sanitarias de emergencia en esos sistemas de producción, por estar en riesgo tanto animales como personas (Godden et al., 2015; Karsten *et al.*, 2016; Verheghe *et al.*, 2016).

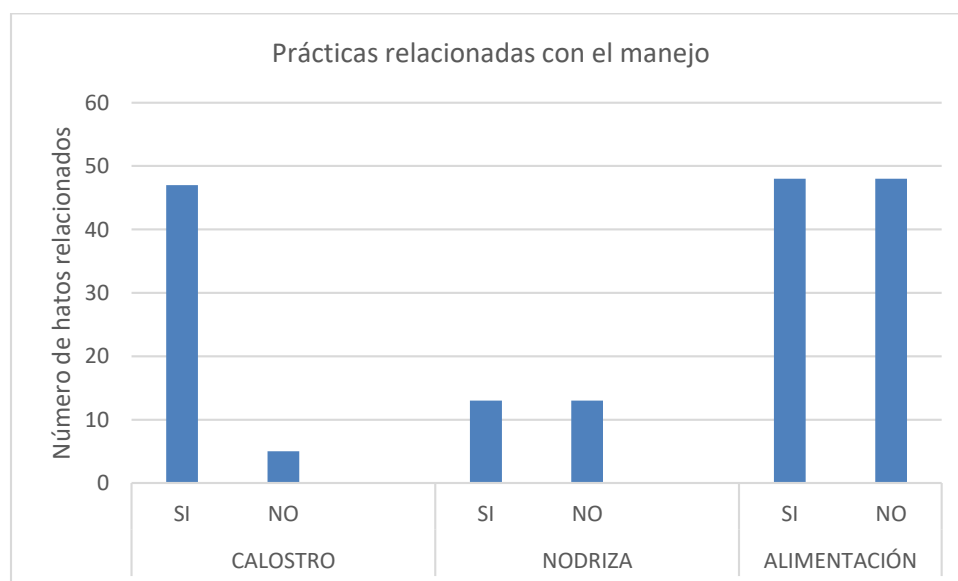


Figura 8. Prácticas de manejo relacionadas con la actividad y los patrones de comportamiento asociados a MAP.

El agua siempre ha sido un recurso valioso tanto por su importancia en la alimentación así como medio de sanitación, en la presente investigación se evaluó su utilización con respecto al origen ya que puede ser un medio también de contaminación, las observaciones al respecto fueron; los productores utilizan agua de pozo y potable, referente importante como mencionan algunos investigadores donde señalan como factores asociados a la presentación de la paratuberculosis la concentración animal, el pH del suelo, el agua, la contaminación ambiental y el desconocimiento de la enfermedad, lo que aunado al sistemas de explotación con baja densidad animal concentrados alrededor de fuentes de agua en común y en sistemas sin control sanitario explicaría las diferencias (Coromoto *et al.*, 2006).



Figura 9. Prácticas de manejo relacionadas con la actividad y los patrones de comportamiento asociados a MAP.

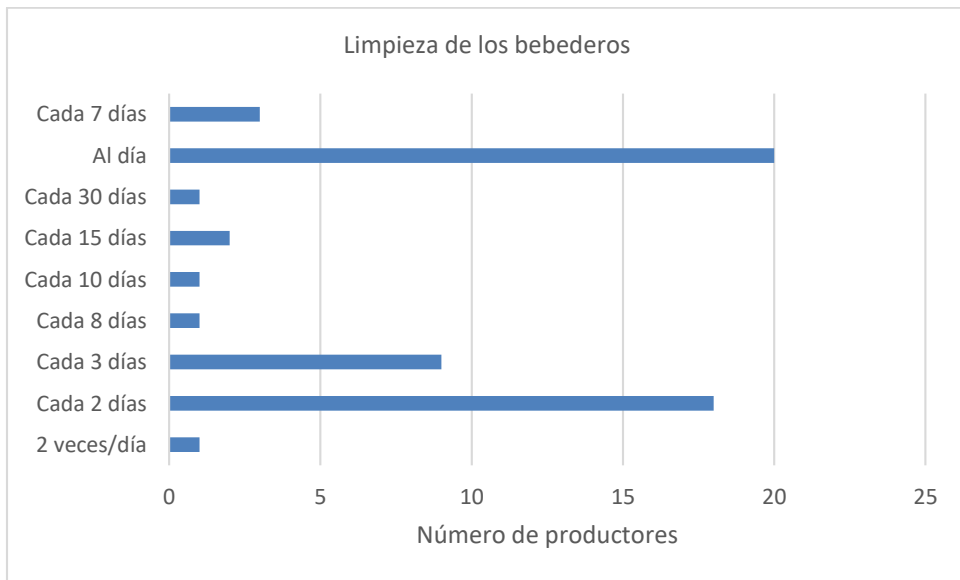


Figura 10. Práctica de limpieza por parte de los productores de los bebederos dentro de sus sistemas de producción.

Se infiere que el sistema de manejo de las explotaciones (Figuras 11 y 12), la entrada de animales sin control o la falta de aplicación de medidas de bioseguridad para minimizar la entrada de patógenos, favorecen la presencia de la enfermedad. La mayoría de los hatos se infectan a través de la compra de animales enfermos aparentemente normales; a partir de animales portadores la transmisión ocurre por la vía fecal-oral y por la ingestión accidental de materia fecal, los becerros son el grupo de mayor riesgo, otras posibles vías de infección de los becerros, lo constituye el calostro contaminado, la leche y la placenta infectada, situación a considerar cuando se diagnostica un hato positivo (Coromoto *et al.*, 2006).

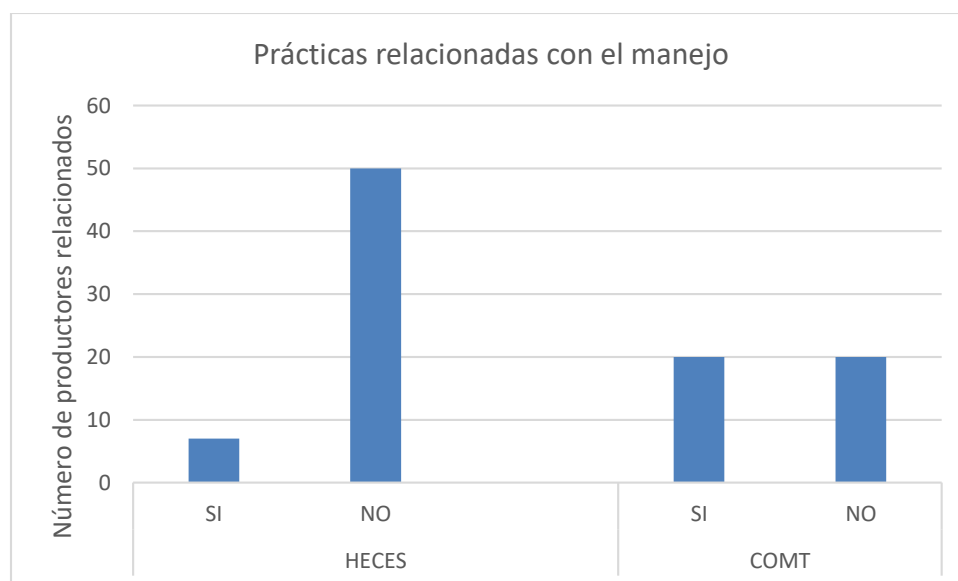


Figura 11. Prácticas de manejo relacionadas con la actividad y los patrones de comportamiento asociados a MAP.

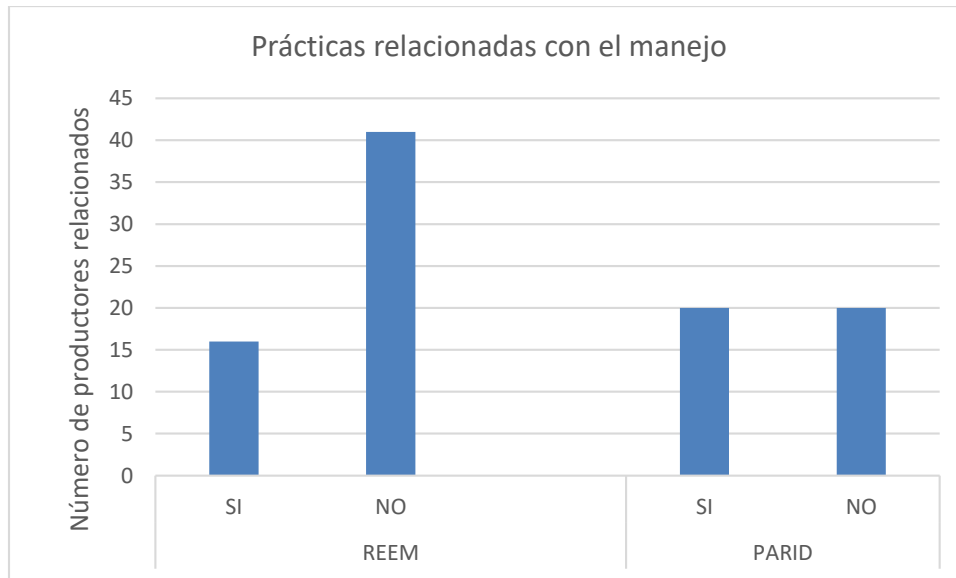


Figura 12. Prácticas de manejo relacionadas con la actividad y los patrones de comportamiento asociados a MAP.

Al observar las prácticas de manejo por parte de los productores se puede inferir que la limpieza de las instalaciones es una pieza importante (Figura 13) ya que menos de 30 productores realiza limpieza de las instalaciones donde se encuentran los becerros ya que no cuenta con equipo de limpieza específicos, en alguna investigaciones se ha demostrado que la contaminación bacteriana resultó de ordeñar el calostro en un cubo antes de transferirlos a un recipiente de estéril. Se identificó que la recolección de calostro era la etapa más propensa a la contaminación debido a una ubre sucia, máquina de ordeño o cubo sanitizado inadecuadamente. Los medios de almacenamiento y número de contenedores de almacenamiento pueden afectar calidad de calostro, y agrupación de calostro podría aumentar el riesgo de exposición a agentes patógenos. Altos conteos bacterianos pueden ser indicativos de contaminación fecal (Beaver *et al.*, 2016).

Sin embargo, en el área de parto debe estar limpio o libre de estiércol (Figura 13) ya que existe mucha sinergia entre los factores de riesgo, particularmente debido a aumento de la susceptibilidad de las crías neonatales. Se han reportado casos muy convincentes de riesgos "multifactoriales" en la

transmisión Map evaluando puntuaciones de riesgo acumulado contra la prevalencia del hato. Cuidado de becerros recién nacidos significativamente interactuó con otras categorías, incluyendo manejo de estiércol y condiciones ambientales; así, ciertas variables parecen tener una relación diferente a la prevalencia cuando se combinan como puede ser el uso de programas de vacunación y la presencia de otras especies (Beaver *et al.*, 2016, Fernández *et al.*, 2016).

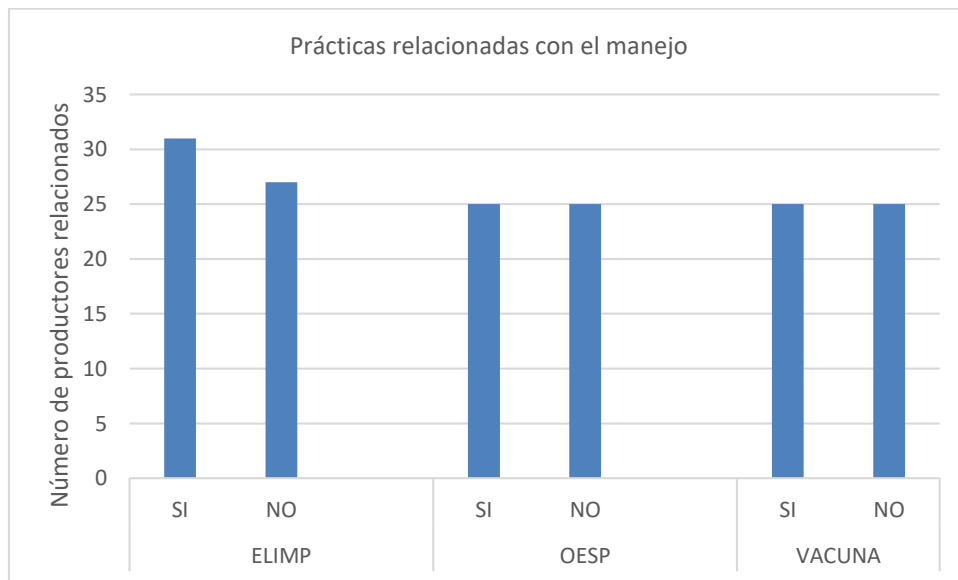


Figura 13. Prácticas de manejo relacionadas con la actividad y los patrones de comportamiento asociados a MAP.

VII. CONCLUSIONES

La paratuberculosis es una enfermedad que causa grandes pérdidas económicas en la ganadería, por lo que, se requieren de pruebas diagnósticas sensibles y específicas para lograr la detección y posterior eliminación de los casos clínicos y subclínicos de los hatos, para que, de esta manera se reduzca la exposición de los animales jóvenes que son los más susceptibles a infectarse con Map. Además de que se hace indispensable el contar con técnicas diagnósticas que sean de fácil implementación en los laboratorios, y que puedan ser utilizadas para desarrollar estudios de tipo epidemiológico sobre la enfermedad en diversas especies de animales domésticos y silvestres, para poder determinar las medidas necesarias para su control.

El presente estudio provee de evidencia que indica que el tipo de manejo utilizado en la región es un factor importante en la prevalencia de Map se necesita realizar un programa de control regionalizado que incluya los tres niveles de gobierno así como asociaciones y productores independientes para que se diseñe un control eficiente y permanente, y los actores puedan tener acceso a nuevos programas de mejora que incluya capacitación y financiamiento para implementar las adecuaciones que se requieren como es en infraestructura y recursos humanos.

VIII. BIBLIOGRAFÍA.

- Beaver A., Ruegg P.L., Gröhn Y.T., Shukent., 2016. Comparative risk assessment for new cow-level *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis infections between 3 dairy production types: Organic, conventional, and conventional-grazing systems. *J. Dairy Sci.* 99:9885–9899.
- 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. *Preventive Veterinary Medicine.* (72) 291-309. USA.
- Canon R.M., Roe R.T., 1982. *Livestock disease surveys: a field manual for veterinarians.* Bureau of animal health. Canberra, Australia.
- Carpenter, T. E.; Gardner, I. A.; Collins, M. T.; Whitlock, R. H. 2004. Effects of prevalence and testing by enzyme-linked immunosorbent assay and faecal culture on the risk of introduction *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis-infected cows into dairy herds. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.* 16 31-38.
- Castellanos, E.; Aranaz, A.; Gould, K. L.; Linedale, R.; Stevenson, K.; Alvarez, J.; Domínguez, L.; Juan, L. DE; Hinds, J.; Bull, T. J. 2009. Discovery of stable and variable differences in the *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis type I, II, and III genomes by pan-genome microarray analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 75 676-686.
- CONASA, 2009. Taller de trabajo de planeación estratégica para la atención de la paratuberculosis en bovinos, caprinos y ovinos de México, Tequisquiapán, Qro. [Consultado el 30 de noviembre de 2013]. <http://www.conasamexico.org.mx/conasatequis.pdf>
- Corbett C. S., De Buck J., Orsel K., Barkena H. W., 2017. Fecal shedding and tissue infections demonstrate transmission of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in group-housed dairy calves. *Vet Res* 48: (27) 2-10.

- Coromoto A., De Rolo M., Clavijo A. y Valle A., 2006. Caracterización de la paratuberculosis bovina en ganado doble propósito de los llanos de Monagas, Venezuela. *Zootecnia Tropical*. vol.24, n.3, pp. 321-332. ISSN 0798-7269.
- Dimareli-Malli, Zoi. 2010. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in milk from clinically affected sheep and goats. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine* 8 (1) p.44.
- Driemeier D., Farias C. C.E., Pereira G. M. J., Corbellini G. L., Loretto A. P., Moleta C. E., 1999. Aspectos clínicos e patológicos da paratuberculose em bovinos no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 19(3/4):109-115.
- Elzo, M. A.; Rae, D. O.; Lanhart, S. E.; Wasdin, J. G.; Dixon, W. P.; Jones, J. L. 2006. Factors associated with ELISA scores for paratuberculosis in an Angus-Brahman multibreed herd of beef cattle. *Journal of Animal Science* 84 41-48.
- EMM, 2005. Enciclopedia de los Municipios de México, Puebla. Instituto Nacional para el Federalismo y Desarrollo Municipal, Gobierno del Estado de Puebla.
- Fernández S. J., Ramírez V. N. F., Correa V. N. M., 2016. Factors associated with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in dairy cows from Northern Antioquia, Colombia. *Rev Colomb Cienc Pecu* 2017; 30:48-59
- Ferrouillet, C.; Wells, S. J.; Hartmann, W. L.; Godden, S. M.; Carrier, J. 2009. Decrease of Johne's disease prevalence and incidence in six Minnesota, USA, dairy cattle herds on a long-term management program. *Preventive Veterinary Medicine* 88 128-137.
- Forshell, K. P. 2001. Description of Paratuberculosis. *International Dairy Federation, Brussels, Belgium. FIL/IDF Bull* 364, 9-12.
- Godden S.M., Wells S., Donahue M., Stabel J., Oakes J.M., Sreevatsan S., Fetrow J., 2015. Effect of feeding heat-treated colostrum on risk for infection with *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis, milk production, and longevity in Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 98:5630–5641.

- Gwozdz, J. M.; Thompson, K. G.; Murray, A.; Reichel, M. P.; Manktelow, B. W.; West, D. M. 2000. Comparison of three serological tests and an interferon- γ assay for the diagnosis of paratuberculosis in experimentally infected sheep. *Australian Veterinary Journal* 78 779-783.
- Harp, J. A.; Stabel, J. R.; Pesch, B. A.; Goff, J. P. 2004. Expression of adhesion molecules on milk and blood lymphocytes from periparturient dairy cattle with Johne's disease. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 98 69-76.
- Huntley, J. F. J.; Withlock, R. H.; Bannantine, J. P.; Stabel, J. R. 2005. Comparison of diagnostic detection methods for *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in North American bison. *Veterinary Pathology*. 42 42-51.
- IDEXX, 2009. Laboratories, Inc. All rights reserved, disponible en idexx.com
- Jamarillo A. C., y Martínez M. J. J. 2010. *Epidemiología veterinaria, editorial manual moderno, primera edición, México D.F.*
- Jubb, T. F. 2005. The effect of interpreting an ELISA at a lower cut-off on detection of clinical cases of bovine Johne's disease. *Australian Veterinary Journal*, 83 305-307.
- Kalis, C. H. J.; Collins, M. T.; Barkema, H. W.; Hesselink, J. W. 2004. Certification of herds as free of *Mycobacterium paratuberculosis* infection: actual pooled faecal results versus certification model predictions. *Preventive Veterinary Medicine* 65 189-204.
- Karsten D., Schmidt M., Köhler, Sauter-Loui C., 2016. Management of the calving pen is a crucial factor for paratuberculosis control in large dairy herds. *J. Dairy Sci.* 99:3744–3752.
- Khol, J. L.; Kralik, P.; Slana, I.; Beran, B.; 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. *Journal of Veterinary Medical Science* 72 1283-1288

- Kirkeby C., Graesboll K., Saxmose N. S., Engo C. L., Toft N., Halasa., 2016. Adaptive Test Schemes for Control of Paratuberculosis in Dairy Cows. *Dairy Cows. PLoS ONE* 11(12): e0167219. doi:10.1371/journal.pone.0167219.
- Kudahl, A. B.; Nielsen, S. S. 2009. Effect of paratuberculosis on slaughter weight and slaughter value of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 92:4340-4346.
- Lynch Raphael Mellor, Spare & Inwood, 1978. *Métodos de laboratorio*, Editorial Interamericana, 2ª edición
- Mackintosh, C. G.; Clark, R. G.; Thompson, B.; Tolentino, B.; Griffin, J. F. T.; Lisle, G. W. De. 2010. Age susceptibility of red deer (*Cervus elaphus*) to paratuberculosis. *Veterinary Microbiology* 143 255-261.
- Martin, S. W.; A. H. Meek; P. Willerb. 1987. *Veterinary epidemiology: principles and methods*. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA. p. 343.
- Martínez C. A. G., Santillán F. M. A., Guzmán R. C. C., Favila H. L Del C., Córdova L. D., Díaz A. E., Hernández A. L., Blanco O. M. A., 2012. Desarrollo de un inmuno-ensayo enzimático (ELISA) para el diagnóstico de paratuberculosis en bovinos. *Rev. Mex. Cienc. Pecu.* 3(1)1-18.
- McKenna, S. L. B.; Barkema, H. W.; Keefe, G. P.; Sockett, D. C. 2006. Agreement between three ELISAs for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy cattle. *Veterinary Microbiology*. 114 285-291.
- Milner, A. R.; Mack, W. N.; Cotes J. K.; Gill, I.; Shildrick, P. 1990. The sensitivity, specificity and predictive values from a field trial of a modified ELISA for the diagnosis of Johne's Disease in cattle. *Veterinary Microbiology* 25:193-198.
- Munjal, S. K.; Boehmer, J.; Beyerbach, M.; Strutzberg-Minder, K.; Homuth, M. 2004. Evaluation of a LAM ELISA for diagnosis of *paratuberculosis* in sheep and goats. *Veterinary Microbiology* 103 107-114.

- Naugle, A. L.; Saville, W. J. A.; Shulaw, W. P.; Wittum, T. E.; Love, B. C.; Dodaro, S. J.; McPhail, I.L. 2004. Comparison of management practices between Ohio, USA dairy farms participating in wholeherd Johne's disease testing programs and those not participating. *Preventive Veterinary Medicine* 65 77-92.
- Newton, V.; Mckenna, S. L.; Buck, J. DE. 2009. Presence of PPE proteins in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates and their immunogenicity in cattle. *Veterinary Microbiology* 135 394-400.
- Newton, V.; Mckenna, S. L.; Buck, J. DE. 2009. Presence of PPE proteins in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates and their immunogenicity in cattle. *Veterinary Microbiology* 135 394-400
- NOM-031-ZOO-1995. Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*).
- OIE MANUAL, edition 2004. Paratuberculosis (Johne's Disease).
- OIE, 2011. Paratuberculosis. http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Media_Center/docs/pdf/Disease_cards/PARATUBERCULOSIS-ES.pdf (revisado 17/10/13).
- Pritchard T. C., Coffey M.P., Bond K. S., Hutchings M. R., Wall E., 2016. Phenotypic effects of subclinical paratuberculosis (Johne's disease) in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 100: 679–690.
- Raizman, E. A.; Fetrow, J. P.; Wells, S. J. 2009. Loss of income from cows shedding *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* prior to calving compared with cows not shedding the organism on two Minnesota dairy farms. *Journal of Dairy Science* 92 (10) 4929-4936.
- Reddacliff, L.A.; Beh, K.; McGregor, H.; Whittington, R.J. 2005. A preliminary study of possible genetic influences on the susceptibility of the sheep to Johne's disease. *Australian Veterinary Journal* 83 (7) 435-441.
- Report. 2000. Crohn's disease and paratuberculosis - are they linked? European Commission Scientific Committee on Animal Health And Welfare. *Irish Veterinary Journal* 53 (10) 511-514.

- Salgado, M.; Kruze, J.; Collins, M. T. 2007. Diagnosis of *paratuberculosis* by fecal culture and ELISA on milk and serum samples in two types of Chilean dairy goat herds. *Journal Diagnostic Investigation* 19:99-102
- Saunders, G. C.; Clinard, E. H.; Bartlett, M. L. 1977. Application of the indirect enzyme-labeled antibody microtest to the detection and surveillance of animal disease. *Journal Infectious Diseases*; 136:258-266.
- Schaik, G. Van; Stehman, S. M.; Jacobson, R. H.; Schukken, Y. H.; Shin, S. J.; Lein, D. H. 2005. Cow-level evaluation of a kinetics ELISA with multiple cutoff values to detect fecal shedding of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in New York State dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine* 72 (3/4) 221-236.
- Singh, S. V.; Singh, A. V.; Singh, P. K.; Sohal, J. S. 2009. Prevalence of juvenile capri-paratuberculosis and geno-typing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* recovered from postnatal kids. *Indian Journal of Animal Sciences* 79 (3) 235-238.
- Smith, R. L.; Strawderman, R. L.; Schukken, Y. H.; Wells, S. J.; Pradhan, A. K.; Espejo, L. A.; Whitlock, R. H.; Kessel, J. S. Van; Smith, J. M.; Wolfgang, D. R.; Gröhn, Y. T. 2010. Effect of Johne's disease status on reproduction and culling in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 93:3513-3524.
- Strickland, S. J.; Scott, H. M.; Libal, M. C.; Roussel, A. J., Jr.; Jordan, E. R. 2005. Effects of seasonal climatic conditions on the diagnosis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 2005 88 2432-2440.
- Sweeney, R. W.; Whitlock, R. H.; Buckley, C. L.; Spencer, P. A. 1995. Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*; 7:488-493.
- Tejedor, 1997. Estudio epidemiológico. Tesis Doctoral, Universidad Complutense, Madrid, España, pp. 25-37.

- Thursfield, M. 1995. Veterinary epidemiology. Segunda edición. Editorial Blackwell publishing. pp 50-56
- Tiwari, A.; VanLeeuwen, J. A.; Dohoo, I. R.; Keefe, G. P.; Haddad, J. P.; Tremblay, R.; Scott, H. M.; Whiting, T. 2006. Risk factors associated with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in canadian dairy herds. Proceedings of the 11th International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics. Available at www.sciquest.org.nz
- Trigo, T. F. J. 2002. Patología general veterinaria. Tercera edición. División educación continua. México, D.F. p 335
- Verheghe M., Rasschaert G., Herman L., Goossens K., Vandaele L., Bleecker D., Vlaemyck G., Heyndrickx M., De Block j., 2016. Reduction of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in colostrum: Development and validation of 2 methods, one based on curdling and one based on centrifugation. J. Dairy Sci. 100:3497–3512.
- Verheghe M., Rasschaert G., Herman L., Goossens K., Vandaele L., De Bleecker K., Vlaemyck G., Heyndrickx M., De Block J., 2016. Reduction of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in colostrum: Development and validation of 2 methods, one based on curdling and one based on centrifugation. J. Dairy Sci. 100:3497–3512.
- Ward, M. P.; and Pérez, A. M. 2004. Association between soil type and paratuberculosis in cattle herds. American Journal of Veterinary Research 65 (1) 10-14.
- Weber, M. F.; Kogut, J.; Bree, J. De; Schaik, G. Van; Nielen, M. 2010. Age at which dairy cattle become *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* faecal culture positive. Preventive Veterinary Medicine 97 (1) 29-36.
- Whist A. C., Liland K. H., Jonsson M. E., Saeb S., Sviland S., Osteras O., Norstrom M., Hopp P., 2014. Designing a risk-based surveillance program for *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in norwegian

- dairy herds using multivariate statistical process control analysis. *J. Dairy Sci.* 97:6835–6849.
- Whittington, R. J.; Windsor, P. A. 2009. In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a critical review and meta-analysis. *Australian Veterinary Journal.* 179 (1) 60-69.
- Willemsen, Pt. J.; Westerveen, J.; Dinkla, A.; Bakker, D.; Zijderveld, F. G. Van; Thole, J. E. R. 2006. Secreted antigens of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* as prominent immune targets. *Veterinary Microbiology* 114 (3/4) 337-344.
- Wolf R., Barkema H.W., De Buck J., Orsel., 2016. Dairy farms testing positive for *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* have poorer hygiene practices and are less cautious when purchasing cattle than test-negative herds. *J. Dairy Sci.* 99:4526–4536.
- Wolf R., Orsel K., De Buck J., Kanevets U., Barkema H. W., 2015. Short communication: Evaluation of sampling socks for detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* on dairy farms *J. Dairy Sci.* 99:2950–2955.
- Woo, S. R.; Barletta, R. G.; Czuprynski, C. J. 2009. ATP release by infected bovine monocytes increases the intracellular survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 32: 365-377.
- Woo, S. R.; Sotos, J.; HART, A. P.; Barletta, R. G.; Czuprynski, C. J. 2006. Bovine monocytes and a macrophage cell line differ in their ability to phagocytose and support the intracellular survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 110 109-120.
- Zapata M. M., Arroyave O. B., Ramirez R., Piedrahita C., Rodas J. D., Maldonado J. G., 2010. Identification of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* by PCR techniques and establishment of control programs for bovine *paratuberculosis* in dairy herds. *Rev Colom Cienc Pecua* vol.23, n.1 pp. 17-27.

ANEXO. Encuesta epidemiológica



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA.
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DETERMINACION DE LA SEROPREVALENCIA Y FACTORES DE RIESGO DE PARATUBERCULOSIS BOVINA (MAP) EN GANADO LECHERO EN HATOS LECHEROS DEL ESTADO DE PUEBLA

Toda la información que usted proporcione es confidencial y solamente será utilizada con fines de investigación.

I. DEL PROPIETARIO

- 1.- NOMBRE DEL DUEÑO: _____ TELEFONO: _____
2.- DOMICILIO: _____
3.- LOCALIDAD/POBLACION: _____ MUNICIPIO _____
4.- CORREO ELECTRONICO: _____

II. DEL RANCHO

- 5.- NOMBRE DEL RANCHO: _____
6.- UBICACIÓN: _____ LOCALIDAD: _____ MUNICIPIO: _____
7.- GEOREFERENCIACION: latitud: _____ longitud: _____ msnm: _____

III. VARIABLES SOCIALES

- 8.- ¿CUANTAS PERSONAS TRABAJAN EN SU EXPLOTACION?:
9.- NIVEL DE ESCOLARIDAD DEL ENCARGADO O DUEÑO:
a) Primaria b) Secundaria c) Bachiller d) Profesionista e) Otra

IV. VARIABLES PRODUCTIVAS

- 10.- TIPO DE UNIDAD DE PRODUCCIÓN: a) Tecnificado b) ganadera familiar c) Otro
11.- NUMERO TOTAL DE CABEZAS QUE COMPONEN EL HATO:
12.- NUMERO DE VACAS EN PRODUCCION:
13.- NUMERO DE LACTANTES:
14.- NUMERO DE SEMENTALES:
15.- ¿CUÁL ES EL PROMEDIO DE PRODUCCION DE LECHE/VACA/DIA?:

V. FACTORES DE RIESGO A SOCIADOS A MAP

SIGNOS

- 16.- ¿A OBSERVADO ANIMALES ADULTOS CON DIARREA PERSISTENTE? a) Si b) No
17.- ¿A OBSERVADO SI LOS ANIMALES ENFLACAN DE REPENTE? a) Si b) No
18.- ¿A OBSERVADO ANIMALES DESHIDRATOS? a) Si b) No
19.- ¿A OBSERVADO SI HA BAJADO LA PRODUCCION? a) Si b) No

ALIMENTACION.

- 20.- ¿LAS CRIAS ESTÁN EN CONTACTO CON EL GANADO ADULTO O CON SU MATERIA FECAL?
a) Si b) No
21.- ¿SUMINISTRA CALOSTRO A LOS TERNEROS? a) Si b) No
22.- ¿EL CALOSTRO PROVIENE DE NODRIZAS CONTROLADAS? a) Si b) No
23.- ¿CON QUE ALIMENTA A LOS TERNEROS? a) Leche de vaca b) Sustituto de leche
24.- ¿LOS ANIMALES SON ALIMENTADOS EN EL SUELO? a) Si b) No
25.- ¿DE DONDE PROVIENE EL AGUA QUE SE LES PROPORCIONA _____

MANEJO

- 26.- ¿CON QUE FRECUENCIA LIMPIA LOS COMEDEROS? _____
27.- ¿CON QUE FRECUENCIA LIMPIA LOS BEBEDEROS? _____

FIRMA DEL ENCUESTADO: _____

NOMBRE DEL APLICADOR: _____ FIRMA: _____

AGRADECEMOS SU DISPONIBILIDAD EN LA REALIZACION DE ESTA ENCUESTA.