



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD Y LA PRODUCCIÓN
ANIMAL**

**Determinación de la seroprevalencia y factores de riesgo
de la paratuberculosis en las regiones caprinas de Libres
y la Mixteca en el estado de Puebla.**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA:

Erika Patricia Gallaga Maldonado

Tutora Interna: Beatriz Arellano Reynoso

Tutor Externo: Marco Antonio Santillan Flores

Comité Tutoral: Efrén Díaz Aparicio



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A mi hijo Alfonso López Gallaga por ser uno de los motivos más importante en mi vida para seguirme superando. Te amo.

A mi mamá Carmen Maldonado por el apoyo cubriendo mis obligaciones de mamá durante los viajes y cuando las jornadas laborales se prolongaban.

A mi hermana Carmen y mi cuñado Gerardo, así como a mis sobrinos Luis y Dan por ser parte de mi familia y por hacerme sentir su apoyo y su cariño a pesar de la distancia.

A mis amigas y amigos

AGRADECIMIENTOS

Al comité tutorial por su apoyo a lo largo del desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Beatriz Arellano Reynoso por el apoyo para tomar las fotos de los frotis, por la ayuda para mejorar este escrito y por estar siempre dispuesta ayudarme cuando fue necesario.

Al Dr. Marco Antonio Santillan Flores jefe del laboratorio de Tuberculosis del CENID-Microbiología Inifap por las enseñanzas que me brindo para poder realizar este trabajo e impulsarme a seguir intentándolo hasta lograr realizar las técnicas diagnósticas correctamente.

Al Dr. Efrén Díaz Aparicio por exhortarme a tener confianza mi misma, por promover mi superación apoyándome para asistir a cursos y congresos, en general por todo el apoyo brindado para la realización de esta trabajo.

A Lucía Favila Humara por motivarme siempre a buscar información actualizada, por enseñarme con el ejemplo que siempre hay que seguirse superando. Gracias Lucy

A la Dra. Rosa Mendoza y al M. en C. René Morales por su invaluable apoyo para realizar los muestreos en las zonas de la Mixteca y Libres.

A los miembros del jurado por sus valiosas aportaciones realizadas para el mejoramiento de esta tesis.

A Liz por la compañía en algunas de las horas de redacción dedicadas a esta tesis, por ayudarme a hacerle correcciones de estilo.

A Sonia por ser una persona tan alegre y siempre dispuesta a ayudar.

A los compañeros del laboratorio

Al proyecto SAGARPA CONACyT 48599 “Estudio epidemiológico de enfermedades que afectan la producción caprina en México” que financió este estudio, así como al CONACyT por el apoyo con una beca durante el desarrollo de mi maestría.

ÍNDICE

	Página
1 RESUMEN.....	1
1.1 ABSTRACT.....	2
2 INTRODUCCIÓN.....	3
2.1 SITUACIÓN ACTUAL DE LA CAPRINOCULTURA EN MÉXICO.....	3
2.1.2 Sistemas de producción caprinos en México.....	3
2.1.3 Características de la producción caprina en el estado de Puebla.....	4
2.1.4 Sistemas de producción caprina en las regiones de Libres y la Mixteca.....	4
2.2 PARATUBERCULOSIS.....	4
2.2.1 Definición.....	4
2.2.2 Taxonomía.....	5
2.2.3 Etiología de la paratuberculosis.....	5
2.2.4 Epidemiología.....	6
2.2.5 Distribución y prevalencia de la paratuberculosis.....	7
2.2.6 Antecedentes de paratuberculosis a nivel mundial.....	7
2.2.7 Panorama de la paratuberculosis en el estado de Puebla.....	8
2.2.8 Hospedadores susceptibles.....	8
2.2.9 Transmisión.....	9
2.2.9.1 Entrada de MAP en el hospedador.....	9
2.2.9.2 Factores de virulencia.....	10
2.2.10 Infección prenatal.....	10
2.2.11 Infección postnatal.....	11
2.2.12 Signos clínicos.....	11
2.2.13 Lesiones.....	12
2.2.14 Diagnóstico.....	13
2.2.15 Impacto económico.....	13
2.3 POSIBLE ZONOSIS.....	14
2.3.1 Enfermedad de Crohn.....	14
2.4 FACTORES DE RIESGO.....	14
3 JUSTIFICACIÓN.....	17
4 OBJETIVOS.....	17
OBJETIVO GENERAL.....	17
OBJETIVOS PARTICULARES.....	17
5 HIPÓTESIS.....	17
6 MATERIAL Y MÉTODOS.....	18
6.1 DESCRIPCIÓN DEL LUGAR DE TRABAJO.....	18
6.1.1 Localización geográfica de las zonas muestreadas.....	18
6.2 TIPO DE ESTUDIO.....	18

6.3	TIPO DE MUESTREO.....	18
6.4	POBLACIÓN CAPRINA MUESTREADA.....	19
6.5	CÁLCULO DEL TAMAÑO DE MUESTRA POBLACIONAL.....	20
6.6	CÁLCULO DEL TAMAÑO DE MUESTRA EN CADA REBAÑO.....	20
6.7	CRITERIOS DE INCLUSIÓN DE LOS CAPRINOS MUESTREADOS.....	21
6.8	MUESTRAS COLECTADAS.....	21
6.9	PROCEDIMIENTO PARA LA COLECCIÓN DE LAS MUESTRAS.....	21
6.9.1	Sangre.....	21
6.9.2	Heces.....	21
6.9.3	Encuesta por rebaño.....	21
6.9.4	Registro de información por caprino.....	22
6.10	PROCEDIMIENTO PARA EL TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS.....	22
6.11	PRUEBAS DIAGNÓSTICAS.....	22
6.11.1	ELISA a partir de suero sanguíneo.....	22
6.11.1.1	Punto de corte del ELISA.....	23
6.11.2	Extracción de ADN de MAP a partir de heces.....	23
6.11.3	PCR anidado.....	23
6.11.4	Estudio bacteriológico.....	24
6.11.5	Tinción de Ziehl Neelsen.....	25
6.12	BASES DE DATOS.....	25
6.13	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	25
6.13.1	Seroprevalencia.....	25
6.13.2	Razón de momios.....	26
6.13.3	Determinación de los Factores de riesgo.....	26
7	RESULTADOS.....	27
7.1	DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA POBLACIONAL.....	29
7.1.1	Frecuencias de rebaños positivos.....	29
7.1.2	Factores de riesgo a nivel de rebaño.....	33
7.2	DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA A NIVEL DE CAPRINOS.....	35
7.2.1	Seroprevalencia por caprino.....	38
7.2.2	Factores de riesgo por caprino.....	41
7.3	PCR ANIDADO.....	42
7.4	ESTUDIO BACTERIOLÓGICO.....	43
8	DISCUSIÓN.....	45
9	CONCLUSIÓN.....	52
10	RECOMENDACIONES.....	53
11	ANEXOS.....	56

ANEXO 1. CUESTIONARIO DE SALUD ANIMAL EN CAPRINOS DEL ESTADO DE PUEBLA.....	54
ANEXO 2. REGISTRO INDIVIDUAL POR CAPRINO.....	58
ANEXO 3. REACTIVOS REQUERIDOS PARA EL DESARROLLO DE LA PRUEBA DEL ELISA..	59
ANEXO 4. PROTOCOLO PARA EL DESARROLLO DEL ELISA	60
ANEXO 5. REACTIVOS REQUERIDOS PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE HECES.....	62
ANEXO 6. EXTRACCIÓN A PARTIR DE HECES.....	63
ANEXO 7. PREPARACIÓN DEL MEDIO DE HERROLD CON YEMA DE HUEVO ADICIONADO CON MICOBACTINA.....	64
ANEXO 8. TINCIÓN DE ZIEHL NEELSEN.....	65
12 REFERENCIAS.....	66

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

		Página
Figura 1.	Ubicación de los municipios muestreados-----	19
Figura 2.	Frecuencia de global rebaños seropositivos a PTB -----	29
Figura 3.	Frecuencia de rebaños seropositivos a PTB en cada municipio-----	31
Figura 4.	Frecuencia rebaños seropositivos por zona-----	31
Figura 5.	Grafica del número de caprinos seropositivos clasificados de acuerdo a su origen-----	36
Figura 6.	Seroprevalencia aparente de paratuberculosis por animal-----	38
Figura 7.	Caprinos seropositivos a paratuberculosis por municipio -----	39
Figura 8	Producto de amplificación del PCR anidado a partir de extracción de ADN de heces de caprinos seropositivos-----	42
Figura 8.	Aislamientos de MAP-----	43
Figura 10.	Frotis a partir de heces en el que se aprecian BAAR-----	44
Cuadro 1.	Distribución de los rebaños por zonas de estudio, incluyendo número de animales muestreados por edad-----	27
Cuadro 2.	Frecuencia de prácticas de manejo en los rebaños caprinos de las zonas de Libres y la Mixteca poblana-----	28
Cuadro 3.	Frecuencia de caprinos seropositivos a PTB y su distribución en rebaños dentro de los 19 municipios muestreados del estado de Puebla -----	30
Cuadro 4.	Frecuencia de rebaños seropositivos a PTB y RM (razón de momios) de paratuberculosis en las zonas estudiadas -----	32
Cuadro 5.	Análisis bivariado en rebaños caprinos de las regiones de Libres y la Mixteca poblana para -----	33
Cuadro 6.	Análisis bivariado para determinar posibles factores de riesgo, respecto a la limpieza de corrales de alojamiento de los caprinos a nivel de rebaño---	32
Cuadro 7.	Análisis bivariado para determinar posibles factores de riesgo, referente a la convivencia de los caprinos con otros animales en una misma unidad de producción-----	35
Cuadro 8.	Medidas de dispersión de las edades y los pesos de los caprino-----	35
Cuadro 9.	Descripción de la muestra poblacional y la seroprevalencias por caprinos-----	36
Cuadro 10.	Frecuencia de seropositivos de acuerdo al origen de los caprinos-----	37
Cuadro 11.	Frecuencia de paratuberculosis en ganado caprino por edad y sexo en las dos zonas de estudio (Libres y Mixteca)-----	40
Cuadro 12.	Análisis bivariado a nivel caprinosl para determinar factores de riesgo ----	41
Cuadro 13.	Resultados de PCR anidado en muestras de heces-----	42
Cuadro 14.	Resultados de la tinción de Ziehl Neelsen -----	43

1. RESUMEN

La paratuberculosis (PTB) es una enfermedad ocasionada por *Mycobacterium avium paratuberculosis* (MAP) que causa enteritis crónica, generando importantes pérdidas económicas debido a la emaciación progresiva que desarrollan los animales, por tales motivos, es necesario contar con herramientas diagnósticas adecuadas para detectar a los animales infectados y establecer medidas de control oportunas. El objetivo del estudio fue determinar la prevalencia y los factores de riesgo asociados a PTB en las regiones caprinas de Libres y la Mixteca en el estado de Puebla. El tamaño de muestra (n=865) se determinó aplicando la fórmula de proporciones de Levy con una prevalencia esperada del 10%, un Intervalo de Confianza (IC) de 95% y Error Estándar (EE) 0.02%. Se colectaron muestras de sangre y heces de 898 caprinos en 86 rebaños en 19 municipios. Se utilizó un ELISA indirecto con sensibilidad de 86% y especificidad del 90%, prueba con la cual se determinó la presencia de anticuerpos contra PTB en los 19 (100%) municipios muestreados, obteniéndose una frecuencia de rebaños seropositivos del 76.74% (66/86) y una seroprevalencia aparente por caprinos del 28.06% (252/898); se realizó el estudio bacteriológico y PCR anidado de las heces, en forma individual de los seropositivos y de forma agrupada (grupos de 4) de los seronegativos. Por medio de la PCR se detectaron 62 (16.89%) animales positivos y se obtuvieron 23 (11.79%) aislamientos de MAP. Se obtuvo información a través de un cuestionario epidemiológico por cada rebaño y por cada caprino y mediante análisis bivariado calculando la razón de momios (RM). Se determinó como factor de riesgo a los rebaños dedicados a la producción de carne con 3.2 veces más riesgo de contraer paratuberculosis (RM=3.2) comparados con los rebaños que se dedican a la producción de cabrito ($p \leq 0.05$). Se concluye que los anticuerpos contra paratuberculosis caprina están ampliamente diseminados en las regiones de la Mixteca y Libres en el estado de Puebla ya que se encontraron rebaños seropositivos en todos los municipios muestreados, la frecuencia a nivel de rebaños fue de 76.74% y la prevalencia verdadera a nivel de caprinos fue de 23.76% con un IC 95% (20.98-26.54).

Palabras clave: *Mycobacterium avium paratuberculosis*, paratuberculosis, caprinos, razón de momios.

1.1 ABSTRACT

Paratuberculosis (PTB) disease is caused by *Mycobacterium avium paratuberculosis* (MAP). It causes chronic enteritis, significant economic losses due to the progressive loss of weight that develops the clinically infected animals, considering this characteristics, it is necessary to have adequate diagnostic tools to detect infected animals and appropriated control measures. This study aimed to determine the prevalence and risk factors associated with PTB in goats on Libres and Mixteca regions in the State of Puebla. The sample size was determined ($n = 865$) applying Levy's formula proportions with an estimated prevalence of 10%, 95% and 0.02% EE. Blood samples were collected of 898 from 86 herds in 19 municipalities. Indirect ELISA was used with 86% sensitivity and specificity of 90%; 898 sera were tested for antibodies against PTB in 19 (100%) of all municipalities with a seroprevalence of 76.74 % (66/86) considering all herds and an apparent seroprevalence of 28.06% (252/898) of all goats. It was conducted a bacteriological analysis and PCR of sample feces individually when serological results were positive; and pools of samples were tested in groups of four, when ELISA results were negative. There was 62 (16.89%) positive animals detected by PCR and 23 (11.79%) isolates of MAP were obtained. Epidemiological questionnaire was applied to each goat herd and it was determined that conditions of this study did not affect the prevalence of paratuberculosis disease through bivariate analysis calculating OR. These findings suggest that goat paratuberculosis is widespread in Libres and Mixteca regions, because all herds were seropositive in all municipalities and prevalence was 23.76% with a CI of 95% (20.98-26.54).

Keywords: *Mycobacterium avium paratuberculosis*, paratuberculosis, goats, odds ratio.

3. INTRODUCCIÓN

2.1 Situación actual de la caprinocultura en México

En México, la producción caprina representa la principal actividad económica para 300,000 familias que se localizan en las zonas de Zacatecas, Coahuila, en la Sierra Madre del Sur (Puebla, Oaxaca y Guerrero) y en la zona del Bajío. Los sistemas de producción caprinos en México son de tipo extensivo, semi-extensivo e intensivo, incluyendo los de traspatio en el centro del país. Dentro de las limitaciones que se presentan en los sistemas de producción caprinos, se encuentran el bajo ingreso económico dado por el precio de la leche y del cabrito, así como la falta de atención sanitaria, al no contar con campañas contra enfermedades que ocasionan pérdidas económicas relacionadas con la disminución de la producción láctea y al retraso en la ganancia de peso (SIACON, 2008).

El perfil de la caprinocultura nacional es un sector caracterizado por la informalidad y la presencia de intermediarios, fragmentado, de pequeña escala y de carácter familiar. Existe gran heterogeneidad aún entre productores de bajos ingresos; el rango de precio del litro de leche va de \$ 1.50 a \$ 6.60. En el año 2011 en el estado de Puebla, para elaborar un queso ranchero de 300 g., se utilizan 4 litros de leche y lo venden a \$ 8.00 la pieza; por otro lado, un cabrito de 40 días (9 a 12 Kg) tiene un costo de \$150 a 400 pesos mexicanos en pie, mientras que en el restaurante, un platillo de cabrito tiene un costo de \$185.00, y cada cabrito rinde para servir 8 platillos, con una ganancia para el restaurantero de \$ 1,480.00, contra \$150 de utilidad para el productor (Gurría, 2011).

2.1.1 Sistemas de producción caprinos en México

Los sistemas de producción caprina en México son diversos pues incluyen el semi-extensivo, extensivo, intensivo, trashumantes, hasta los de traspatio en el centro del país. Los propósitos son heterogéneos, ya que van desde la producción de cabritos, adultos para barbacoa, pie de cría, leche y subproductos en zonas de riego o zonas de agostaderos y en menor número sistemas estabulados. (Arbiza y De Lucas, 1997).

En términos globales se sabe de la existencia de los sistemas extensivo, de estabulación parcial o total, del mixto y no se descarta la existencia de otros más (Arbiza, 1989; Fuentes *et al*, 1989). El primero se implementa principalmente en las regiones críticas, áridas y semiáridas

mientras que el intensivo se ubica preferentemente en zonas templadas, pero principalmente del centro del país. El sistema de producción semi-intensivo se observa en regiones agrícolas con disponibilidad de gran cantidad de subproductos agroindustriales. Todos ellos se enfrentan de una u otra manera a factores que los frenan o limitan en su desarrollo, tales como: ausencia de organismos coordinadores de la producción, de investigaciones científicas y tecnológicas, de razas mejoradas, de precios de garantía, de agroindustrias para la colocación de los productos, de capital de asociaciones ganaderas y problemas con tenencia de la tierra (Arbiza, 1989; Ramales *et al*, 1998; Mellado, 1997).

2.1.2 Características de la producción caprina en el estado de Puebla

La producción caprina en el estado de Puebla se considera principalmente de tipo familiar, agrupándose dentro del sistema de economía campesina (INEGI, 1998), teniendo como base biológica el caprino criollo y la introducción de razas especializadas. Así como el hecho de que los caprinos, pastorean la mayor parte del año y en ocasiones durante la época seca reciben suplementación (Hernández *et al*, 2001).

2.1.3 Sistemas de producción caprina en las regiones de Libres y la Mixteca

El sistema de producción predominante en las regiones caprinas de Libres y la Mixteca se basa en alimentación sobre agostaderos (sistema extensivo) con suplementación estacional y de poca variabilidad de sus ingredientes, con finalidad predominantemente productora de animales para el abasto de carne y principalmente de tipo criollo. La reproducción característica de la especie es estacional; sin embargo, se hacen apareamientos continuos. Son incidentes los problemas respiratorios y las parasitosis, así como la mortalidad de cabritos durante la estación seca. No se favorece la asociación de los productores por lo que los canales de comercialización son limitados y se afectan negativamente los precios del producto (Hernández *et al*, 2001).

2.2 Paratuberculosis

2.2.1 Definición

La paratuberculosis (PTB) o enfermedad de Johne, descrita por primera vez por Johne y Frothingham en el año de 1895, es una enfermedad infecciosa de curso crónico que afecta el tracto

gastrointestinal de una gran variedad de especies animales, siendo los rumiantes domésticos y silvestres los principales hospedadores (Juste *et al*, 1984).

La PTB se encuentra ampliamente distribuida en la mayoría de los países del mundo en los cuales se considera como una barrera no arancelaria que dificulta el comercio de animales y sus productos causando un importante impacto socioeconómico, razón por la cual la OIE la clasifica en la lista de enfermedades que deben de ser notificadas (la PTB anteriormente estaba ubicada en la lista B de enfermedades transmisibles) (Benedictus *et al*, 1987; Mateos, 2011).

2.2.2 Taxonomía

Las micobacterias están incluidas taxonómicamente en el *phylum Actinobacteria*, clase *Actinobacteria*, subclase *Actinobacteridae*, orden *Actinomycetales*, suborden *Corynebacterineae*, familia *Mycobacteriaceae*, género *Mycobacterium*. El orden *Actinomycetales* incluye además los géneros *Corynebacterium* y *Nocardia* (formando el denominado grupo CMN) y *Rhodococcus*, que se diferencian principalmente por el tipo de pared celular (Juste *et al*, 2000; Garrity, 2001).

En 1990 *Mycobacterium avium paratuberculosis* (MAP) se clasificó como una subespecie de *Mycobacterium avium*, este complejo incluye además a *M. avium avium*, *M. avium silvaticum* y de manera tradicional a *Mycobacterium intracellulare*. Los miembros de este complejo presentan más de 90% de homología en su secuencia de ADN; sin embargo, difieren en su fenotipo, patogenicidad y afinidad de hospedador (Thorel *et al*, 1990).

2.2.3 Etiología de la paratuberculosis

El agente causal de la PTB es *Mycobacterium avium paratuberculosis* (MAP), que tiene como características principales ser una bacteria intracelular facultativa, aerobia, inmóvil, no forma endosporas, su temperatura óptima de crecimiento está entre 30 y 45°C, tiene forma de bacilo ligeramente curvo y mide de 0.5 µm a 1.5 µm de largo. Se considera Gram positivo aunque se tiñe mal con esta técnica. La afinidad por la tinción, se caracteriza por tener ácido alcohol resistencia, por lo que al realizar frotis y teñirlos con Ziehl Neelsen (ZN), los bacilos suelen observarse en cúmulos (Harris y Bartetta *et al*, 2001).

Las paredes micobacterianas constan de cuatro capas y contienen un 30-60% de lípidos incluyendo ceras, lipoarabinomanano y ácidos micólicos de 60-90 carbonos que impiden la

eliminación de los colorantes una vez absorbidos. La característica de ácido-alcohol resistencia de las bacterias se debe a la característica cerosa de la pared que dificulta la penetración de los colorantes, así como su eliminación (Harris y Bartetta *et al*, 2001). El contenido de guanina y citosina (G+C) del ADN varía entre el 61 y 71% (Levy-Frebault y Portaels, 1992).

Las características que distinguen a MAP de otras especies de *Mycobacterium* son: crecimiento extremadamente lento, su deficiencia en la producción de micobactina (sideróforo responsable de la unión o transporte del hierro al interior de la célula) y la posición del elemento de inserción IS900 que ocurre de 14-18 copias dentro del genoma de MAP (McFadden *et al*, 1987; Green *et al*, 1989).

2.2.4 Epidemiología

Whitlock y Buergelt en 1996, describieron la dinámica de la paratuberculosis en el ganado vacuno como un efecto *iceberg*; la parte emergida de éste representa a los animales con signos clínicos y la parte sumergida representa los animales enfermos y portadores que no presentan semiología clínica. Por cada animal con un caso avanzado de PTB es probable que haya otros 25 animales infectados y solo un 15-25% de estos animales se detectan mediante pruebas diagnósticas.

Cuando la PTB está presente en un rebaño, dependiendo de la severidad de los signos clínicos, la eliminación de MAP en el ambiente y la capacidad de detectar animales enfermos mediante técnicas de laboratorio, los rebaños se clasifican en cuatro estadios: fase latente (I), fase subclínica (II), clínica (III) y fase clínica en estado avanzado (IV) (Whitlock y Buergelt, 1996; Cocito *et al*, 1994; Clarke, 1997; Larsen, 1973).

Fase latente I: se integra principalmente por animales con menos de dos años de edad que están infectados, pero que no se detectan mediante técnicas de diagnóstico rutinarias. Estos animales pueden eliminar niveles mínimos de MAP al ambiente, no detectables en el laboratorio.

Fase subclínica II: animales portadores, pero que eliminan MAP al ambiente y en un porcentaje bajo (15-25%) se pueden detectar mediante cultivo fecal. En estas dos primeras fases la prueba diagnóstica de elección se basa en la detección de la respuesta inmune de tipo celular ya que se trata de fases tempranas de la enfermedad.

Fase clínica III: se caracteriza por la presencia de los signos clínicos típicos de la PTB y la mayoría de los animales dan positivo al cultivo fecal y a las pruebas serológicas. En esta fase también existen alteraciones analíticas a nivel sanguíneo, ya que las concentraciones de proteínas totales, albúmina, triglicéridos y colesterol descienden a medida que progresa la enfermedad (Scott *et al*, 1995; Rice y Carriere, 1969; Patterson *et al*, 1967). Si en un periodo de 3-4 meses los animales no se han sacrificado por otras causas progresan a la fase IV

Fase clínica en estado avanzado IV: la semiología es manifiesta y los animales mueren por deshidratación y caquexia.

2.2.5 Distribución y prevalencia de la paratuberculosis.

Desde 1895, fecha en que se describió el primer caso de PTB, la enfermedad se ha extendido a un elevado número de países; sin embargo, la dificultad en su diagnóstico hace que en ocasiones la estimación de la prevalencia real sea difícil, (Chiodini *et al*, 1984) su prevalencia en caprinos ha sido poco estudiada a nivel mundial (Kennedy *et al*, 2001). Sin embargo, actualmente se llevan a cabo estudios en diversos estados de la República Mexicana cuyos resultados preliminares indican que la PTB es una de las principales enfermedades infecciosas en caprinos adultos de México (Díaz, 2011).

La falta de información se debe a la escasez de estudios de prevalencia, no se notifican los casos reales de PTB, no existe campaña contra la enfermedad; además, el periodo de incubación es prolongado y los signos clínicos se pueden confundir con los de otras enfermedades. Entre los años cincuentas y ochentas la prevalencia de la enfermedad se estimaba en función del aislamiento de MAP en rastro (Condrón, 1999).

2.2.6 Antecedentes de la paratuberculosis a nivel mundial

A nivel mundial, el número de estudios de prevalencia de PTB en pequeños rumiantes es mínimo con respecto a los existentes en el ganado bovino y en nuestro país son prácticamente inexistentes. Los datos en pequeños rumiantes provienen de países como: España, Noruega y Australia por citar algunos. En España, la primera descripción de paratuberculosis se realizó en ovejas (Aller *et al*, 1973), posteriormente en cabras (Garrido y León, 1979) y cuatro años más tarde en vacas (Juste *et al*, 1983); existen muy pocos datos respecto a la prevalencia de esta enfermedad. En ganado ovino se han realizado estudios mediante métodos histopatológicos encontrando

prevalencias de hasta un 49.4% (Pérez *et al*, 1996). Estos mismos resultados se encontraron en un estudio que combinaba los resultados obtenidos mediante pruebas serológicas, cultivo y estudio anatomopatológico en la Comunidad Autónoma de Aragón (Juste *et al*, 1991). En España, los estudios realizados en ganado caprino se basan en la respuesta inmunológica de tipo humoral, así mediante ELISA un 46% de animales son positivos en la provincia de Huelva (Molina *et al*, 1991) y mediante la inmunodifusión doble en gel de agar (IDGA), la seroprevalencia es de un 44% en la Comunidad de Madrid (Mainar-Jaime y Vázquez-Boland, 1998) y de un 56% en la provincia de Ávila (Reviriego *et al*, 2000).

Asimismo en Noruega la paratuberculosis en caprinos es endémica y entre los años 1996-1999 se estableció una seropositividad de 7.7% por rebaño caprino (754/9456) (Tharaldsen *et al*, 2003), mientras que en Australia los ovinos son la principal especie afectada con paratuberculosis, confirmándose la enfermedad a finales del año 2001 en 1,087 rebaños de un total de 84,362 (Windsor *et al*, 2002). En el País Vasco, se han descrito prevalencias entre un 23.5% y un 31.4% mediante métodos serológicos (Juste *et al*, 1992). Mientras que en México solo existen datos de frecuencias de algunos estados del país procedentes del CEIEPAA, sin embargo solo se refieren a casos clínicos que han llegado a dicho centro.

2.2.7 Panorama de la paratuberculosis en el estado de Puebla

En el estado de Puebla, solo existe un reporte preliminar de frecuencia de PTB (Favila *et al*, 2009) previo al presente estudio, por lo que no existen reportes de prevalencia de la enfermedad en ninguna especie doméstica ni silvestre, sin embargo, se sabe de la presencia de la enfermedad en ovinos de los estados de Veracruz, y Oaxaca (Estévez, 2006), así como en caprinos de Oaxaca, entidades que limitan con las zona de Libres y la Mixteca (Favila *et al*, 2009).

2.2.8 Hospedadores susceptibles.

Los principales hospedadores de MAP son rumiantes domésticos, ganado bovino, caprino y ovino; sin embargo, se ha determinado que los animales salvajes como ciervos, conejos, venados, zorros, gamo, alce, llama, muflón, etc. tienen importancia en la diseminación de la enfermedad como reservorios para los animales domésticos (Beard *et al*, 1999; Beard *et al*, 2001; Chiodini *et al*, 1984; Greig *et al*, 1999).

Además de su amplia distribución entre las distintas especies de rumiantes, MAP se ha aislado de caballos (Larsen *et al*, 1972), mulas (Eveleth y Gifford, 1943), ganado porcino (Larsen *et al*, 1971) y gallinas (Larsen *et al*, 1981).

2.2.9 Transmisión

Debido a que la entrada de MAP en el organismo se produce en el tejido linfoide intestinal la vía de transmisión más importante es la oral.

2.2.9.1 Entrada de MAP en el hospedador.

Anteriormente, se pensaba que la localización inicial de MAP después de su ingestión oral eran las tonsilas y linfonodos retrofaríngeos y posteriormente se diseminaba al intestino y linfonodos mesentéricos (Payne y Rankin, 1961). Sin embargo, estudios experimentales demostraron que la mayoría de las lesiones en los estadios iniciales de la infección se localizaban en el tejido linfoide organizado o placas de Peyer intestinales y en los linfonodos mesentéricos asociados a ellos (Sigurdardottir *et al*, 1999).

MAP ingresa por vía oral y es endocitada por las células M, que son enterocitos modificados localizados en el domo y zonas interfoliculares del tejido linfoide de las placas de Peyer, principalmente a nivel de íleon donde la población de linfocitos T es menor. Esta sección intestinal posee una menor capacidad citotóxica, lo que provee un ambiente favorable para un patógeno intracelular. Se ha sugerido que la fibronectina de la bilis favorece la opsonización de las micobacterias cuando pasan a través del intestino delgado, las bacterias se unirían a la fibronectina y luego a las integrinas de la superficie apical de las células M facilitando la translocación de este bacilo. Al traspasar la mucosa intestinal, las bacterias son fagocitadas por macrófagos subepiteliales a través de diversos receptores, principalmente el receptor 3 del Complemento (CR3). En estos macrófagos, las micobacterias pueden ser destruidas o bien sobrevivir y generar una infección persistente, cuando MAP se replica en el macrófago adquiere un fenotipo de mayor virulencia que favorece su invasividad. Las lesiones iniciales consisten en granulomas discretos no encapsulados en la mucosa intestinal relacionada con las placas de Peyer y en los linfonodos mesentéricos adyacentes. En un estudio experimental se observó que MAP es capaz de atravesar el intestino y colonizar el hígado y linfonodos, en tan sólo una hora después de la inoculación en la luz intestinal (Sigurethardóttir *et al*, 2004; Sohal *et al*, 2008)

La progresión de la infección depende de la inmunidad del hospedador, la virulencia de la cepa y la dosis infectante, así como de diversos factores ambientales. Entre los factores fisiológicos del hospedador que influyen en la presentación de la enfermedad, se mencionan el estado nutricional y el estatus hormonal del animal; se ha demostrado que dietas reducidas en calcio protegen a los ratones de la infección con MAP, pero cuando a estos ratones se les administró vitamina D este efecto protector desapareció. En cuanto al estatus hormonal se ha descrito que la exposición *in vitro* de los monocitos a la prolactina incrementa la multiplicación de MAP en monocitos bovinos, lo que sugiere que durante el parto y la lactación la fluctuación en los niveles de esta hormona podría influir en el aumento de la replicación intracelular *in vivo* (Sigurethardóttir *et al*, 2004; Sohal *et al*, 2008)

2.2.9.2 Factores de virulencia

Se ha demostrado que MAP posee mecanismos antimicrobianos en el interior del fagosoma y que puede persistir en macrófagos *in vitro* durante varias semanas, sin pérdida significativa de su viabilidad. (Zurbrick y Czuprynski, 1987; Bendixen *et al*, 1981). Los mecanismos por los cuales resiste la degradación intracelular y se multiplica en los macrófagos no se han investigado en detalle (Bendixen *et al*, 1981), pero se cree que la capa lipídica (lipoarabinomanano) juega un papel importante en la resistencia de las micobacterias frente a los mecanismos intracelulares de defensa (Tanaka *et al*, 1996). Tooker *et al*, han publicado un estudio que sugiere tres posibles tácticas mediante las cuales MAP sobrevive en los macrófagos bovinos (Tooker *et al*, 2002): 1) interferencia de la expresión proteica e inhibición de la maduración del macrófago; 2) expresión de proteínas que interfieren directamente con la activación del macrófago; y 3) penetración en la célula de una manera especial que inhibe los mecanismos de activación.

2.2.10 Infección prenatal

MAP se ha aislado a partir de la mucosa uterina (Yayo *et al*, 2001) y de fetos de madres diagnosticadas con la enfermedad de Johne (Seitz *et al*, 1989; Sweeney *et al*, 1992b), por lo que sugiere que los terneros pueden adquirir la infección en el útero (Sweeney, 1996).

En un estudio realizado en 34 vacas con un resultado positivo de cultivo a partir de los linfonodos mesentéricos, aislaron MAP en nueve fetos (Seitz *et al*, 1989). Estos resultados indican que el riesgo de una infección fetal con MAP es del 26,4%. En otro estudio, solamente detectaron MAP en fetos de aquellos animales que eliminaban grandes cantidades en heces, poniendo de

manifiesto que el aislamiento en fetos está directamente relacionado con la carga bacteriana eliminada por los animales infectados (Sweeney *et al*, 1992b). Existe un reporte de transmisión prenatal de la paratuberculosis en una cabra pigmea (Alinovi *et al*, 2009).

2.2.11 Infección postnatal

La ruta de transmisión más común es la fecal-oral y las heces de los animales infectados son la vía de excreción más importante ya que contaminan las ubres, pastos, agua y alimentos (Collins, 1994; Chiodini *et al*, 1984; Merkal, 1984). Existen dos factores que favorecen la infección, por un lado el volumen de bacterias eliminadas en las heces (10^8 bacilos por gramo de heces) (Chiodini *et al*, 1984) y la capacidad de supervivencia de MAP en el ambiente durante prolongados periodos. Los animales infectados también excretan MAP directamente en la leche tanto en las fases clínicas (Sweeney *et al*, 1992a) como subclínicas (Taylor *et al*, 1981). Dado el volumen de leche que ingieren los animales en edades tempranas y la posible contaminación fecal de la misma también se considera la leche como una de las vías más frecuentes de infección postnatal (Sweeney, 1996).

MAP se ha aislado del calostro y de la misma manera que en la infección prenatal, los animales que eliminan gran cantidad de MAP en heces tiene elevadas concentraciones de MAP en el calostro (Streeter *et al*, 1995).

Independientemente de la ruta de inoculación o de infección, MAP se localiza y multiplica en el tracto gastrointestinal y linfonodos asociados (Kluge *et al*, 1968; Merkal *et al*, 1968a; Merkal *et al*, 1968b). A medida que la enfermedad progresa, la infección se disemina por vía sanguínea o linfática a otros sitios distintos del tracto gastrointestinal (hígado, bazo, pulmón, aparato reproductor, etc.).

2.2.12 Signos clínicos

La PTB es una de las enfermedades que se presentan cada vez con mayor frecuencia en los caprinos, generando emaciación progresiva y la muerte como consecuencias eventuales de la manifestación clínica de la enfermedad. Este proceso de pérdida de peso puede variar semanas o incluso meses con episodios transitorios de recuperación. A lo largo de todo este proceso, los animales afectados no suelen presentar fiebre (Harris y Bartetta, 2001; Chacon *et al*, 2004; Navarro *et al*, 1998). En animales asintomáticos con paratuberculosis, MAP se puede excretar un promedio de 10^8 ufc por gramo de heces (Whittington *et al*, 2001).

La PTB es una enfermedad crónica que se caracteriza en todas las especies animales por un adelgazamiento progresivo del animal (Chiodini *et al*, 1984). El periodo de incubación es variable pero generalmente en ganado vacuno la aparición de sintomatología no se produce antes de los dos años de edad (Whitlock y Buergelt, 1996).

En las cabras, los signos clínicos usualmente aparecen después de los dos años de edad. Las principales manifestaciones clínicas de la enfermedad son la merma de peso (Salgado *et al*, 2005) seguida de la pérdida del apetito, siendo la disminución crónica de peso el signo más característico precedido por una baja en la producción láctea (Thomas, 1983). Solo un 10-20% de los casos clínicos presenta diarrea o aglutinación de las heces en los estados avanzados de la enfermedad (Stehman, 1996). En estos casos, si no se lleva a cabo una adecuada prueba diagnóstica, esta semiología puede ser atribuida a enfermedades parasitarias.

El periodo de incubación, depende de la edad en el momento de la infección (Chiodini *et al*, 1984; Hagan, 1938) y de las dosis ingeridas de MAP (McDonald *et al*, 1999). Principalmente aparecen en la etapa entre los 3 y 5 años de edad (Chiodini *et al*, 1984) siendo más temprana la aparición en el ganado vacuno (Kopecky y Larsen, 1975) que en el ovino (Seaman y Thompson, 1984). Los casos se presentan de forma esporádica o intermitente, debido al carácter crónico y progresivo de la enfermedad. Sin embargo, pueden existir concentraciones de casos clínicos en periodos determinados como son la gestación, lactación, cambios de alimentación, de pastos, estrés debido al transporte o infecciones parasitarias o bacterianas (St-Jean y Jernigan, 1991; Pérez *et al*, 2000).

2.2.13 Lesiones

En cabras, las lesiones consisten en inflamación granulomatosa en el intestino, linfonodos con contenido caseoso y a menudo parcialmente calcificados (Fodstad y Gunnarsson, 1979).

Cuando se lleva a cabo la necropsia de un rumiante en las fases avanzadas de la paratuberculosis, se observa una marcada caquexia con atrofia de las masas musculares, pérdida casi completa de los depósitos grasos, edema intermandibular, ascitis e hidropericardio. Los mayores daños se localizan en intestino y linfonodos mesentéricos. La lesión característica consiste en un marcado engrosamiento de la pared intestinal con aspecto edematoso y aumento de hasta 2 ó 3 veces en su espesor normal. En la serosa intestinal se caracteriza por presentar linfangiectasia,

apareciendo los vasos linfáticos mesentéricos como cordones de aspecto translucido, de recorrido tortuoso y prominente sobre dicha serosa. Los linfonodos de la cadena mesentérica y los ileocecales pueden presentar una marcada tumefacción, mostrándose prominentes en el mesenterio (Harris y Bartetta, 2001; Chacon *et al*, 2004; Navarro *et al*, 1998).

2.2.14 Diagnóstico

El diagnóstico de infección por MAP es difícil de realizar, debido al curso crónico de la enfermedad, a que las pruebas diagnósticas disponibles tienen alta sensibilidad pero pierden especificidad (Nielsen y Toft, 2008) ó a que la respuesta inmune de MAP tiene particularidades cinéticas que dificultan la interpretación de los resultados. La respuesta inmune celular es la primera en presentarse; sin embargo, no es indicador de infección persistente, debido a que en esta fase un animal puede todavía eliminar a la bacteria, mientras que la respuesta inmune humoral aparece después, y particularmente antes de que la respuesta inmune celular haya decrecido. Por tales motivos, la respuesta humoral es considerada un indicador de infección persistente (Stabel, 2009).

2.2.15 Impacto económico

Las pérdidas económicas derivadas de la paratuberculosis son cuantiosas y se deben a causas directas: disminución de la producción láctea, mayor susceptibilidad a otras enfermedades, infertilidad, disminución del valor de los animales en pie (Corpa *et al*, 1998; Kennedy y Benedictus, 2001; Nordlund *et al*, 1996; Ott *et al*, 1999) e indirectas como restricciones en el mercado, implementación de medidas preventivas, sacrificios de animales que aun no están finalizados (Kennedy y Benedictus, 2001).

En nuestro país, Miranda evaluó en 2005 el impacto económico de PTB en bovinos, reportó pérdida anual de \$10.174 por animal infectado, debido principalmente en un 22% a la disminución de la producción láctea. Las pérdidas en ganado ovino se estiman en 125 dólares para casos clínicos de ovejas de producción láctea y 75 dólares en ovejas de producción cárnica (Juste, 1997). Referente a los caprinos existe un estudio realizado en el estado de Guanajuato, donde refieren que la PTB tiene un efecto negativo en la producción láctea, ya que las cabras seropositivas tienen un 9% de baja en la producción con respecto a las cabras seronegativas; para grasa y proteína, las cabras seropositivas tienen en promedio 3% y 7% respectivamente, menor producción que las seronegativas, lo cual representó un costo de \$454 a \$852 pesos mexicanos/cabra infectada/año, solo en el concepto de disminución en la producción de leche. Por otra parte, una

estimación más exacta del costo de la enfermedad debe incluir la poca ganancia de peso de los cabritos, el desecho prematuro de animales y los gastos en tratamientos de animales enfermos (Jorge *et al*, 2011).

2.3 Posibles zoonosis

2.3.1 Enfermedad de Crohn

Esta enfermedad se inscribe dentro de la llamada enfermedad inflamatoria del intestino, que abarca la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn (EC). En ambos casos se trata de una situación inflamatoria de la mucosa, de etiología desconocida que aparece y desaparece de forma recurrente y puede dar origen a complicaciones extra digestivas, por lo que se agrupa dentro de las denominadas enfermedades inflamatorias del intestino (IBD) (Sevilla, 2007). Las características epidemiológicas de la colitis ulcerosa y de la EC son muy parecidas. La incidencia de la colitis ulcerosa es del 11 por 100.000 en los EE.UU, Canadá y países escandinavos y la de la EC del 7 por 100.000. Los países del sur de Europa, Sud Africa y Australia muestran una incidencia mucho menor. En España, la incidencia es de 0.5 a 0.8 casos nuevos por 100.000 habitantes por año, siendo mayor en las áreas urbanas (Duerksen, 2000). En 20 años la EC ha tenido un incremento de 10 veces en su incidencia, especialmente en niños de 2 a 15 años de edad, estando implicados en estas infecciones varios agentes infecciosos: MAP, *Escherichia. coli* adherente e invasiva, *Yersinia* y *Pseudomonas* (Kirkwood *et al*, 2009). Se ha vinculado a MAP en la patogenia la EC, esta asociación no ha podido ser comprobada de manera definitiva; sin embargo, se ha establecido el potencial zoonótico de esta bacteria. Estudios de prevalencia en MAP en pacientes con EC en varias ciudades del mundo han demostrado resultados divergentes en rangos del 0%–100%. El posible rol de MAP en EC ha sido demostrado por la identificación de DNA de MAP usando PCR con los iniciadores IS900 en análisis de aislamientos obtenidos en sangre periférica de pacientes con EC. En niños fue detectado DNA específico de MAP en cerca del 5% de biopsias intestinales con la presencia de lesiones granulomatosas de EC (Kirkwood *et al*, 2009, Mendoza *et al*, 2009, Lee *et al*, 2011).

2.4 Factores de riesgo

Existen distintos factores que favorecen la infección o determinan la evolución de un estado de latencia a enfermedad. A continuación se detallan distintas variables que pueden influir en la

adquisición de la infección de los animales, así como factores que influyen en la forma de manifestación de la enfermedad.

Edad del animal.

La edad en la que los animales entran en contacto con el agente etiológico es un factor decisivo. Los animales jóvenes (aproximadamente menores de seis meses de edad) son los más susceptibles a la infección (Hagan, 1938; Larsen *et al*, 1975; Manning y Collins, 2001) debido a:

1. El desarrollo incompleto de su sistema inmune hace a este grupo de edad más vulnerable a la infección por MAP (Cocito *et al*, 1994).
2. El máximo desarrollo en animales jóvenes de las placas de Peyer del íleon, mismas que involucionan en animales adultos; que son la puerta de entrada de MAP al intestino.
3. Debido a la presencia de la gotera esofágica en animales jóvenes, la leche infectada con MAP pasa directamente del esófago al abomaso evadiendo los mecanismos de defensa del tracto alimentario del hospedador como son compuestos biliares, pH ácido, enzimas digestivas, mucus, peristaltismo y competencia con la flora comensal (Clarke, 1997).
4. En los animales recién nacidos se observa “intestino abierto” que hace referencia al espacio intersticial entre las células del intestino delgado, el cual permite el paso de macromoléculas como las inmunoglobulinas del calostro a la mucosa intestinal. Esta mayor separación celular hace más fácil la invasión tisular de MAP (Sweeney, 1996).

En los bovinos, una vez que son adultos, se adquiere el desarrollo de inmunidad a MAP. Sin embargo, en ovinos y otros animales domésticos no se adquiere inmunidad a MAP (Koets *et al*, 2000)

Dosis ingerida.

Otro parámetro importante para el establecimiento de la enfermedad es la dosis ingerida. El número de bacilos viables eliminados en heces de animales infectados es de 10^6 - 10^8 ufc/g y se ha establecido que la dosis infectiva es aproximadamente de 10^3 bacilos (Brotherston *et al*, 1961). De

acuerdo a esto, una mínima contaminación fecal del ambiente es suficiente para producir la infección de los animales susceptibles (Whittington *et al*, 2000).

A pesar de que se ha demostrado que los animales adultos (mayores de dos años de edad) son más resistentes a la infección con MAP que los animales jóvenes (Larsen *et al*, 1975; Hagan, 1938), se ha descrito el desarrollo de infección por MAP en animales adultos sometidos a una dosis elevada de micobacterias y estrés (Larsen *et al*, 1975).

Otros factores.

Existen otros factores que influyen en la adquisición y desarrollo de la infección como son la distinta patogenicidad de los aislados de MAP (Saxegaard, 1990), el tiempo de exposición a la bacteria (Whitlock y Buergelt, 1996) y la respuesta del hospedador (Clarke, 1997). Esta respuesta se ve afectada de una forma directa por el sistema de producción (afectando preferentemente a animales en sistemas tecnificados), calidad de las raciones alimenticias, estrés por transporte, parto, lactación, inmunosupresión causada por otros agentes como el virus de la diarrea viral bovina (DVB) (Lepper *et al*, 1989; Chiodini *et al*, 1984) y hacinamiento de los animales (Collins *et al*, 1994). Finalmente, factores como el tipo de suelo, agua de la explotación y contacto con animales silvestres (Daniels *et al*, 2001; Daniels *et al*, 2002).

Resistencia al ambiente

MAP es incapaz de reproducirse en el ambiente; sin embargo, puede persistir en la tierra y agua contaminada con heces de animales infectados. Se ha demostrado que esta micobacteria es capaz de sobrevivir en las heces de bovinos infectados durante 152-246 días, el periodo de sobrevivencia de MAP depende de las condiciones ambientales como la congelación, sequía, exposición a la luz solar, cambios en la temperatura ambiental y lluvia. Se ha observado que factores como falta de humedad, exposición a la luz solar, pH superior a 7.0 y bajo contenido de hierro en el suelo pueden disminuir la supervivencia de este microorganismo en la tierra (Collins *et al*, 1984; Whittington *et al*, 2005). También se ha descrito que MAP es capaz de sobrevivir hasta 280 días en charcos, y su resistencia disminuye cuando se expone a la luz solar, a la que únicamente es moderadamente resistente (Larsen *et al*, 1956; Whittington *et al*, 2004). De manera que puede permanecer viable en el ambiente por varios meses lo que sin duda es un factor determinante para la diseminación de la infección.

3. JUSTIFICACION

Las frecuencias de paratuberculosis caprina encontradas en los estados de: Guanajuato, San Luis Potosí, Querétaro, Morelos, Tlaxcala y Veracruz, sugieren que la enfermedad se está diseminando en toda la República Mexicana, en el estado de Puebla no existen referencias sobre la prevalencia o frecuencia de PTB en especie animal alguna y siendo el estado que presenta la mayor producción caprina de nuestro país es imperativo conocer la prevalencia en las zonas caprinas, para a partir de este escenario establecer estrategias que coadyuven a disminuir el riesgo de infección entre hatos y aumentar la productividad, lo cual serviría como base para poder crear un programa de control voluntario de la PTB como se está intentando en México.

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la seroprevalencia individual, la frecuencia a nivel de rebaños e identificar posibles factores de riesgo asociados a la paratuberculosis en cabras de las regiones caprinas de Libres y la Mixteca en el estado de Puebla.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la prevalencia de MAP en cabras de las regiones de Libres y la Mixteca Poblana.
- Estimar la de frecuencia de rebaños afectados por MAP.
- Identificar posibles factores de riesgo asociados a la presencia de paratuberculosis a nivel de rebaños y por animal.

5. HIPÓTESIS

La falta de diagnóstico, la introducción de animales sin prueba en los rebaños y la falta de un manejo sanitario favorecen la diseminación de la paratuberculosis en los rebaños de las regiones caprinas de Libres y la Mixteca en el estado de Puebla.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Descripción del lugar de trabajo

El estado de Puebla se sitúa en la parte centro-este de México (con una superficie de 34017 km²). Geográficamente presenta áreas correspondientes a la Sierra Madre Oriental, a la Llanura Costera del Golfo Norte, al Eje Neo Volcánico Transversal y a la Sierra Madre del Sur, (INEGI, 1987) y está dividido en siete regiones económicas. Puebla aporta el mayor porcentaje de la población caprina en México (15.7%) (SIACON 2008).

6.1.1 Localización geográfica de las zonas muestreadas.

La investigación fue dirigida a las principales zonas caprinas del estado de Puebla, comprendiendo nueve municipios de la zona de Libres y diez de la Mixteca Poblana (Figura 1). La selección de las zonas de estudio se basó en los siguientes criterios: (1) presencia de caprinos susceptibles; (2) evidencia previa de MAP en la población; (3) interacción con estados vecinos donde se conocía la presencia de MAP.

6.2 Tipo de estudio

El tipo de estudio epidemiológico aplicado fue de tipo transversal, el cual se caracteriza porque los sujetos de estudio se evalúan en una sola ocasión y se basa en el estudio de casos presentes al momento de la visita en la unidad de producción (Hernández, 2009).

6.3 Tipo de muestreo

Al no existir un registro por municipio de unidades de producción, ni del número de caprinos, la selección de los 19 municipios, se realizó a través de un método de muestreo no probabilístico o de selección intencionada llamado muestreo por conveniencia; posteriormente se utilizó una base de datos de los productores de la zona, se hizo una invitación a los productores a participar en el estudio, y finalmente, en cada unidad de producción la selección de los animales se realizó al azar y siguiendo los criterios de inclusión, es decir, animales de un año o mayores y aparentemente sanos.

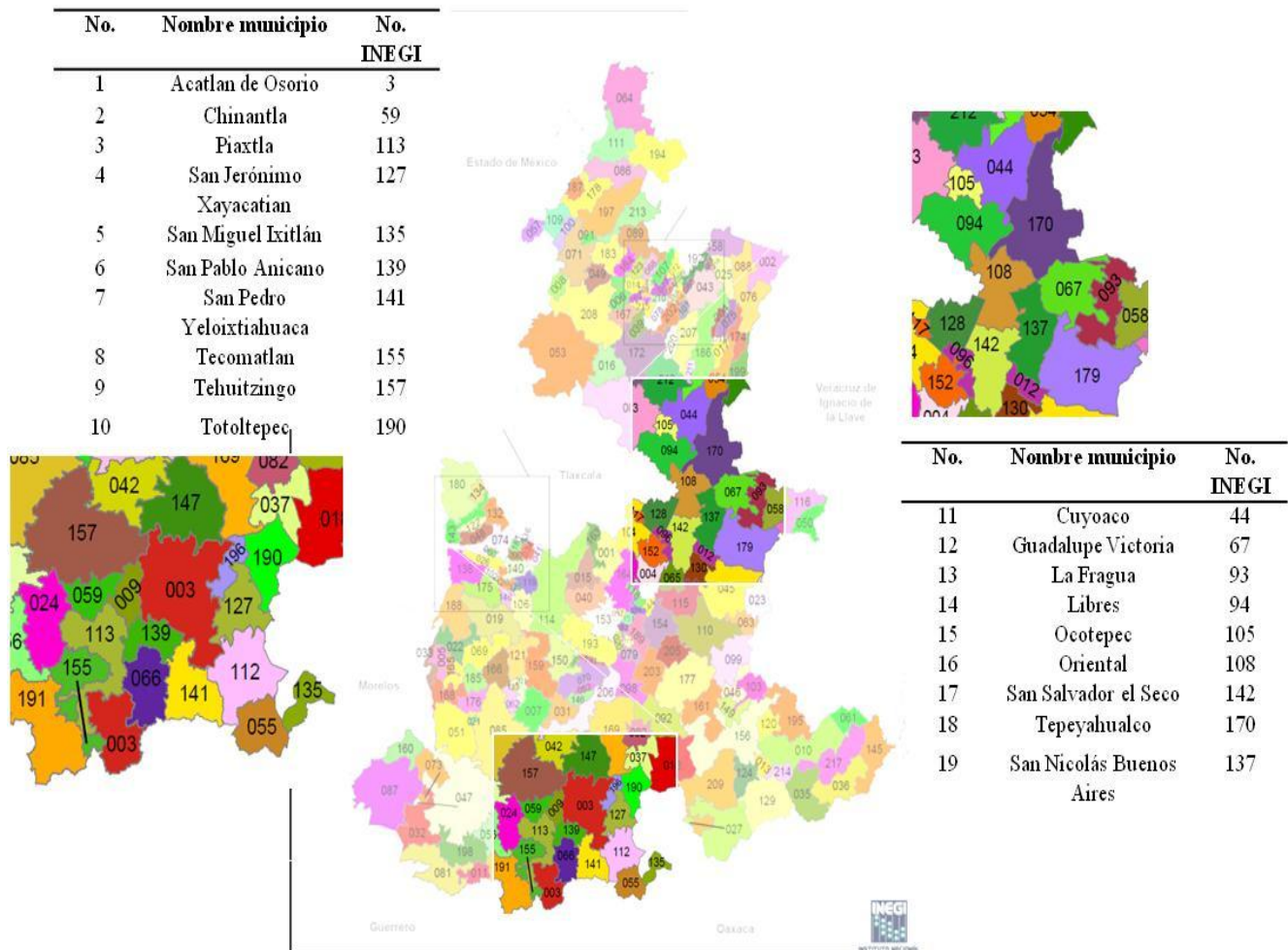


Figura 1. Ubicación de los municipios muestreados. Mapa del estado de Puebla mostrando la localización de los municipios muestreados de la zona de Libres al norte (n=10) y la Mixteca poblana al sur del estado (n=9)

6.4 Población caprina muestreada.

Las muestras de los caprinos utilizados en este estudio fueron tomadas de una población de rebaños con un sistema de producción extensivo, característico del estado de Puebla, no importando el número de caprinos que conformaran el rebaño.

6.5 Cálculo del tamaño de muestra poblacional

El tamaño de muestra se calculó mediante la fórmula de proporciones de Levy; con base al dato referido por el Comité de Fomento y Producción Pecuaria del estado de Puebla de 53,335 caprinos en las zonas de Libres y la Mixteca poblana en el año 2008, una prevalencia esperada del 10%, intervalo de confianza del 95% y un error de 0.02 %; con lo cual se obtuvo un tamaño mínimo de muestra de 865 caprinos.

Formula de proporciones de Levy:

$$n = \frac{N * Z\alpha^2 p*q}{d^2 (N - 1) + Z\alpha^2 p*q}$$

- n=tamaño de la muestra
- N=tamaño de la población
- $Z\alpha^2=1.96^2$ número de desviaciones estándar equivalente a la confianza
- p=prevalencia esperada
- q=1-p (proporción de la población no enferma)
- d^2 =error o precisión

6.6 Cálculo del tamaño de muestra en cada rebaño

El tamaño de la muestra en cada UP se estableció el día de la visita con base a la población que existía en ese momento, se calculó mediante la fórmula de Cannon y Roe, procedimiento que proporciona la probabilidad de detectar al menos un animal enfermo bajo la prevalencia esperada. (Canonn y Roe, 1982)

$$n = [1-(1-a)^{1/D}] [N-(D-1)/2]$$

- a = probabilidad de detectar al menos un animal enfermo (nivel de confianza)
- D = prevalencia
- N = tamaño de la población

6.7 Criterios de inclusión de los caprinos muestreados

La población blanco incluyó a todos los caprinos mayores de un año de edad, que se percibieran aparentemente sanos al momento de la visita y por lo tanto no presentaran signos de enfermedad.

6.8 Muestras colectadas

Se colectaron por cada animal muestras de:

- Sangre para la obtención de suero y su posterior utilización en el ELISA.
- Heces para realizar cultivo bacteriológico y extracción de ADN para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada.
- Una encuesta para cada propietario de los rebaños incluidos en la muestra (anexo 1).
- Un registro de información por caprino muestreado (anexo 2).

6.9 Procedimiento para la colección de las muestras

6.9.1 Sangre

Las muestras de sangre se obtuvieron de la vena yugular y fueron colectadas utilizando tubos al vacío sin anticoagulante para la posterior obtención del suero.

6.9.2 Heces

Las muestras de heces se obtuvieron utilizando una bolsa de plástico nueva por cada caprino, fueron colectadas directamente del recto y se tenían un peso de aproximadamente 5 g.

6.9.3 Encuesta por rebaño

Por medio de las encuestas se obtuvo información de las variables independientes que pudieran estar relacionadas con la presencia de la enfermedad como: tipo de producción, ya sea de carne o cría, ubicación, sistema de manejo, etc.; necesarias para establecer los factores de riesgo de PTB a nivel de rebaños.

6.9.4 Registro de información por caprino

A partir del registro información de cada caprino, obtenida de manera verbal con el propietario del rebaño; se obtuvo información de las variables independientes que pudieran estar relacionadas con la presencia de la enfermedad, tales como: municipio, rancho, edad, peso, sexo, estado de carnes, etc.; necesarias para buscar establecer los factores de riesgo de PTB a nivel de caprinos.

6.10 Procedimiento para el transporte de las muestras

Las muestras de suero y heces se transportaron dentro de hieleras de unicel con refrigerantes en un lapso menor de 48 h, al laboratorio de Tuberculosis del CENID Microbiología INFAP donde se congelaron a -20°C hasta ser procesadas. Así mismo, la información recabada en los formatos descritos en los anexos 1 y 2 se transporto acompañando las muestras en sobres cerrados etiquetados con los datos correspondientes a los rebaños de los cuales procedía la información y dentro de una bolsa de plástico para evitar su deterioro

6.11 Pruebas diagnósticas

6.11.1 ELISA a partir de suero sanguíneo

Los sueros fueron evaluados empleando el ELISA indirecto, utilizando el antígeno protoplasmático de la cepa de MAP 3065 (elaborado en el INIFAP), que tiene una sensibilidad del 86% y una especificidad del 90% (Martínez, 2009).

Los controles, positivo y negativo procedieron del banco de sueros del INIFAP y cada una de las muestras se corrieron por duplicado en placas de la marca SARSTED de 96 pozos. La preparación de todos los reactivos necesarios para la realización de esta prueba y el protocolo del ELISA se describen en los anexos 3 y 4 respectivamente. Con el fin de incrementar la especificidad de la prueba, los sueros problema y los controles se pre-adsorbieron con una solución de *Mycobacterium phlei* al 2%, 30 minutos antes de ser colocados en la placa de ELISA (Yokomizo *et al*, 1985).

Las placas se leyeron usando el filtro de 650 nm con un espectrofotómetro de 8 canales (Biotek).

El resultado final se calculó mediante las siguientes fórmulas:

$$\text{Promedio control (+)} = \frac{\text{control (+) 1} + \text{control (+) 2}}{2}$$

$$\text{Promedio control (-)} = \frac{\text{control (-) 1} + \text{control (-) 2}}{2}$$

$$\text{OD final} = \frac{\text{suero problema} - \text{promedio control (-)}}{\text{promedio control (+)} - \text{promedio control (-)}}$$

6.11.1.1 Punto de corte del ELISA

El punto de corte que se utilizó fue de 0.22, se calculó con intervalos de confianza de 95% y dos desviaciones estándar, por lo tanto, los sueros con lecturas iguales o mayores a 0.22 OD fueron considerados como positivos y las lecturas menores al punto de corte como negativos (Martínez, 2009).

6.11.2 Extracción de ADN de MAP a partir de heces

La extracción de ADN de micobacterias, se realizó a partir de heces, mediante la metodología convencional, precipitando y purificando el ADN con cloroformo-alcohol isoamílico e isopropanol. Los reactivos y procedimientos necesarios para realizar la extracción de ADN a partir de heces se detallan en los anexos 5 y 6 respectivamente.

6.11.3 PCR anidado

A las muestras de ADN obtenidas a partir de heces, se les realizó PCR anidada, la cual consiste en dos reacciones, en donde el material obtenido de la primera reacción, se utilizó como template para realizar una segunda reacción. Se utilizaron iniciadores específicos para el elemento de inserción IS900, el cual es específico para MAP. Se usaron los iniciadores ptb1 (5' TGA TCT GGA CAA TGA CGG TTA CGG A 3') y ptb 4 (5' CGC GGC ACG GCT CTT GTT 3') para la primer reacción de PCR, de la cual se obtuvo un producto de 563 pares de bases y para la segunda reacción ptb 2 (5' GCC GCG CTG CTG GAG TTA A 3') y ptb 3 (5' AGC GTC TTT GGC GTC GGT CTT G 3') se obtuvo un producto final de 210 pares de bases (Erume *et al*, 2001).

Para la primera reacción se utilizaron 2 µl (10ng/µl) de ADN proveniente de heces de caprino, las condiciones para 48 µl de reacción fueron 5 µl de amortiguador de reacción 10X (67mM/µl) (Biogénica), 4 µl de MgCl₂ 2mM (30 mM/µl) (Biogénica), 1 µl DNTP's 200mM c/u, 1 µl (25 pMol) de los iniciadores ptb 1 (Invitrogen) y 1 µl ptb 4 (Invitrogen), 0.3 µl de ADN polimerasa termoestable (1.5 U) (Amplificasa, Biogénica) y 35.75 µl de agua estéril. La amplificación se realizó en un termociclador utilizando el siguiente programa: un ciclo a 95°C por 5 min, 35 ciclos a 95°C por 1 min, 65 °C por 1 min, 72 °C por 1 min, un ciclo más por 1 min a 72°C y un ciclo a 4°C por 5 min.

Las condiciones para la segunda aplicación fueron, 2 µl de la primera amplificación fueron transferidos a microtubos de PCR, que contenían la misma cantidad y concentración de los reactivos descritos anteriormente, excepto que los iniciadores ptb 1 (Invitrogen) y ptb 4 (Invitrogen) fueron sustituidos por los iniciadores ptb 2 y ptb 3. Se utilizó el mismo programa del termociclador. Se incluyó como testigo positivo el ADN de una cepa obtenida de un caso clínico de paratuberculosis en un ovino del estado de Guanajuato.

Los productos de la amplificación fueron visualizados en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio y empleando una cámara de electroforesis a 100 volts durante 1 hora.

6.11.4 Estudio bacteriológico

Para el cultivo bacteriológico, a partir de muestras de heces, se realizó la siembra de cada muestra por duplicado en medio de Herrold, adicionado con yema de huevo y micobactina mediante la metodología de Payuer (1993).

Se disolvieron aproximadamente 2 g de heces en 50 ml de HCP (cloruro de hexadecil piridinio) al 75% se tomaron 10 ml del sobrenadante y de la fase intermedia, se centrifugaron a 2,000 xg durante 10 min, se tiró el sobrenadante y al pelet obtenido se le colocaron 3 ml de zephiran al 3%, dejándolo en reposo por 30 min, posteriormente se centrifugaron por 2,000 xg durante 10 min. Se tiró el sobrenadante conservando aproximadamente 1 ml, en el cual se deshizo el pelet y con esta solución se realizó la siembra por duplicado en medio de Herrold adicionado con yema de huevo (anexo 7) y 2 mg/l de micobactina, dejando incubar los tubos de cultivo en posición horizontal a 37°C durante ocho semanas (Merkal, 1974) redacción

6.11.5 Tinción de Ziehl Neelsen (ZN)

A los cultivos que presentaron crecimiento de colonias con morfología características de MAP, se les realizó la tinción de ZN para confirmar que se trataba de bacterias ácido alcohol resistentes (anexo 8).

6.12 Bases de datos

Se obtuvieron datos de registros individuales de 1040 caprinos, número mayor al calculado inicialmente, debido a que es recomendable muestrear un 20% más del tamaño mínimo muestra calculado (Fuentelsaz, 2004); y se aplicaron encuestas a los caprinocultores cooperantes de 87 rebaños, todos los datos fueron capturados en el programa Excel para después analizarlos mediante los programas estadísticos Stata 7 y Epiinfo

Se elaboraron dos bases de datos: una correspondiente a rebaños y otra para la población caprina muestreada, las cuales fueron depuradas obteniendo datos completos (cuestionarios y resultado de diagnóstico) correspondientes a 898 caprinos que procedían de 86 rebaños.

6.13 Análisis estadístico

6.13.1 Seroprevalencia

A nivel individual los animales seropositivos fueron definidos en términos del punto de corte del ELISA ($OD \geq 0.227$). Mientras que a nivel de rebaño el punto de corte que definió a un rebaño como positivo fue la presencia de uno o más caprinos seropositivos dentro de un mismo rebaño.

La prevalencia aparente de MAP en los caprinos fue calculada, dividiendo el número de caprinos seropositivos entre el número total de caprinos sometidos a la prueba del ELISA. Mientras que la frecuencia de rebaños seropositivos se obtuvo dividiendo el número de rebaños con al menos un animal seropositivo entre el número total de rebaños probados.

$$\text{Prevalencia Aparente (PA)} = \frac{\text{Número de animales positivos a la prueba}}{\text{Total de animales sometidos a la prueba}}$$

$$\text{Prevalencia Verdadera (PV)} = \frac{\text{Prevalencia Aparente} + \text{Especificidad} - 1}{\text{Especificidad} + \text{Sensibilidad} - 1}$$

6.13.2 Razón de momios

Toda la información recabada fue analizada mediante frecuencias, se estableció como estimador el OR del inglés *Odds ratio* o RM (razón de momios), de manera bivariada y en caso necesario multivariada mediante regresión logística. La base de datos fue realizada en el programa Excel y analizada con el programa estadístico Stata 7y Epiinfo.

6.13.3 Determinación de los factores de riesgo

Para definir posibles factores de riesgo por animal, el resultado del ELISA constituyó dentro del análisis estadístico, la variable dependiente, mientras que las variables de los registros individuales (sexo, tipo de animal, peso, edad, estado de carnes, animal nacido en el rancho, animales comprados y lugar en donde fue comprado, presta al semental) y de las encuestas de los rebaños, conforman las variables independientes (limpieza de corrales, frecuencia de la limpieza, destino de las excretas, densidad de población en los rebaños, convivencia de los rebaños caprinos con otras especies de animales domésticos, origen de los caprinos, manejo del rebaño, zona geográfica, tipo de producción y presta o pide prestado el semental) que se utilizaron para establecer los posibles factores de riesgo.

7. RESULTADOS

7.1 Descripción de la muestra poblacional

El Cuadro 1 muestra la distribución del número de rebaños y de caprinos muestreados por zona, incluyendo información por rangos de edades. Se obtuvieron muestras de 50 rebaños de la zona de la Mixteca Poblana y 36 rebaños de la zona Libres; el mayor número de animales muestreados se ubicó dentro de los 26-51 meses en ambas zonas.

Cuadro 1. Distribución de los rebaños por zonas de estudio, incluyendo número de animales muestreados por rango de edad.				
Distribución por edad de animales muestreados				
Zona	Rebaños muestreados	Animales muestreados probados	Número de animales	Edad (meses)
Libres	36	346	48	12-18
			48	19-25
			92	26-38
			84	39-51
			40	52-64
			34	>65
Mixteca Poblana	50	552	124	12-18
			66	19-25
			137	26-38
			115	39-51
			69	52-64
			41	>65
TOTAL	86	898		

En el Cuadro 2 se observa la frecuencia de cada una de las prácticas relacionadas con el manejo de los rebaños en porcentaje, destacándose que el 30.23% de los entrevistados no responde a la pregunta de ¿Qué hace con el excremento que saca del lugar en donde encierra a sus caprinos debido a que no hacen remoción de las excretas.

Cuadro 2. Frecuencia de prácticas de manejo en los rebaños caprinos de las zonas de Libres y la Mixteca poblana	
Variable	Proporción por categoría (%)
Destino del excremento	
Lo vende	7/86 (8.13)
Lo incorpora a terreno	52/86 (60.46)
Composta	1/86 (1.16)
No respondió	26/86 (30.23)
Manejo en pastoreo	
Las trae en el monte	4/86 (4.65)
Las saca al monte y las encierra en la noche	71/86 (82.55)
Están todo el día encerradas en los corrales	11/86 (12.79)
Cuantos caprinos hay en la UP	
7	23/86 (26.74)
38-88	42/86 (48.83)
89-139	16/86 (18.60)
140-290	5/86 (5.81)

7.1.1 Frecuencias de rebaños positivos

En una muestra de 86 rebaños caprinos localizados en 19 municipios del estado de Puebla, se determinó que 66 rebaños presentaron al menos un animal seropositivo a paratuberculosis, por lo que la frecuencia por rebaños fue de 76.7 % con un IC 95% (67.8-85.6%) (Figura 2).

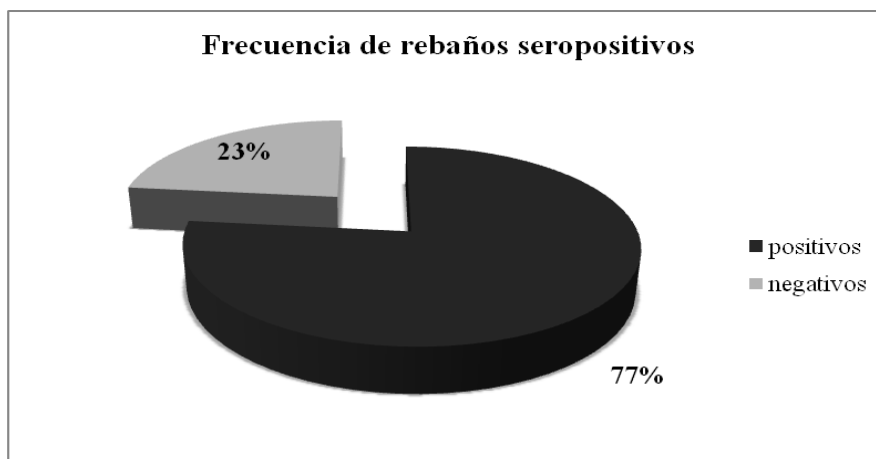


Figura 2. Frecuencia de global rebaños seropositivos a paratuberculosis en las regiones de Libres y la Mixteca en el estado de Puebla (n=86).

El Cuadro 3, se observa el número de rebaños y de caprinos muestreados por municipio con frecuencia de caprinos seropositivos y prevalencia en caprinos. La mayor cantidad de animales muestreados fue obtenida del municipio de Tehuitzingo en la zona de la Mixteca poblana y el menor número de animales muestreados fue obtenido de los municipios de La Fragua y Cuyoaco de la zona de Libres. De un total de 898 muestras, las frecuencias mas altas de seropositivos se registraron en Totoltepec con 48.1% y Ocoatepec 45.4%

La media del número de animales dentro de los rebaños fue de 67 animales con rebaños conformados con 6 hasta 290 caprinos

Cuadro 3. Frecuencia de caprinos seropositivos a PTB y su distribución en rebaños dentro de los 19 municipios muestreados del estado de Puebla

Municipio	Rebaños muestreados	Animales muestreados (probado)	Animales positivos a ELISA	Frecuencia %
Acatlán	8	3	23	31.5
Chinantla	3	34	4	11.7
Cuyoaco	3	28	11	39.2
Guadalupe	2	19	5	26.3
La fragua	1	11	1	9.0
Libres	4	37	8	25.5
Ocoatepec	4	44	20	45.4
Oriental	3	34	11	29.1
Piaxtla	8	86	29	33.7
San Jerónimo	1	13	2	15.3
San Miguel	3	39	8	20.5
San Nicolás	3	28	4	14.2
San Pablo	6	61	16	26.2
San Pedro	3	40	11	27.5
San Salvador	8	81	4	4.9
Tecomatlán	3	39	8	20.5
Tehuizingo	8	88	24	27.2
Tepeyahualco	8	64	25	39.0
Totoltepec	8	79	38	48.1
TOTAL	86	898	252	28.06 prevalencia global

En la frecuencia para cada municipio a nivel de rebaños, los municipios de Acatlán, Cuyoaco, Guadalupe Victoria, La Fragua, Ocoatepec, Oriental, San Jerónimo, San Miguel y Totoltepec, presentaron el 100% de los rebaños muestreados con al menos un animal seropositivo (Figura 3).

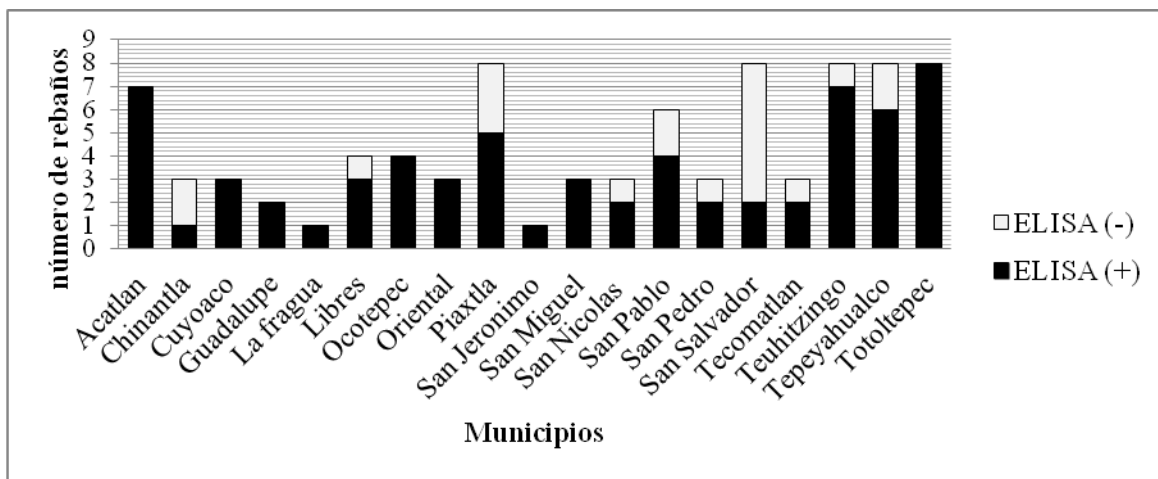


Figura 3. Frecuencia de rebaños seropositivos a PTB en cada por municipio en las regiones de Libres y la Mixteca n=86

En la Figura 4 se observan las frecuencias de rebaños con al menos un animal seropositivo por zona. En la zona de Libres se obtuvo una frecuencia de 72% (26/36) y en la Mixteca 80% (40/50).

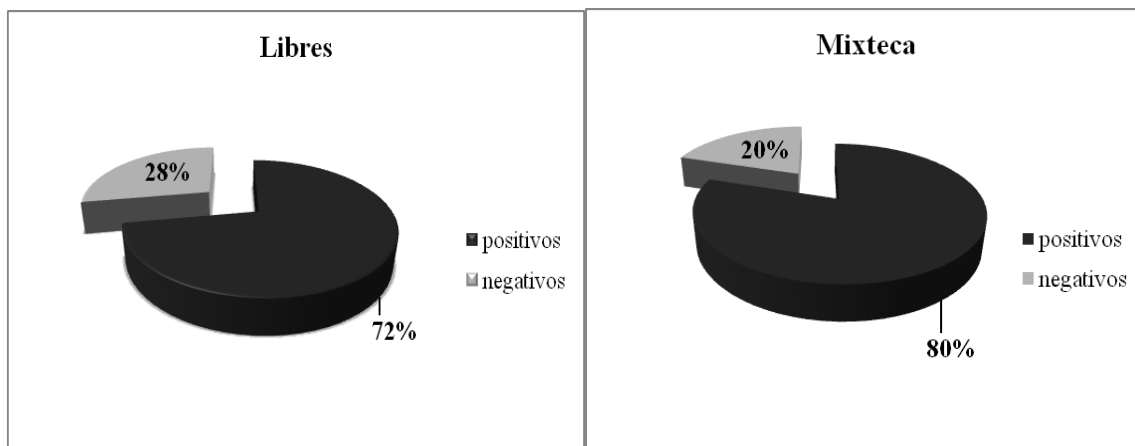


Figura 4. Frecuencias de rebaños seropositivos por zona. Porcentaje de rebaños caprinos seropositivos a paratuberculosis en las regiones de Libres n=36 y la Mixteca poblana n=50

En el cuadro 4 se describe la proporción de rebaños muestreados por zona 41.86% en la zona de Libres y el 58.13% en la zona de la Mixteca poblana. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre las dos zonas ($p < 0.05$).

Cuadro 4. Frecuencia de rebaños seropositivos a PTB y RM (razón de momios) de paratuberculosis en las zonas estudiadas. Frecuencias calculadas en STATA 7.				
Zona	Frecuencia	Frecuencia de (+) a PTB	RM	P
Libres	36 (41.8%)	26/36 (72.2%)	0.65	0.40
Mixteca	50 (58.1%)	40/50 (80.0%)		
Rebaños totales	86 (100%)			

7.1.2 Factores de riesgo a nivel rebaño

Las Razones de Momios (RM) de las variables estudiadas a nivel de rebaño se muestran en el Cuadro 5. Los resultados del análisis de los factores de riesgo a nivel de rebaño, bajo las condiciones de este estudio muestran que los rebaños dedicados a la producción de carne tienen 3.23 veces más riesgo de ser seropositivos a PTB en comparación a los que se dedican a la producción de cabrito ($P < 0.05$), indicando que tienen predisposición a presentar de la enfermedad.

Cuadro 5. Análisis bivariado en rebaños caprinos de las regiones de Libres y la Mixteca poblana para determinar posibles factores de riesgo, mediante RM (razón de momios) y prueba de Fisher ($p < 0.05$)			
Variable	2x2	RM	Valor de P
Zona geográfica	Libres vs Mixteca	0.65	0.4013
Tipo de producción	Producción de carne vs. producción de cabrito	3.23	0.05
Manejo del rebaño	Las trae en el monte y las encierra en la noche vs Están todo el día encerradas en los corrales	0.67	0.6399
Origen de los caprinos	Solo nacidas en el rancho vs. Nacidas en el rancho y compradas	1.43	0.4748
Épocas de parición	Dos épocas de parición vs Una época de parición	1.35	0.57
Cada cuando cambia al semental	Cambio cada dos años vs cambio cada tres años	1.26	0.7075
Acostumbra ordenar a sus cabras	Si ordeña vs no ordeña	1.09	0.8967
	Si ordeña vs a veces ordeña	1.08	0.8904
	No ordeñas vs a veces ordeña	0.60	0.4509

Al analizar las variables de manejo del rebaño se observó que existe un menor riesgo de presentar la enfermedad cuando la limpieza de los corrales se realiza diario o cada 2 semanas adelante ($p < 0.05$) (Cuadro 6)

Cuadro 6. Análisis bivariado para determinar posibles factores de riesgo, respecto a la limpieza de corrales de alojamiento de los caprinos a nivel de rebaño.						
	Si		No			
Resultado de la prueba serológica	+	-	+	-	RM	χ^2
Realiza limpieza de los corrales	55	19	4	1	0.72	0.08
Frecuencia de limpieza						
Diario-1 semana	25	13	39	9	0.44	2.63
Cada 2 semanas-1 mes	11	1	53	21	4.36	2.15
> de 1 mes	28	8	36	14	1.36	0.36
Destino del excremento						
Lo vende	4	0	58	17	---	1.16
Lo incorpora a terreno	1	0	61	17	---	0.28
Composta	34	14	28	3	0.26	4.24
Amontonarlo	23	3	39	14	3.70	3.86
Manejo en pastoreo						
Las saca al monte y las encierra en la noche	57	18	9	2	0.70	0.18
Están todo el día encerradas en los corrales	9	2	57	18	1.42	0.18
Cuántos caprinos hay en la UP						
>37	15	8	51	12	0.44	2.34
38-88	34	8	32	12	1.59	0.81
89-139	14	2	52	18	2.42	1.27
140-290	3	2	63	18	0.43	0.83

Los resultados del análisis de factores de riesgo que involucran la convivencia de los caprinos dentro de un mismo predio con otras especies de animales domésticos, se presentan en el cuadro 7 en el cual se observa que en rebaños donde hay perros, porcinos y aves se presenta una tendencia mayor a presentar PTB.

Cuadro 7. Análisis bivariado para determinar posibles factores de riesgo, referente a la convivencia de los caprinos con otros animales en una misma unidad de producción						
Variables	Si		No		RM	x ²
	+	-	+	-		
Perros de vecinos que puedan estar en contacto con las cabras	24	5	38	14	1.77	0.96
Perros	44	16	22	4	0.5	1.28
Bovinos	15	6	47	12	0.64	0.59
Ovinos	19	7	43	12	0.76	0.25
Porcinos	10	2	52	17	1.63	0.36
Aves	32	9	30	10	1.19	0.10

7.2 Descripción de la muestra a nivel de caprinos

En el cuadro 8 se presentan las medidas de dispersión de los pesos y las edades de los caprinos muestreados

Cuadro 8. Medidas de dispersión de las edades y los pesos de los caprinos (n=898) en las regiones de Libres y la Mixteca poblana.			
Variable Indicadora	Media	Desviación estándar	Rango
Edad	39	19.17	12-120 meses
Peso	32	9.95	17-90 Kg

Las frecuencias a nivel de caprinos por cada una de las variables estudiadas (Cuadro 9). Se muestrearon un total de 58 machos y 840 hembras, que presentaron 28.0% y 27.5% de seropositivos respectivamente. Los animales con pesos entre 29 y 34 kg presentan la mayor frecuencia de positivos con un 42.55%, cabe destacar que son caprinos que de acuerdo a su edad les corresponderían mayores rangos de peso.

Cuadro 9. Descripción de la muestra poblacional y la seroprevalencias por caprinos de las regiones de Libres y la Mixteca poblana

Características de los Caprinos de las Unidades de Producción Pecuaria	Frecuencia	Positivos a ELISA	Frecuencia de Seropositivos (%)
Sexo			
Machos	58/898	16/58	27.58
Hembras	840/898	236/840	28.09
Peso de los caprinos en kg			
17 – 22	209/898	47/209	22.48
23 – 28	153/898	34/153	22.22
29 – 34	141/898	60/141	42.55
35 – 40	257/898	55/257	21.40
41 – 45	99/898	35/99	35.35
>46	39/898	21/39	53.84
Condición Corporal de las cabras muestreadas			
Muy malo	10/898	1/10	10.00
Malo	166/898	35/166	21.08
Bueno/Regular	684/898	201/684	29.38
Gordo	29/898	11/29	37.93
Sin dato	15/898	4/15	26.66
Tipo de animal			
Semental	50/898	14/50	28.00
Primalas	122/898	37/122	30.31
Cabra 1° parto	174/898	55/174	31.60
Cabra 2° parto	222/898	53/222	23.87
Cabra 3° ó 4° parto	261/898	73/261	27.96
Cabra > 5° partos	61/898	18/61	29.50
Macho pero aún no semental	8/898	2/8	25.00

En la Figura .5, se muestra una grafica de barras donde se observa que la muestra se integro de aproximadamente el 86% (775/898) de los animales nacidos en los municipios estudiados y el 14% restante es comprado

Número de caprinos seropositivos comprados y nacidos en el rancho

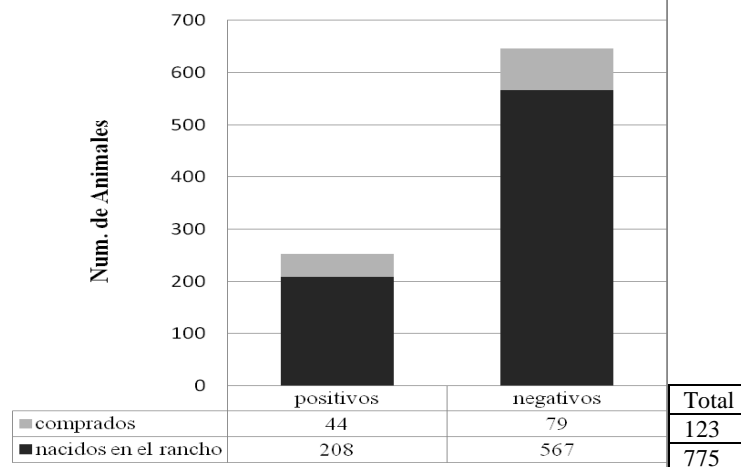


Figura 5. Grafica del número de caprinos seropositivos clasificados de acuerdo a su origen

En el cuadro 10 se muestran las frecuencias de caprinos seropositivos, respecto a la procedencia de los animales que integran la muestra de 898 caprinos.

Cuadro 10. Frecuencia de seropositivos de acuerdo al origen de los caprinos			
Variable	Frecuencia	Positivos a ELISA	Frecuencia de Seropositivos (%)
Origen de los caprinos			
Sólo nacidos en la UP	775/898	208/775	26.83
Sólo comprados de otra UP	123/898	44/123	35.77
Caprinos comprados			
En la misma comunidad	30/123	9/30	30.00
En mismo municipio	18/123	2/18	11.11
En otro municipio, pero el mismo estado	38/123	10/38	26.31
En otro estado	22/123	17/22	77.27
Programa de apoyo ganadero	15/123	6/15	40
Si fueron comprados, cuando llegaron a la granja			
Menos de 6 meses	30/123	9/30	30.00
6 meses a un año	18/123	2/18	11.11
Más de un año	38/123	10/38	26.11
No recuerda	37/123	23/37	62.16

7.2.1 Seroprevalencia por caprinos

Un total de 252 de 898 caprinos se determinaron serológicamente positivos a MAP. La prevalencia aparente individual en la población caprina fue de 28.06% con un IC 95% (26.57-29.55). De toda la muestra y utilizando el estimador de Rogan-Galden, la prevalencia verdadera fue de 23.76% con un IC 95% (20.98-26.54) (Rogan y Gladen, 1978) (Figura 6).

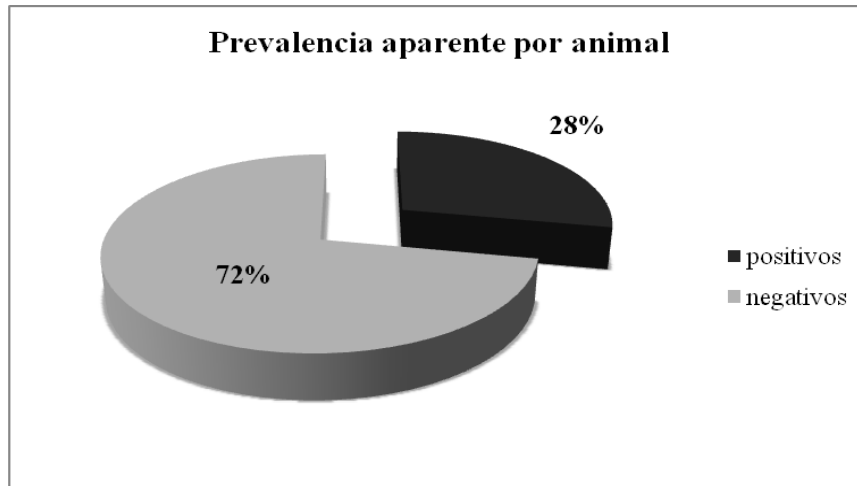


Figura 6. Seroprevalencia aparente de paratuberculosis por animal. Seroprevalencia en las regiones de Libres y la Mixteca en el estado de Puebla, n=898.

La frecuencia en cada municipio por animal fue de 48.1% en Totoltepec de Guerrero, 45.45% en Ocoatepec, 39.2% en Cuyoaco, 39.0% en Tepeyahualco, 33.7% en Piaxtla, 31.5% en Acatlán, 29.1% en Oriental, 27.5% en San Pedro, 27.2% en Tehuiztingo, 26.3% en Guadalupe Victoria, 26.2% en San Pablo Aniciano, 25.5% en Libres, 20.5% en Tecomatlan, 20.5% en San Miguel Ixitlán, 15.3% en San Jerónimo Xayacatian, 14.2% en San Nicolás Buenos Aires, 11.7% en Chinantla, 9.0% en La Fragua y 4.9% en San Salvador el Seco.

En la Figura 7 se presenta la frecuencia para cada uno de los municipios que conformaron el estudio, destacándose los municipios de Totoltepec (zona de la Mixteca), Ocoatepec, Cuyoaco y Tepeyahualco (zona de Libres) por referir las frecuencias de caprinos seropositivos mas altas.

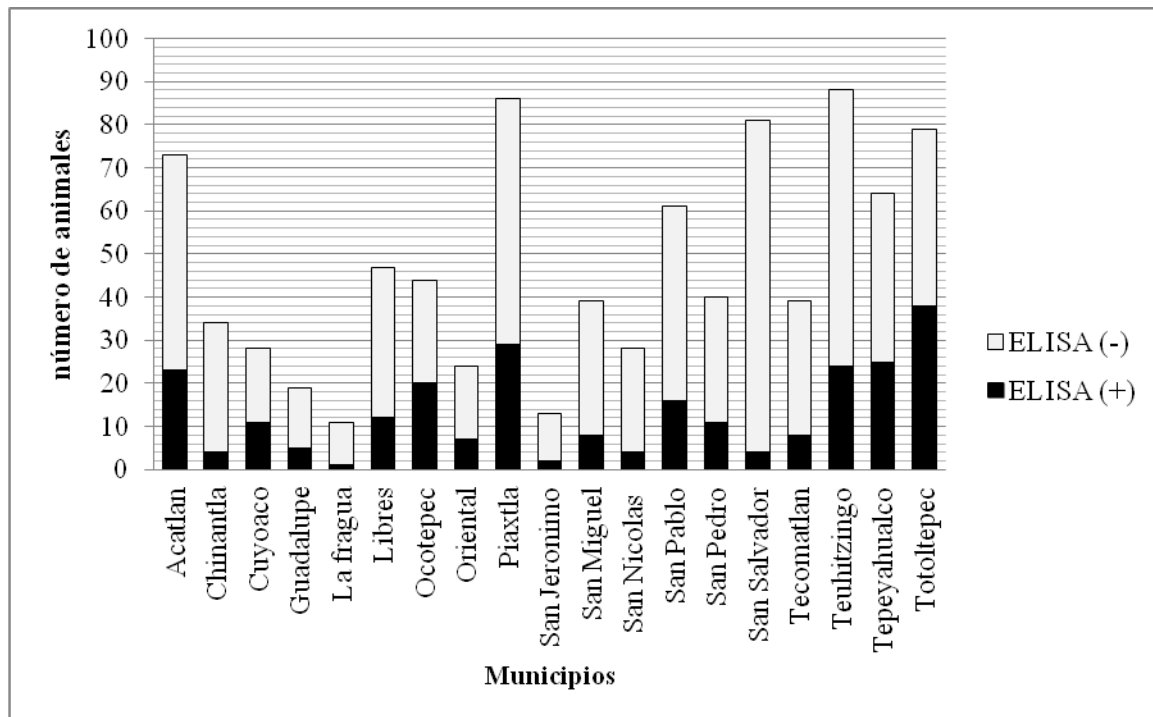


Figura 7. Caprinos seropositivos a paratuberculosis por municipio en las regiones de Libres y la Mixteca poblana n= 19

Las frecuencias de caprinos seropositivos categorizadas por edad en las dos zonas de estudio no mostraron diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$)

Cuadro 11. Frecuencia de paratuberculosis en ganado caprino por edad y sexo en las dos zonas de estudio (Libres y Mixteca).			
Área de estudio	Categoría	Número de animales seropositivos sobre total de animales muestreados	Frecuencia de seropositivos (%)
Libres	Todos los animales	89/346	24.86
	12 – 18 meses	15/48	31.25
	19 – 25 meses	12/48	25.00
	26 – 38 meses	23/92	24.73
	39 – 51 meses	23/84	27.38
	52 – 64 meses	10/40	25.00
	> 65 meses	6/34	17.67
	Hembras	87/335	25.97
	Machos	2/11	18.18
Mixteca	Todos los animales	163/552	29.52
	12 – 18 meses	32/124	24.80
	19 – 25 meses	22/66	33.33
	26 – 38 meses	37/137	27.00
	39 – 51 meses	32/115	27.82
	52 – 64 meses	25/69	36.23
	> 65 meses	15/41	36.58
	Hembras	149/505	29.50
	Machos	14/47	27.78

7.2.2 Factores de riesgo por caprino

En el Cuadro 12 se sintetizan, los resultados del análisis para determinar los posibles factores de riesgo, los cuales bajo las condiciones de este estudio no presentaron diferencias significativas, que indiquen que favorecen la prevalencia de la enfermedad.

Cuadro 12. Análisis bivariado a nivel caprinosl para determinar factores de riesgo (n=898) en las regiones de Libres y la Mixteca poblana.			
Variable	2x2	RM	Valor de P
Sexo	Machos vs. hembras	0.97	0.93
Tipo de animal	Primalas y hembras de 1° parto vs. Hembras de 2°- 5° o más partos	1.25	0.15
Estado de carnes	Muy malo vs. Gordo	----	----
	Malo vs. Bueno	0.67	0.05
	Muy malo - malo vs. Bueno-gordo	0.59	----
Animal nacido en el rancho	nacido en el rancho vs comprados	0.65	0.04

7.3 PCR anidado

La PCR se realizó a 367 muestras, de las cuales el 56.13% (206/367) habían mostrado previamente ser de animales seropositivos y el 43.86% (161/367) fueron mezclas de 4 muestras cada una y que pertenecían a animales seronegativos.

Al utilizar los iniciadores específicos de la secuencia **IS900**, la prueba de PCR anidado y visualizar los productos de amplificación en geles de agarosa al 2% se identificó el genoma de MAP en 62/367 (16.89%) y se muestras, de las cuales 52 fueron seropositivas a paratuberculosis. (Cuadro 13 y Figura 8).

Cuadro 13. Resultados de PCR anidado en muestras de heces obtenidas en caprinos de las regiones de Libres y la Mixteca poblana		
PCR anidado	Animales	%
Positivos	62	16.89
Negativos	305	83.11
Total	367	100.00

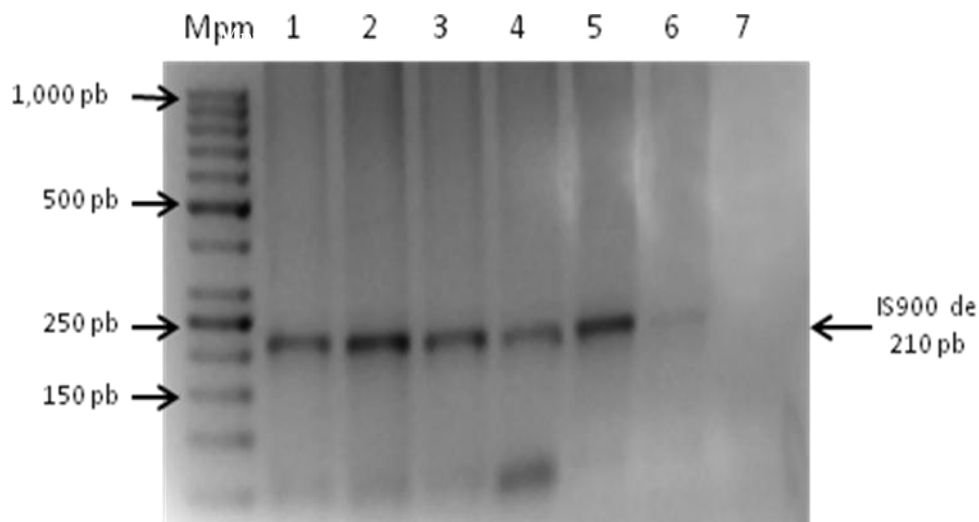


Figura 8. Producto de amplificación del PCR anidado a partir de extracción de ADN de heces de caprinos seropositivos. Gel de agarosa al 2.5% teñido con bromuro de etidio, en el que se observa en el primer carril el marcador de peso molecular 50 pb, carriles identificados del 1 al 7 son productos de amplificación del PCR. Carril 8 control negativo. La flecha negra indica el peso del producto esperado de 210 pb.

7.4 Estudio Bacteriológico

Se intento el aislamiento bacteriológico de 240 muestras de heces de cabras, de las cuales, 195 muestras presentaron crecimiento, y solo se obtuvieron 23/195 aislamientos de MAP (11.7%) (Cuadro 14)

Cuadro 14 Resultados de la tinción de Ziehl Neelsen en aislamientos sugerentes de MAP, a partir de muestras de heces obtenidas en caprinos de las regiones de Libres y la Mixteca Poblana		
Ziehl Neelsen	ANIMALES	%
Positivos	23	11.79
Negativos	172	88.21
Total	195	100.00

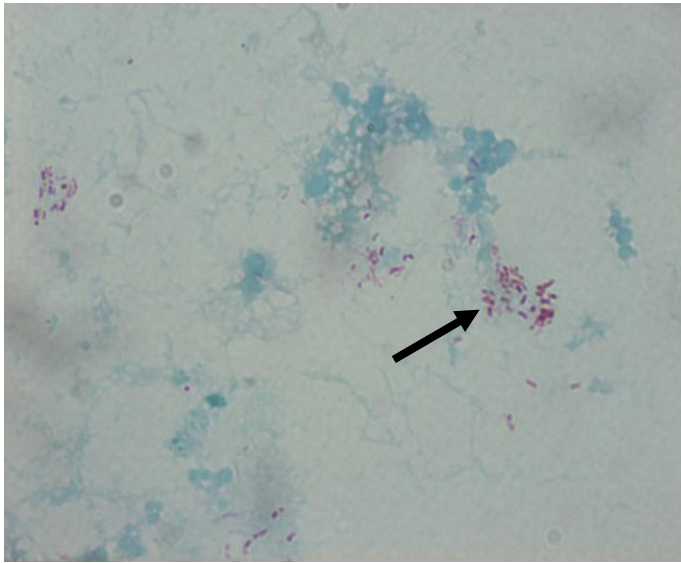
Se observó el crecimiento de colonias bacterianas a partir de la octava semana de incubación; en medios adicionados con micobactina y con la tinción de ZN se observaron bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) por lo que fueron consideradas como MAP (Figura.9)



Figura 9. Aislamientos de MAP en medio de cultivo HEYM con micobactina después de la incubación a 37°C, durante 8 a 16 semanas

La elaboración de frotis a partir de cultivos en medio de Herrold y teñidos con ZN permitió identificar 23 cultivos positivos con BAAR.(Figura 10)

(A)



(B)

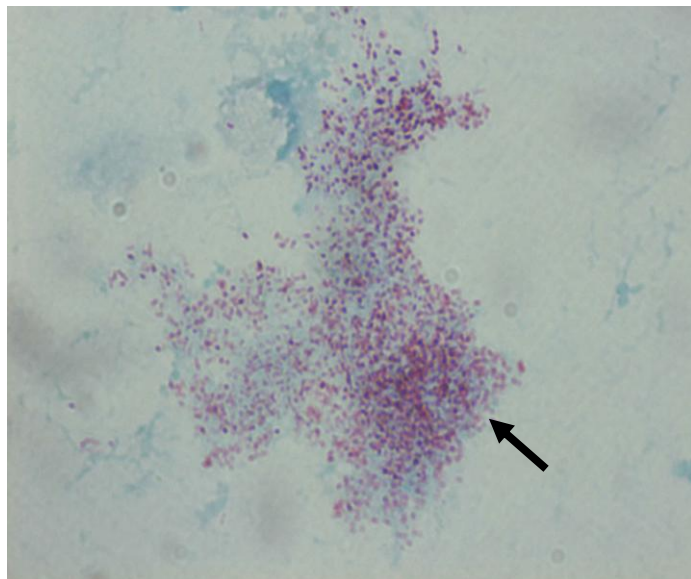


Figura 10. Frotis de cultivos a partir de heces en el que se aprecian BAAR, (A) Medio HEYM (B) Medio Middlebrock. Utilizando tinción de Ziehl Neelsen, 100X

8. DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio confirman que los reactores positivos a PTB están ampliamente diseminados en las regiones caprinas de Libres y la Mixteca en el estado de Puebla. El hecho de que en el 100% (19/19) de los municipios trabajados se encontrara por lo menos un rebaño positivo, es alarmante ya que se demuestra que la PTB caprina es un problema endémico en el estado; estos resultados concuerdan con los obtenidos por Favila *et. al* 2009 quienes reportaron no haber encontrado rebaños libres de PTB en municipios de los estados de Guanajuato, Puebla y Oaxaca, lo anterior pone en evidencian la alta diseminación de la enfermedad en los distintos rebaños y permite inferir la situación actual de la enfermedad en el estado de Puebla.

Se utilizó el método de Rogan–Gladen para estimar la prevalencia verdadera. Aunque una opción alternativa hubiera sido utilizar el teorema Bayesiano; sin embargo, el uso del estimador de Rogan–Gladen tiene la ventaja de estimar la prevalencia verdadera cuando se conoce la precisión de las pruebas diagnósticas utilizadas. Además de formar parte de las recomendaciones de Nielsen y Toft (2009).

La frecuencia obtenida en el estudio fue de 76.74%, mientras que la prevalencia aparente de los caprinos (n=898) fue de 28.06% con un IC 95% (26.57-29.55) y se calculó la prevalencia verdadera en 23.76% con un IC 95% (20.98-26.54) utilizando el estimador de Rogan-Galden, con base en la sensibilidad y especificidad del ELISA ; este último dato refleja la presencia de la PTB en las zonas de Libres y la Mixteca poblana en una gran proporción, pues al tomar en cuenta la sensibilidad y especificidad de la prueba diagnóstica, el IC muestra una mayor de precisión del estimador comparado con el cálculo de prevalencia aparente que se obtiene solo con los resultados de la prueba diagnóstica (Rogan y Gladen 1978).

La prevalencia aparente por caprinos obtenida en este estudio fue de 28.06%, el doble de la encontrada por Toledo *et. al* 2010, quienes realizaron un estudio con rebaños caprinos de la Comarca Lagunera reportando una seroprevalencia aparente de 14.82% a nivel de caprinos; y una frecuencia de 88.37% a nivel de rebaños, mientras que en el presente estudio se obtuvo una frecuencia en rebaños menor de 76.74%, sin embargo, la diferencia en los resultados obtenidos se podría explicar por diferencias en el tamaño de muestra que utilizaron (n=528), así como las condiciones características de producción en cada lugar .

La frecuencia de rebaños seropositivos, mostró ser excepcionalmente alta (76.28%), destacando los resultados por municipio de Acatlán, Cuyoaco, Guadalupe Victoria, La Fragua, Ocotepc, Oriental, San Jerónimo, San Miguel y Totoltepec, por presentar el 100% de los rebaños muestreados con al menos un animal seropositivo, datos similares a estos fueron reportados por Favila *et al.*, 2009 de un estudio epidemiológico de paratuberculosis caprina en municipios de los estados de Guanajuato, Puebla y Oaxaca, quienes reportan frecuencias a nivel de rebaño de hasta 70.78%. En el estado de Guerrero, Villalobos, 2011 reportó un 27% de frecuencia en rebaños y un 3% (41/122) en caprinos, cifras bajas en comparación con las del presente estudio debido a que los municipios muestreados de Guerrero en la Costa Chica tienen vías terrestres de difícil acceso debido a las condiciones geográficas del lugar y el comercio de los animales es muy local, mientras que en los municipios estudiados en el estado de Puebla hay introducción de animales de reemplazo procedentes de estados como Veracruz, Tlaxcala e Hidalgo para la Zona de la Libres y del estado de Oaxaca, con una seroprevalencia aparente a nivel de rebaño de 53.27% (Favila *et al.*, 2009) para la zona de la Mixteca poblana, todas estas evidencias demuestran que la paratuberculosis es una enfermedad endémica en México ya que se encuentra presente en los principales estados productores de caprinos.

De acuerdo con Martin *et al.*, (1992), el calcular la prevalencia verdadera a nivel rebaño depende únicamente de la especificidad de la prueba; mientras que Nielsen y Toft (2008) dan un rango óptimo de 93-100% utilizando ELISA comercial IDEXX. En el presente estudio la especificidad (90%) no se encuentra dentro del rango óptimo recomendado por Nielsen y Toft (2008), sin embargo, se considera que es una buena especificidad y tiene la ventaja de ser un ELISA de manufactura mexicana por lo que se evitan trámites de importación y se disminuyen los costos (Mercier *et al.*, 2010).

La prevalencia por animal encontrada en este estudio fue, a nivel individual de 28.0% (252/898), mientras que Guzmán *et al.*, (2010) en un trabajo realizado en rebaños caprinos del estado de Guanajuato, reportaron una prevalencia del 9.87% (81/821) las condiciones de ambos estudios fueron diferentes ya que Guzmán trabajó con rebaños caprinos intensivos cuyo fin zootécnico son producción de leche y pie de cría, la prueba diagnóstica que utilizó fue inmunodifusión en gel de agar (IDGA) que tiene la característica de presentar una baja sensibilidad ya que se presentan una mayor cantidad de animales falsos negativos en comparación al ELISA que tiene mayor sensibilidad (86%) y especificidad (90%) (Martínez, 2009); otra posible explicación de la diferencia entre las prevalencias es que en Puebla se trabajó con rebaños caprinos de tipo

extensivo, los resultados contrastan con datos publicados que indican que la prevalencia de paratuberculosis es mayor en hatos intensivos debido a factores como son: la cercanía y la convivencia entre las cabras, lo que favorece que cuando las cabras infectadas defecan eliminen el MAP contaminando el agua y el alimento, considerándose esto como la principal fuente de infección entre los animales.

El tamaño de muestra para este estudio se calculó a partir del datos de la población caprina en el estado de Puebla en 2008 del SIACON y del Comité de Fomento del estado de Puebla, debido a que no existe un censo caprino regional ni municipal, por lo que el determinar si la densidad de población caprina por municipio o región es un factor de riesgo, no fue posible; pero el conocimiento del valor de la densidad de población como un factor de riesgo de la PTB, se determinó con base en los tamaños poblacionales de los rebaños muestreados y su relación con la prevalencia de la enfermedad, sin encontrar diferencia estadísticamente significativa.

De acuerdo a los resultados del ELISA, la frecuencia por rebaño encontrada en los 17/19 municipios fluctuó entre 62.5 y 100 % y en los dos municipios restantes Chinantla y San Salvador fue de 33.3% y 25% respectivamente, si consideramos que la paratuberculosis presenta el efecto iceberg es decir de 15-25 animales infectados por cada animal que detecta como positivo la prueba diagnóstica, podemos concluir que el problema de la PTB caprina en Puebla está ampliamente diseminado.

La investigación a nivel mundial sobre la paratuberculosis bovina es muy abundante, a diferencia de la situación que se presenta en los caprinos, donde los reportes en la literatura a nivel mundial y en México eran hasta hace poco tiempo casi inexistentes.

El desconocimiento de la prevalencia y el impacto económico de esta enfermedad en la producción caprina nacional, puede agravar o minimizar las consecuencias en los rebaños nacionales, situación que es muy similar en otros países. En Noruega se realizó en caprinos un estudio de frecuencia de la enfermedad en rastro durante un periodo de 15 años, donde se detectaron 50% de rebaños infectados y una tasa de infección individual de entre 4.7% y 9% (Saxegaard y Fodstad, 1985). Mientras que en los Estados Unidos se evaluaron 6 rebaños de California con un total de 238 caprinos, encontrándose 33,3% de rebaños infectados utilizando la técnica bacteriológica de cultivo a partir de heces y una prevalencia individual promedio de 3% con un

rango de 6-10%, siendo los animales mas viejos los infectados con mayor frecuencia (West *et. al*, 1979).

Las pruebas basadas en inmunoensayos han tenido problemas con la sensibilidad y especificidad, debido a las similitudes que se presentan en la estructura molecular entre *M. paratuberculosis* y *M. avium* y otras micobacterias medioambientales (Yakes, 2008), razón por la cual en este estudio se utilizó la pre-adsorción de los sueros con *Mycobacterium phlei* para aumentar la sensibilidad de la prueba.

En un estudio realizado por Guzmán *et al*, 2010. para determinar la concordancia de las pruebas de PPD aviar, ELISA y PCR como diagnostico de paratuberculosis caprina en un rebaño lechero de baja prevalencia (3.8%) determinada con IDGA encontraron que utilizando ELISA como prueba diagnóstica con el antígeno 3065 en el mismo rebaño, la prevalencia de PTB fue de 8% (24/298), resultados que reflejan que el ELISA nos ayuda a detectar una mayor cantidad de verdaderos positivos.

Diversos trabajos establecen el punto de corte de entre 0.23 a 0.25 OD (Eda *et al*, 2006; Speer *et al*, 2006); se conoce que la sensibilidad de la prueba está relacionada con el punto de corte que se establezca; por lo que el trabajar con puntos de corte mayores a 0.23 OD, se tiene la posibilidad de dar un resultado falso negativo, dejar animales dentro del rebaño que posteriormente desarrollaran la enfermedad.

La marcada diferencia de resultados positivos entre el cultivo fecal (Sensibilidad=50%) y el ELISA (Sensibilidad=86%) podría deberse a la diferencia en sensibilidad analítica de ambas pruebas, ya que el estudio bacteriológico requiere de la presencia de una gran cantidad de bacterias para lograr el aislamiento, lo que en el caso de una enfermedad crónica y con bacterias de lento crecimiento y fastidiosas se acentúa, por otra parte la excreción micobacteriana en heces ocurre de manera intermitente por lo que animales infectados pueden no estar eliminando el microorganismo al momento del muestreo.

Se detectó la presencia de MAP por medio de PCR en solo el 11.79% de las muestras (23/195) muestras de heces, similar a los resultados obtenidos por Dimareli *et al*, 2009 quienes obtuvieron 15.55% de positivos a PCR (7/45) Es conocida la existencia de factores que afectan la

capacidad de detección de la infección por medio de cultivo fecal, como son la excreción a través de las heces de forma intermitente y en escaso número de las bacterias, la contaminación de los cultivos por otros agentes, especialmente hongos, por lo que es altamente probable que los niveles de infección en los rebaños examinados por bacteriología sea mayor a la reportada en este estudio (Collins y Sockett, 1993; Collins, 1996; Stabel, 1998; Collins 1996; Munjal *et al*, 2004; Eamens, 2007). La especificidad del cultivo a partir de heces, leche o tejido es considerada de 100% (Timms *et al*, 2011). En cultivos realizados a partir de heces de caprinos se reporta una sensibilidad de entre 25 (Dimareli y Sarris, 2001) -0.38% (De Juan *et al*, 2006) y una especificidad del 0.91 (Dimareli y Sarris, 2001). Para explicar los resultados obtenidos en este estudios hay que considerar que en casos subclínicos se reporta baja sensibilidad de los métodos de ZN, cultivo y PCR (Paolicchii *et al*, 2003) y la PTB tiende a presentarse en su mayoría bajo condicion subclínica.

En cuanto a los factores de riesgo existe un estudio realizado en rebaños caprinos de Chile (Kruze *et al*, 2007) en el que encontraron asociación entre el sistema de manejo de los rebaños y el estado de infección de los animales. Ya que todos los rebaños infectados se caracterizaban por sistema de manejo intensivo y de alta producción, sin medidas de control ni estrategias de diagnóstico. Las condiciones de los rebaños de Puebla difieren de las de los rebaños chilenos, en cuanto al tipo de sistema de producción pero coincidían en lo referente a que no existen programas sanitarios y no se tienen medidas de control ni estrategias de diagnóstico para la paratuberculosis, sin embargo, los resultados obtenidos muestran 3.2 veces más riesgo (RM= 3.2) de ser seropositivos a PTB en producciones de engorda comparado con rebaños dedicados a la producción de cabrito.

En terneros se menciona que al existir una alta prevalencia, es posible la transmisión vertical de madre a feto vía intrauterina y a través del calostro en las crías (Sweeney, 1996). En el tipo de explotaciones estudiadas, no se puede determinar la probabilidad de infección en las crías de madres seropositivas debido a la cronicidad de la enfermedad y a que no se dió un seguimiento a los animales.

Otro factor de riesgo que favorece la presencia de paratuberculosis y que está documentado en Nueva Zelanda, es el contagio de un rebaño de caprinos manejado con sistema de pastoreo rotacional inmediatamente después del pastoreo con ganado bovino infectado, en las cabras se aisló MAP de tejido intestinal en 6 de 9 cabras de un año de edad (Ris y Weaver, 1988), Sin embargo, en Puebla el manejo mixto de bovinos con caprinos a pesar de presentarse esta convivencia en 21/86 no fue un factor de riesgo estadísticamente significativo para la presencia de la enfermedad.

Existen antecedentes de que el principal factor de riesgo que favorece la presencia de PTB en caprinos, es la introducción de animales de reemplazo, sin embargo, esto está documentado en otros países y son referidos a rebaños intensivos dedicados a la producción lechera. Existen referencias que mencionan puntualmente que en los rebaños con un sistema de producción extensivo la importancia de este factor de riesgo disminuye, a pesar de que en Puebla, los reemplazos de los rebaños son del mismo hato o adquiridos de hatos vecinos que cohabitan diariamente en los pastizales y aguajes, al evaluar este factor de riesgo no fue significativo en este estudio. Si bien no es significativo, se debe tener en cuenta.

En la evaluación de los factores de riesgo a nivel de rebaño se encontraron algunas variables que a pesar de no haberse podido demostrar una diferencia estadísticamente significativa muestran una tendencia a afectar la presentación de la enfermedad como: el origen de los caprinos (RM=1.43), la visita de perros de los vecinos a la explotación (RM=1.89) y hembras de rebaños con dos épocas de parición (RM=1.35). Mientras que factores como el no ordeñar a las cabras (RM=0.60) muestran tendencia a ser un factor protector.

En el estudio de los factores de riesgo que favorecen la presencia de PTB en caprinos, lo más relevante fue encontrar una diferencia significativa mediante la prueba de Fisher entre animales con un mal estado de carnes los cuales son más propensos a ($F=0.000426$) presentar en comparación con los animales con un buen estado de carnes. El análisis también puso en evidencia que no hay diferencia entre sí los animales son hembras o machos para ser más susceptibles a la enfermedad, ya que el valor de (RM=0.97) fue muy cercano al valor de nulidad.

La epidemiología de la PTB dificulta la adopción de programas de control debido a que estos son a largo plazo, complicados de realizar, y de elevado costo. A todo esto se debe aunar el desconocimiento del estatus de la enfermedad en México y la inexperiencia que tienen los productores y los clínicos de campo sobre cómo controlar esta enfermedad.

Los programas de control en otros países se basan en la implementación de medidas de prevención de la transmisión de los animales adultos a los jóvenes, y en llevar a cabo pruebas de diagnóstico en todos los animales adultos del rebaño con el sacrificio de los animales reactivos para reducir la contaminación. (Whittington y Sergeant, 2001). Sin embargo, en los países europeos en los que se aplican las medidas antes mencionadas, existen apoyos económicos para los productores al desechar animales positivos a PTB mientras que en nuestro país esto no ocurre.

En México, se está elaborando un programa de control voluntario de la PTB en rumiantes domésticos, que pretende disminuir la prevalencia de la PTB en territorio mexicano, sin embargo; este programa que tiene objetivos muy ambiciosos apenas está en su planeación.

En el presente estudio se demostró la presencia de paratuberculosis por la presencia de anticuerpos en los animales, apoyada por la identificación del agente etiológico con la PCR y el aislamiento bacteriológico.

La ventaja de utilizar en conjunto las pruebas de ELISA, PCR y el cultivo bacteriológico en estudios epidemiológicos de tipo transversal, fue que este tipo de diagnóstico aunque es más costoso y tardado, resulta ser más adecuado al ser las tres pruebas complementarias entre ellas y esto garantiza un diagnóstico certero de la paratuberculosis.

9. CONCLUSIONES

- Utilizando una muestra de 898 animales, distribuidos en 10 municipios de la Zona de Libres y 9 municipios de la Mixteca en Poblana, se obtuvo una seroprevalencia aparente de 28.06% con un IC 95% (26.57-29.55) y una seroprevalencia verdadera de 23.76% con un IC 95% (20.98-26.54)
- Los resultados de este estudio confirman que las infecciones por MAP están ampliamente diseminadas en los rebaños de las regiones caprinas Libres y la Mixteca del estado de Puebla; encontrándose rebaños positivos en el 100% de los municipios muestreados y una frecuencia de rebaños infectados de 76.74% (66/86).
- En cinco municipios de la zona de Libres (Cuyoaco, Guadalupe Victoria, La Fragua, Ocoatepec y Oriental) y en cuatro de la zona de la Mixteca Poblana (Acatlán de Osorio, San Jerónimo Xayacatian, San Miguel Ixitlán y Totoltepec de Guerrero) se encontraron el 100% de rebaños seropositivos.
- Los rebaños dedicados a la producción de carne tienen 3.2 veces mayor riesgo de contraer infección por paratuberculosis (RM=3.2) comparados con los rebaños que se dedican a la producción de cabrito ($p \leq 0.05$), por lo tanto, es un factor de riesgo que favorecer la presencia de paratuberculosis, a nivel de rebaño.
- El conformar rebaños solo con animales nacidos dentro del mismo rebaño es un factor protector para disminuir el riesgo de infecciones por MAP (RM=0.65) ($p \leq 0.05$)
- Al analizar algunas variables, tales como: la convivencia de los caprinos dentro de una misma unidad de producción con porcinos, perros y aves no se logró establecer significancia estadística para poder ser considerados factores de riesgo, sin embargo, muestran tendencia a favorecer la presencia de paratuberculosis, ya que son mas frecuentes en caprinos seropositivos.
- Es necesario implementar medidas sanitarias para evitar que este problema siga creciendo y controlarlo en los rebaños donde ya está presente.

10. RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio y a las condiciones de producción de las zonas de Libres y la Mixteca poblana se recomienda:

- Evitar introducir animales procedentes de rebaños seropositivos a PTB
- Apartar a los animales seropositivos del resto del rebaño hasta que éstos terminen su ciclo productivo
- Realizar limpieza y desinfección de corrales cada tercer día o cada semana
- Alimentar a los cabritos de madres seropositivas con calostro de animales seronegativos
- De ser posible lotificar
- Realizar pruebas serológicas a los rebaños cada 6 meses o cada año para monitoreo de PTB

11. ANEXOS

ANEXO 1

FOLIO EXPLOTACIÓN _____

Cuestionario de Salud Animal en Caprinos del estado de Puebla

Todos los datos que usted proporcione son confidenciales y solamente serán utilizados con fines de investigación para el mejoramiento de la ganadería del estado de Puebla por lo que le solicitamos atentamente que responda a las siguientes preguntas.

Fecha: _____ Encuestador: _____

Nombre del propietario: _____

Nombre de la explotación: _____

Comunidad, Poblado, Paraje o lugar donde se ubica la explotación: _____

Municipio: _____

1.- ¿A qué tipo de producción dedica sus cabras?

- | | |
|--------------------------------------|--------------------------------|
| 1() Producción de cabrito | 2() Producción de leche |
| 3() Doble propósito (leche y carne) | 4() Producción de pie de cría |
| 5() Engorda | |

2.- El día de hoy

¿Cuántos caprinos tiene?:

machos___; sementales que monten___; hembras con uno o mas partos___; cuantas primaras___

3. ¿Cómo acostumbra manejar a sus cabras?

- 1() Las trae en el monte 2() Las saca al monte y las encierra en la noche
3() Están todo el día encerradas en los corrales

4.- ¿El manejo de sus cabras es igual todo el año?

- 1() Si, siempre igual
2() No, cambia en algunas épocas del año ¿En que cambia? _____

5.- **Durante el año 2008**, ¿Compró o metió cabras a su rancho que hayan venido de otro lugar o rancho?

- 1() Si 2() No 3() No recuerda

6.- **De Enero del año 2009 al día de hoy**, Ha comprado o adquirido...

a. Caprinos para cría 1() Si 2() No **Pase a la preg. 12** 3() No recuerda

a.1. Sementales 1() Si ¿Cuántos?____ 2() No 3() No recuerda

a.2. Hembras 1() Si ¿Cuántas?____ 2() No 3() No recuerda

7.- ¿Dónde los compró o adquirió?

- 1() En la misma Comunidad 2() En el mismo Municipio
3() En otro municipio, del mismo estado 4() Otro estado_____ 5() Otro país_____

8.- ¿La procedencia de las cabras que actualmente tiene son?

- 1() Nacidas en su rancho 2() Son compradas o llegadas de otro lugar
3() Hay nacidas en su rancho y también compradas

9.- ¿Cuántas épocas de parición tienen sus cabras por año?

- 1() Una 2() Dos 3() Continua 4() Otra_____

10.- Los sementales, ¿andan junto con las hembras todo el año?

- 1() Si 2() No 3() A veces 4() Por temporada

11.- ¿Cada cuándo cambia el semental?

- 1() Cada año 2() Cada dos años 3() Cada tres años 4() Otro_____

12.- ¿Usted llega a pedir prestado o presta el semental?

- 1() Si 2() No 3() A veces

Las preguntas que se harán a continuación son del periodo de tiempo de Enero del 2009 a la fecha.

13.- ¿Ha tenido cabras que aborten?

- 1() Si 2() No **Pase a pregunta 23** 3() No sabe

14.- ¿Qué cabras han abortado?

- 1() Las que han nacido en el rancho 2() Las compradas
3() Han abortado por igual las del rancho como las compradas 4() No sabe

15.- ¿Qué tipo de cabras principalmente son aquellas que le han abortado?

- 1() Las de primer parto 2() Las de segundo parto 3() Las de tercer parto
4() Las de 4 o más partos 5() En varios partos

16.- ¿Cómo eran las crías abortadas?

- 1() Muy chiquitas 2() De buen tamaño, bien terminadas 3() Momificadas, secas
4() No recuerda o no se fijó

17.- ¿Ha tenido cabritos que nazcan débiles y mueran al poco tiempo?

- 1() Si 2() No 3() No sabe

18.- ¿Ha tenido cabritos que nazcan con defectos como cabeza grande, patas cortas, hocico malformado, etc.?

- 1() Si 2() No 3() No sabe

19.- ¿Ha tenido cabras que parecía que ya estaban cargadas y que después entraban en calor nuevamente (repetidoras)?

- 1() Si 2() No 3() No recuerda

20.- ¿Ha tenido caprinos que adelgacen poco a poco y que a pesar de darles tratamientos o mejorar alimentación no se reponen?

- 1() Si 2() No 3() No recuerda

21.- ¿Ha tenido caprinos que siempre tienen diarrea que aparece y desaparece a pesar de que las desparasiten?

- 1() Si 2() No 3() No recuerda

22.- ¿Usted acostumbra ordeñar sus cabras?

- 1() Si 2() No **Pase a pregunta 32** 3() A veces

23.- ¿Llega a mezclar leche de cabras con la leche de vacas?
 1() Si 2() No 3() A veces

24.- ¿Qué hace con la leche que ordeña de sus cabras?
 1() La vende 2() La deja para el consumo en casa 3() Hace quesos

25.- ¿Si usted prepara quesos de esta leche, ¿Qué hace a estos quesos?
 1() Los vende ¿Dónde? _____ 2() Son para el consumo de la familia
 3() Son para consumo familiar y venta

MANEJO SANITARIO

26.- Usted acostumbra vacunar a sus cabras y si aplica las siguientes vacunas.
 1() Si 2() No **Pase a pregunta 37**

26.1 Contra la brucelosis 1() Si 2() No 3() A veces

26.2 Contra el mal de paleta 1() Si 2() No 3() A veces

26.3 Otra ¿Cuál? _____ ¿Con qué frecuencia? _____

27.- A qué tipo de cabras vacuna contra la brucelosis?

27.1 A hembras chicas 1() Si 2() No 3() A veces

27.2 A hembras jóvenes 1() Si 2() No 3() A veces

27.3 A hembras adultas 1() Si 2() No 3() A veces

27.4 A machos 1() Si 2() No 3() A veces

28.- Cada cuándo vacuna contra la brucelosis

1() Una sola ocasión 2() Una vez al año

3() Después de cada época de partos 4() Cuando le dicen los técnicos o en la farmacia

29.- ¿Tiene perros conviviendo con sus cabras, ya sean para cuidado o como mascotas?

1() Si 2() No 3() A veces

30.- Los perros de casas vecinas pueden entrar a donde están sus cabras

1() Si 2() No 3() A veces

31.- ¿Qué otros animales tiene que estén junto o que convivan con las cabras?

31.1 Vacas, bueyes, becerros. 1() Si 2() No

31.2 Borregos 1() Si 2() No

31.3 Puercos 1() Si 2() No

31.4 Aves 1() Si 2() No

32.- Por lo regular, ¿qué hace usted con la placenta o pares después de que una cabra parió?

32.1 La deja tirada 1() Si 2() No 3() No sabe

32.2 La echa a los perros 1() Si 2() No 3() No sabe

32.3 La quema 1() Si 2() No 3() No sabe

32.4 Le hecha cal 1() Si 2() No 3() No sabe

32.5 La entierra. 1() Si 2() No 3() No sabe

32.6 Otra Mencione _____

33.- ¿Quién es el encargado de cuidar sus cabras?

1() Un empleado 2() Usted 3() Sus familiares

34.- Si ustedes ordeñan sus cabras, ¿quién es el encargado de ordeñarlas?

1() Un empleado 2() Usted 3() Sus familiares

35.- ¿Si usted compra alguna cabra, pide que le den algún certificado o un documento donde le aseguran que ese animal está libre de brucelosis?

1() Si 2() No 3() A veces

36.- ¿Acostumbra desparasitar a sus cabras?

1() Si Fecha última desparasitación: _____ 2() No 3() A veces 4() No sabe

37.- ¿Acostumbra sacar el excremento de sus cabras del corral?

1() Si 2() No 3() A veces

38.- Si saca el excremento de los corrales, ¿cada cuando acostumbra hacerlo?

1() Diario 2() Cada tercer día 3() Cada semana 4() Cada 15 días
5() Cada mes 6() Cada 3 meses 7() Cada 6 meses 8() Otro _____

39.- ¿Que acostumbra hacer con el excremento de sus cabras?

1() Lo vende 2() Lo incorpora al terreno 3() Composta 4() Otro _____

40.- Mencione las tres enfermedades que hay en su rancho.

1 _____ 2 _____ 3 _____

41.- Mencione las 3 principales causas de muerte en sus caprinos en orden de importancia

1 _____ 2 _____ 3 _____

LE AGRADECEMOS SU PARTICIPACIÓN

REGISTRO INDIVIDUAL POR CAPRINO

- Fecha _____ Municipio _____
- Rancho _____ Nombre o identificación del caprino _____
- 1.- Raza _____ 2.- Peso Kg _____ 3.- Edad (meses) _____
- 4.- Sexo 1() Macho 2() Hembra
- 5.- Tipo de animal:
- 1() Tripón o destetado(a) 2() Semental
- 3() Primaldas 4() Cabra 1er parto
- 5() Cabra 2º parto 6() Cabra 3er parto
- 7() Cabras 4ºparto 8() Cabras con 5 o más partos
- 6.- Estado de carnes
- 1() Muy malo 2() Malo 3() Bueno/Regular 4() Gordo 5() Muy Gordo
- 7.- ¿Este animal es nacido en el rancho?
- 1() Si **Pase a pregunta 10** 2() No 3() No sabe
- 8.- Si fue comprado, ¿en dónde se compró?
- 1() En la misma Comunidad 2() En mismo Municipio
- 3() En otro municipio, pero el mismo estado 4() En otro estado. 5() En otro País
- 9.- Si fue comprado, ¿hace cuánto tiempo que llego a su rancho?
- 1() Menos de 6 meses 2() 6 meses a un año
- 3() Más de un año 4() No recuerda
- 10.- ¿Este animal ha sido vacunado contra la brucelosis?
- 1() Sí 2() No **Pase a pregunta 12** 3() No sabe
- 11.- Este animal, ¿se ha vacunado más de una vez contra la brucelosis?
- 1() Sí 2() No 3() No sabe
- 12.- A este animal ¿qué otra vacuna se le ha aplicado? _____
- Si el animal muestreado es una HEMBRA en producción**
- 13.- ¿Cuál es su producción máxima de litros de leche por día en el ordeño? _____ Litros
- 14.- Esta cabra ¿ha tenido algún aborto? 1() Sí 2() No 3() No sabe
- 15.- ¿Cuándo fue su último parto? _____
- 16.- ¿Cuándo la cargo el macho o fue inseminada por última vez? _____
- 17.- Si es un SEMENTAL, ¿Este animal lo ha prestado a otros productores?**
- 1() Si 2() No 3() No sabe

SR. GANADERO AGRADECEMOS SU COOPERACIÓN.

ANEXO 3. Reactivos requeridos para el desarrollo de la prueba del ELISA

- Suspensión de *Mycobacterium phlei*
5g de *M. phlei*
Solución salina al 8.5% (NaCl 8.5%) c.b.p.11
- Buffer de carbonatos
5.3 g de bicarbonato de sodio (Na₂CO₃)
Agua destilada c.b.p. 11
Ajustar el pH a 9.6
- Conjugado
Diluir 1:4000 el anticuerpo anti IgG caprino en PBS
- PBS 0.15M pH 7.2
8 g de Cloruro de sodio (NaCl)
0.2 g de Cloruro de potasio (KCl)
1.44 g de Fosfato dibásico de potasio (Na₂HPO₄)
0.24 g de Fosfato monobásico de potasio (KH₂PO₄)
1000 ml de Agua destilada
- Solución de Bloqueo al 1%
1 g de Albumina sérica bovina
100 ml de agua destilada
- Solución de lavado PBS Tween 20 pH 7.4
8 g de Cloruro de sodio
0.2 g de Cloruro de Potasio
1.44 g de Fosfato dibásico de potasio (Na₂HPO₄)
0.24 g de Fosfato monobásico de potasio (KH₂PO₄)
500 µl de Tween 20
1000 ml de Agua destilada

ANEXO 4. Protocolo para el desarrollo del ELISA

Fijación del antígeno en las placas

1. El antígeno MAP 3065 se utiliza a una concentración de 0.04 mg/ml.

El antígeno se diluye en 2.5 ml de PBS estéril para una concentración de 4 mg/ml y posteriormente se hace una dilución 1:100 con buffer de carbonatos (pH 9.6).

2. Se agregan 100 µl de antígeno diluido en cada pozo de las microplacas de 96 pozos.

Nota: Utilizar un recipiente estéril para tomar el antígeno con la pipeta multicanal.

3. Se cubren las placas con parafilm y se colocan en agitación durante 5 minutos.
4. Se meten las placas tapadas en el refrigerador a 4°C durante toda la noche.
5. Al día siguiente, se descarta el líquido de las placas y se realizan 4 lavados con PBS-Tween (PBS-T).
6. Se agregan 100 µl /pozo de solución de albúmina al 1% preparada al momento.

La albúmina se diluye en agua destilada estéril.

7. Se cubren las placas con aluminio y se meten a la estufa a 37°C durante 1 h.
8. Se descarta el líquido y se realizan 4 lavados con PBS-T.
9. Se secan las placas, se cubren con parafilm y se introducen en una bolsa de plástico al congelador donde se mantienen hasta su uso.

ELISA

1. En una hoja de registro se anota el orden en el que se van a depositar las muestras.
2. Se depositan 640 µl de la solución de *M. phlei* en el fondo de cada pozo de las placas de almacenamiento o tubos tipo eppendorf.
3. Se agregan 2 µl de suero y 1 µl de cada control (positivo y negativo), de acuerdo al orden descrito en la hoja de registro.
4. Se colocan las placas en el agitador orbital y se dejan durante 5 min.
5. Las placas de almacenamiento o los tubos de 1.5 ml con los sueros preadsorbidos, se introducen al refrigerador hasta su uso.
6. Se depositan de manera pareada 100 µl de cada suero diluido en una placa de ELISA con el antígeno previamente fijado.
7. Se cubren las placas y se dejan incubando 30 min, a temperatura ambiente y en agitación.

8. Se descarta el líquido y se realizan 4 lavados con 300 µl de PBS-Tween.
9. Se depositan 100 µl/pozo del conjugado específico (anti IgG caprina o bovina) diluido 1:4000 en PBS atemperado.
10. Se cubren las placas y se dejan incubando 30 min, a temperatura ambiente y en agitación.
11. Se descarta el líquido y se realizan 4 lavados con PBS-Tween.
12. Se depositan 100 µl/pozo de ABTS atemperado (sustrato de la enzima).
13. Se cubren las placas y se dejan incubando 28 min, a temperatura ambiente y en agitación.
14. Las placas se leen en el espectrofotómetro de 8 canales, usando el filtro de 650 nm.
15. Para la interpretación de resultados se promedia la densidad óptica de la repetición de los controles positivos, negativos y las muestras.

NOTA:

Verificar que el promedio densidad óptica control positivo debe ser 3 veces mayor al de los controles negativos.

ANEXO 5. Reactivos requeridos para extracción de ADN a partir de heces

- Acetato de amonio 7.5 M pH 6.3

07.225 g de Acetato de amonio

12.5 ml de agua destilada

- TE-Tritón 100X

3.025 ml de Tris HCl 1M pH8

0.7445 g de EDTA

1 ml de Tritón 100X

46.9 ml de agua destilada

- Isotiocinato de guanidina 5M

29.54 g de Isotiocinato de guanidina

50 ml de agua destilada

- PBS

8.5 g de Cloruro de sodio (NaCl)

1.1 g de Fosfato de sódio dibásico

0.32 g de Fosfato monobásico de potasio (KH₂PO₄)

1000 ml de Agua destilada

ANEXO 6. Extracción a partir de heces

1. Con un abate lenguas nuevo se toman 2 g de cada muestra de heces y se colocan en el fondo de un tubo de 50 ml, se disuelven en HPC 0.75% c.b.p. 45 ml, se agitan los tubos durante una hora en el agitador orbital y se dejan toda la noche a temperatura ambiente (TA).
2. Al día siguiente, se toman 20 ml del sobrenadante (tomando un poco de la fase intermedia), las muestras se centrifugan a 2,500 rpm/10 min.
3. Se descarta el sobrenadante en un frasco para desechos y la pastilla se lava con 5-10 ml de PBS estéril, se centrifuga a 2,500 rpm/10 min y se descarta el sobrenadante.
4. Se realizan 2 lavados más con PBS, siguiendo la metodología descrita en el punto número 3 (En total son 3 lavados).
5. Se resuspende la pastilla en 1.5 ml de PBS y se transfiere a un tubo tipo eppendorf de 2 ml, se centrifuga 5 min a 14,000 rpm y se elimina el sobrenadante.
6. Se resuspende la pastilla en 500 µl de TE-triton x100 y se transfiere a un criotubo.
7. Se colocan las muestras en nitrógeno líquido durante 5 min y enseguida en calor seco a 100 °C/5 min (Repetir 3 veces)
8. Añadir a cada muestra 450 µl de isotiocianato de guanidina 5 M y 250 µl de acetato de amonio 6.3 pM, mezclar por inversión varias veces y mantener en hielo durante 15 min.
9. Añadir 500 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), mezclar 10 s y centrifugar 5 min a 14,000 rpm.
10. Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo y añadir nuevamente 500 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), mezclar 10 s y centrifugar 5 min a 14,000 rpm.
11. Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo, agregar 450 µl de isopropanol y colocar a -20 °C toda la noche
12. Centrifugar 5 min a 14,000 rpm y eliminar el sobrenadante.
13. Realizar dos lavados con 1 ml de etanol al 70%, mezclar y centrifugar 1 min
14. Eliminar el sobrenadante y dejar secar la pastilla a TA.
15. Resuspender en 100 µl de agua destilada estéril o agua inyectable.

ANEXO 7. Preparación del medio de Herrold con yema de huevo adicionado con micobactina

- 9 g de Peptona
- 4.5 g de Cloruro de sodio (NaCl)
- 15.3 g de Agar Noble
- 2.7 g de Extracto de carne
- 27 ml de Glicerina
- 870 ml de Agua destilada
- 1 ml Verde de malaquita al 2% estéril
- 6 piezas de Huevo
- Un vial de 2 mg de Micobactina disuelto en 4 ml de etanol absoluto

Lavar los huevos, secarlos y ponerlos en alcohol isopropílico al 75%, por lo menos durante 15 min antes de utilizarlos.

1. Mezclar en un matraz los primeros seis ingredientes de la lista. (el verde de malaquita se coloca hasta que el extracto de carne se disuelva por completo.
2. Colocar la micobactina
3. Esterilizar toda la mezcla durante 25 min a 121°C
4. Dejar enfriar a 56°C
5. Secar los huevos, colocarlos en un vaso de licuadora previamente estéril, licuarlos y agregarlos a los demás ingredientes utilizando una gasa para colarlos y un embudo.
6. Servir en tubos de vidrio con tapón de rosca (Payeur *et al*, 1993).

ANEXO 8. Tinción de Ziehl Neelsen

1. Realizar un frotis de la colonia bacteriana sospechosa.
2. Fijar con calor (3 pases rápidos en mechero) o con alcohol.
3. Recortar un pedazo de papel filtro o papel absorbente de manera que cubra el frotis pero sea más pequeño que la laminilla.
4. Empapar con fucsina fenicada y se coloca la laminilla sobre una platina caliente, cuando se comienza a observar el desprendimiento de vapores se cuentan 5 min durante los cuales constantemente debe agregarse más fucsina fenicada de manera que el papel no se seque.
5. Se deja enfriar la laminilla.
6. Lavar con agua corriente protegiendo del chorro directo.
7. Agregar colorante de contraste (verde de malaquita) y esperar 1 minuto.
8. Lavar con agua corriente protegiendo del chorro directo.
9. Dejar secar sobre papel absorbente.
10. Observar en el microscopio a un aumento de 100x, utilizando aceite de inmersión (Payuer *et al*, 1993).

Las bacterias ácido alcohol resistentes (ZN +) se observan de color rosa y las ZN – se observan del color del colorante de contraste.

Preparación de reactivos

Fucsina fenicada:

- 0.5 g de fucsina básica
- 50 ml de agua destilada
- 5 ml de etanol absoluto

Alcohol acido:

- Alcohol al 70%
- 1% de ácido clorhídrico

12. REFERENCIAS

- Alinovi CA, Wu CC, Lin TL. In utero *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection of a pygmy goat. *Vet Rec.* 2009; 164 (9):276-277.
- Aller B, Fernández DM, Escudero DA. Paratuberculosis ovina. En: Suplemento Científico del Consejo General de Colegios Veterinarios de España. 1973; 196:11-18.
- Arbiza ASI. Los caprinos en México. En Producción de caprinos. Cap 2. Editor S. I. Arbiza. México 1989:47-75
- Arbiza AS y De Lucas TJ. Lana, producción y características. *Colección Ciencias y Técnicas.* N° 34. Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, Estado de México. 1997:205-208.
- Beard PM, Henderson D, Daniels MJ, Pirie A, Buxton D, Greig A, *et al.* Evidence of paratuberculosis in fox (*Vulpes vulpes*) and stoat (*Mustela erminea*). *Vet. Rec.* 1999; 145:612-613.
- Beard PM, Daniels MJ, Henderson D, Pirie A, Rudge K, Buxton D, *et al.* Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39:1517-1521.
- Bendixen PH, Bloch B, Jorgensen JB. Lack of intracellular degradation of *Mycobacterium paratuberculosis* by bovine macrophages infected in vitro and in vivo: light microscopic and electron microscopic observations. *Am. J. Vet. Res.* 1981; 42:109-113.
- Benedictus G, Dijkhuizen AA, Stelwagen J. Economic losses due to paratuberculosis in dairy cattle. *Vet. Rec.* 1987; 121:142-146.
- Brotherston JB, Gilmour NJL, Mc Samuel J. Quantitative studies of *Mycobacterium johnei* in the tissues of sheep. *J. Comp. Pathol.* 1961; 71:286-299.
- Chacon O, Bermudez LE y Barletta RG. Johne's disease, inflammatory bowel disease and *Mycobacterium paratuberculosis*. *Ann Rev Microbiol* 2004; 58:329-263.
- Chiodini RJ, Van Kruiningen HJ, Merkal RS. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. *Cornell Vet.* 1984; 74:218-262.

- Clarke CJ. The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *J. Comp. Pathol.* 1997; 116:217-261.
- Cocito C, Gilot P, Coene M, de Kesel M, Poupart P, Vannuffel P. Paratuberculosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 1994; 7, 328-345.
- Collins CH, Grange JM and Yates MD. Mycobacteria in water. *J Appl Bacteriol* 1984; 57:193-211.
- Collins MT, Sockett DC. Accuracy and economics of the USDA-licensed enzyme-linked immunosorbent assay for bovine paratuberculosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1993; 203:1456-1463.
- Collins MT, Sockett DC, Goodger WJ, Conrad TA, Thomas CB, Carr DJ. Herd prevalence and geographic distribution of, and risk factors for, bovine paratuberculosis in Wisconsin. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1994; 204:636-641.
- Collins MT. Diagnosis of paratuberculosis, *The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice.* Saunders, Philadelphia. 1996; 12:2.
- Condrón R. En: Abstracts of the IDF Brainstorming Session on *Mycobacterium paratuberculosis*. Bruselas, Bélgica. 1999; 4.
- Corpa JM, García MJF, Pérez V. Evolución de la respuesta inmune frente a paratuberculosis en ganado ovino y caprino según edad de vacunación. *Producción Ovina y Caprina XXIII*, 1998; 283-286.
- Daniels MJ, Ball N, Hutchings MR, Greig A. The grazing response of cattle to pasture contaminated with rabbit faeces and the implications for the transmission of paratuberculosis. *Vet. J.* 2001; 161:306-313.
- Daniels MJ, Hutchings MR, Allcroft DJ, McKendrick J, Greig A. Risk factors for Johne's disease in Scotland--the results of a survey of farmers. *Vet. Rec.* 2002; 150:135-139.
- De Juan L, Alvarez J, Romero B, Bezos J, Castellanos E, Aranaz A, *et al.* Comparison of four different cultura media for isolation and growth of type II and type I/III

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* strains isolated from cattle and goats. Appl Environ Microbiol. 2006; 72(9):5927-5932.

- Díaz AE. Enfermedades y manejo sanitario del ganado caprino. Memorias de la Expo-feria caprina del Valle Central de Puebla; 2011 Julio 16-17; Libres (Puebla) México.
- Dimareli-Malli Z, Sarris K. Comparison of DNA probe test and cultivation methods for detection of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in caprine and ovine faeces. Aust Vet J. 2001; 79(1):47-50.
- Dimareli-Malli Z, Stevenson K, Sarris K, Sossidou K. Study of microbiological and molecular typing aspects of *paratuberculosis* in sheep and goats in Northern Greece. Transbound Emerg Dis. 2009 Aug; (56):285-290.
- Duerksen DR. Crohn's disease: The role of nutrition support Medscape Gastroenterology 2000.
- Eamens GJ, Walker DM, Porter NS, Fell SA. Pooled faecal culture for the detection of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in goats. Aust Vet J. 2007 Jun; 85(6):243-251.
- Eda S, Bannantine JP, Waters WR, Mori Y, Whitlock RH, Scott MC, *et al.* A Highly Sensitive and Subspecies-Specific Surface Antigen Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Johne's Disease. Clinical and vaccine Immunology 2006; 13(8):837-844.
- Erume J, Spengler J, Rosengarten R. Rapid detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from cattle and zoo animals by Nested PCR. Afr Health Sci 2001; 1: 83-89
- Estévez DI, Hernández CR, Trujillo GAM, Chávez GG. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in goats and sheep flocks in Mexico. Small Rumin Res 2006,doi:10.1016/j.smallrumres.2006.10.017 falta en texto
- Eveleth DF, Gifford R. Johne's disease in farm animals. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1943; 102: 27-32.

- Favila HL, Guzmán RCC, Santillan FMA, Díaz AE, Córdoba LD, Martínez CAG, *et al.* Estudio epidemiológico de la paratuberculosis caprina en Guanajuato Puebla y Oaxaca (resultados preliminares). Memorias de la XLV Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. 2009. Saltillo (Coahuila) México.
- Fodstad E, Gunnarsson E. Post-mortem examination in the diagnosis of Johne`s disease in goats. *Acta Veterinaria Scandinavica* 1979; 20:157-167.
- Fuentelsaz GC. Cálculo del tamaño de muestra Enfermera de investigación. Hospital Universitario Matronas Profesión (Vall d`Hebron) Barcelona. 2004:5:18.
- Fuentes H, Garmendia G, González MH, Jiménez ML E, Mascorro EV. Bonanza y crisis de la ganadería nacional: Una visión integral de la actividad agropecuaria en México. Subdirección de investigación. Departamento de Diagnóstico Externo. Universidad Autónoma Chapingo, México. 1989: 349.
- Garrido F, León L. Diagnóstico de la paratuberculosis caprina en Andalucía. En: VII Congreso Nacional de Microbiología. Sociedad Española de Microbiología. Cádiz, España. 1979: 321.
- Garrity, GM. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Segunda edición del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Segunda edición. Springer 2001 (volumen 1).
- Gurría TF. La Caprinocultura en México: Consideraciones Generales memorias del curso de producción caprina; 2011 Mayo 8–10; FES Cuautitlán (UNAM) México.
- Guzmán RCC, Santillán FMA, Córdoba LD, Favila HLC, Díaz AE, Martínez CAG, *et al.* Paratuberculosis caprina en rebaños intensivos del estado de Guanajuato. Memorias del XXXIV Congreso Nacional de Buiatría. 2010. CINTERMEX Monterrey (Nuevo León) México.
- Guzmán RCC, Santillán FMA, Morales AJ, Jorge RJM. Aplicación del PPD aviar en el diagnóstico de la paratuberculosis caprina. Memorias de XLVI Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. 2010. Campeche (Campeche) México.
- Green EP, Tizard ML, Moss MT, Thompson J, Winterbourne DJ, McFadden JJ, *et al.* Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's

disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. Nucleic Acids Res. 1989; 17:9063-9073.

- Greig A, Stevenson K, Henderson D, Perez V, Hughes V, Pavlik I, *et al.* Epidemiological study of paratuberculosis in wild rabbits in Scotland. J. Clin.Microbiol. 1999; 37:1746-1751.
- Hagan WA. Age as a factor in susceptibility to Johne's disease. Cornell Vet. 1938: 28-34.
- Harris NB, Bartetta RG. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in veterinary medicine. Clin Microbiol Rev. 2001; 14:489-512.
- Hernández JS, Rodero E, Herrera M, Delgado JV, Barba C, Sierra A. La caprinocultura en la Mixteca Poblana (México). Descripción e identificación de factores limitantes. Archivos de Zootecnia 2001; 50: 231-239.
- Hernández AM. Epidemiología Diseño y análisis de estudios. Instituto Nacional de Salud Pública. 1ª reimpresión México: Editorial Médica Panamericana 2009.
- INEGI, México 1987.Síntesis Geográfica Nomenclátor y Anexo Cartográfico del estado de Puebla. Aguascalientes, Ags., México, 56 p.
- INEGI, México 1998. La ganadería familiar en México. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática-Colegio de Postgraduados, México. Aguascalientes, Ags. 92 pp
- Jorge RJM, Guzmán RCC, López DCA, Santillan FMA, Valencia PM, Díaz AE, *et al.* Impacto económico de la paratuberculosis caprina en explotaciones lecheras del estado de Guanajuato. En La ganadería ante el agotamiento de los paradigmas dominantes Universidad Autónoma de Chapingo. 2011 Vol.2 pp 348-358
- Juste RA, L.A. C, Gelabert JL, Sáez de Ocariz C, Marco JC, Camon J. Paratuberculosis bovina en Vizcaya. Hyg. Pec. 1983; 5: 57-66.
- Juste RA. Paratuberculosis: Revisión. Medicina Veterinaria 1984:1 (4)

- Juste RA, Badiola JJ, Arnal MC, Balaguer L, García Marín JF, Sáez de Ocariz C, *et al.* A survey of ovine paratuberculosis in Aragon (Spain) by different methods. *Paratuberc. Newslett.* 1991; 3: 3-4.
- Juste RA, Adúriz G, Sáez de Ocariz C, Marco JC, Cuervo L. Paratuberculosis in sheep flocks. Epidemiological aspects. En: *Proceedings of the Third International Colloquium on Paratuberculosis.* Chiodini, R.J., Kreeger, J. Ed. Orlando, EEUU. 1992; 424-427.
- Juste RA. Johne's disease. A review of current knowledge. En: *Proceedings of the Fourth International Congress for Sheep Veterinarians.* Australian Sheep Veterinary Society. Allworth, B. Ed. New South Wales, Australia 1997:140-150.
- Juste RA, Garrido JM, Aduriz G. El agente causal de la paratuberculosis y su situación taxonómica. 2000; 93: 13-28.
- Kennedy DJ, Benedictus G. Control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in agricultural species. *Rev. Sci. Tech.* 2001; 20:151-179.
- Kirkwood CD, Wagner J, Boniface K, Vaughan J, Michalski WP, Catto-Smith AG, Cameron DJ, Bishop RF. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in children with early-onset Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2009; 11:1643-1655.
- Kluge JP, Merkal RS, Monlux WS, Larsen AB, Kopecky KE, Ramsey FK, *et al.* Experimental paratuberculosis in sheep after oral, intratracheal, or intravenous inoculation: lesions and demonstration of etiologic agent. *Am. J. Vet. Res.* 1968; 29:953-962.
- Koets AP, Adugna G, Janss LL, Van Weering HJ, Kalis CH, Wentink GH, *et al.* *J Dairy Sci.* 2000;83(11):2702-2708
- Kopecky, K.E., Larsen, A.B. Intravenous johnin and tuberculin tests in cattle vaccinated with *Mycobacterium paratuberculosis* cells and subsequently inoculated with *Mycobacterium bovis*. *Am. J. Vet. Res.* 1975; 36: 1727-1729.
- Kruze J, Salgado M, Collins MT. Paratuberculosis en rebaños caprinos chilenos. Instituto de Microbiología, Facultad de Ciencias Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile. *Arch. Med. Vet.* 2007; 39:147-152.

- Larsen AB, Merkal RS, Vardaman TH. Survival time of *Mycobacterium paratuberculosis*. Am. J. Vet. Res. 1956; 549-551.
- Larsen AB, Moon HW, Merkal RS. Susceptibility of swine to *Mycobacterium paratuberculosis*. Am. J. Vet. Res. 1971. 32: 589-595.
- Larsen AB, Moon HW, Merkal R.S. Susceptibility of horses to *Mycobacterium paratuberculosis*. Am. J. Vet. Res. 1972; 33: 2185-2189.
- Larsen AB. Johne's disease: immunization and diagnosis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1973; 163: 902-904.
- Larsen AB, Merkal RS, Cutlip RC. Age of cattle as related to resistance to infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. Am. J. Vet. Res. 1975; 36: 255-257.
- Larsen AB, Stalheim OH, Hughes DE, Appell LH, Richards WD, Himes EM. *Mycobacterium paratuberculosis* in the semen and genital organs of a semen-donor bull. J. Am. Med. Assoc. 1981; 179: 169-171.
- Lee A, Griffiths TA, Parab RS, King RK, Dubinsky MC, Urbanski SJ, Wrobel I, *et al*. Association of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* With Crohn Disease in pediatric patients. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2011; 2:170-174.
- Lepper AW, Embury DH, Anderson DA, Lewis VM. Res Vet Sci. 1989; 46(3):289-296.
- Levy-Frebault VV, Portaels F. Proposed minimal standards for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium* species. Int. J. Syst. Bacteriol. 1992; 42:315-323.
- Mainar-Jaime RC, Vázquez-Boland JA. Factors associated with seroprevalence to *Mycobacterium paratuberculosis* in small-ruminant farms in the Madrid region (Spain). Prev. Vet. Med. 1998; 34:317-327.
- Manning EJ, Collins MT. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis. Rev. Sci. Tech. 2001; 20:133-150.
- Martínez CA. Desarrollo de una ELISA para el Diagnostico de paratuberculosis en bovinos (tesis de licenciatura). DF (Ciudad de México) México: FMVZ-UNAM, 2009.

- Mateos PA. Nueva lista de enfermedades de la OIE y sistema internacional de notificación de enfermedades. [citado 2011 mayo 7] Disponible en: <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/departamentos/rumiantes/bovinotecnia/BtRgCliG009.pdf>
- McFadden JJ, Butcher PD, Thompson J, Chiodini R, Hermon-Taylor J. The use of DNA probes identifying restriction-fragment-length polymorphisms to examine the *Mycobacterium avium* complex. Mol. Microbiol. 1987; 1:283-291.
- Mellado M. La cabra criolla en América Latina. Vet. Méx.1997; 28: 333-343.
- Mendoza JL, Lana R, Díaz-Rubio M. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and its relationship with Crohn's disease. World J Gastroenterol. 2009 Jan; (4):417-422.
- Mercier P, Baudry C, Beaudeau F, Seegers H, Malher X. Estimated prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in herds of dairy goats in France. Vet Rec. 2010 Sep; (11):412-415.
- Merkal RS, Kluge JP, Monlux WS, Larsen AB, Kopecky KE, Quinn LY, *et al.* Experimental paratuberculosis in sheep after oral, intratracheal, or intravenous inoculation: histochemical localization of hydrolase activities. Am. J. Vet. Res. 1968; 29:985-994.
- Merkal RS, Larsen AB, Kopecky KE, Kluge JP, Monlux WS, Lehmann RP, Quinn LY. Experimental paratuberculosis in sheep after oral, intratracheal, or intravenous inoculation: serologic and intradermal tests. Am. J. Vet. Res. 1968b; 29: 963-969.
- Merkal RS, Curran BJ. Growth and metabolic characteristics of *Mycobacterium paratuberculosis*. Appl Microbiol. 1974; 28(2):276-279.
- Merkal RS. Paratuberculosis: advances in cultural, serologic, and vaccination methods. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1984; 184:939-943.
- Miranda BMV. Evaluación del impacto económico de la paratuberculosis en Ganado bovino lechero (sistema intensivo), en el complejo agropecuario industrial Tizayuca, Hidalgo México (tesis de maestría). DF (Ciudad de México) México: FMVZ UNAM, 2005.

- Molina A, Morera L, Llanes D. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Mycobacterium paratuberculosis* in goats. *Am. J. Vet. Res.* 1991; 52:863-868.
- Munjal SK, Boehmer J, Beyersbach M, Strutzberg-Minder K, Homuth M. Evaluation of a LAM ELISA for diagnosis of paratuberculosis in sheep and goats. *Vet Microbiol.* 2004 Oct; (2):107-114.
- Navarro JA, Ramis G, Seva J, Pallares FJ, Sanchez J. Changes in lymphocyte subsets in the intestine and mesenteric lymph nodes in caprine paratuberculosis. *J. Comp. Pathol.* 1998; 118:109-121.
- Nielsen SS and Toft N. Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: a review of accuracies of ELISA, interferon-gamma assay and faecal culture techniques. *Vet. Microbiology* 2008; 129:217-235.
- Nielsen SS and Toft N. A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. *Prev Vet Med.* 2009 Jan; 88(1):1-14.
- Nordlund KV, Goodger WJ, Peletier J, Collins, MT. Associations between subclinical paratuberculosis and milk production, milk components, and somatic cell counts in dairy herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1996; 208:1872-1876.
- Ott SL, Wells SJ, Wagner BA. Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. *Prev. Vet. Med.* 1999; 40:179-192.
- Paolicchii FA, Zumarraga MJ, Gioffre A, Zamorano P, Morsella C, Verna A, *et al.* Application of different methods for the diagnosis of paratuberculosis in a dairy cattle herd in Argentina. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2003; 50(1):20-26.
- Patterson DS, Alien WM, Lloyd MK. Clinical Johne's as a protein losing enteropathy. *Vet. Rec* 1967; 81:717-718.
- Payne JM, Rankin JD. The pathogenesis of experimental Johne's disease in calves. *Res. Vet. Sci.* 1961; 2: 167-174.

- Payuer JB, Jarnagin JL, Marquardt JG, Schaper LA, Martin BM. Laboratory methods in veterinary mycobacteriology for the isolation and identification of mycobacteria. National Veterinary Service Laboratories Veterinary Services Animal and Plant Health Inspection Service United State Department of Agriculture. Ames, Iowa. 1993.
- Pérez V, García Marín JF, Badiola JJ. Description and classification of different types of lesión associated with natural paratuberculosis infection in sheep. *J. Comp. Pathol.* 1996; 114: 107-122.
- Pérez V, Corpa JM, García Marín JF. El Cuadro clínico y lesional de la paratuberculosis bovina. *Bovis* 2000; 93:39-47.
- Rmales JC, Hernández ZJS, Herrera M, Rodero E, Sierra AC, Delgado JV, Aguilar BML. Identificación de limitantes al desarrollo de la caprinocultura en la Mixteca poblana, México: El caso de Atexcal. *Memorias del XVI Congraso Panamericano de Ciencias Veterinarias* 1998. Santa Cruz de la Sierra, Bolivia.
- Reviriego FJ, Moreno MA, Domínguez L. Soil type as a putative risk factor of ovine and caprine paratuberculosis seropositivity in Spain. *Prev. Vet. Med.* 2000; 43: 43-51.
- Ris D, Weaver A. Natural transmission of Johne's disease to feral goats. *NZ Vet J.* 1988; 36-98.
- Rice CE, Carriere J. Studies of changes in serum proteins in cows and calves in a herd affected with Johne's disease. *Res. Vet. Sci.* 1969; 10:188-196.
- Rogan WJ and Gladen B. Estimating prevalence from the results of screening test. *American Journal of Epidemiology* 1978; 10:71-76.
- Salgado M, Manning EJ, Collins MT. Performance of a Johne's disease enzyme-linked immunosorbent assay adapted for milk samples from goats. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2005; 17:350-354.
- Saxegaard F, Fodstad FH. Control de paratuberculosis (Johne's disease) in goats by vaccination. *Vet Rec* 1985; 20:439-441.

- Saxegaard F. Experimental infection of calves with an apparently specific goat- pathogenic strain of *Mycobacterium paratuberculosis*. J. Comp. Pathol. 1990; 102: 149-156.
- Scott PR, Clarke CJ, King TJ. Serum protein concentrations in clinical cases of ovineparatuberculosis (Johne's disease). Vet. Rec. 1995; 137-173.
- Seaman, JT, Thompson DR. Johne's disease in sheep. Aust. Vet. J. 1984; 61: 227-229.
- Seitz SE, Heider LE, Heuston WD, Bech-Nielsen S, Rings DM, Spangler L. Bovine fetal infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1989; 194: 1423-1426.
- Sevilla AI. Caracterización molecular Detección y resistencia de *Mycobacterium avium* subespecies *paratuberculosis* (Tesis de doctorado). Victoria- Gasteiz (País Vasco). Universidad del País Vasco. 2007.
- SIACON. Sistema de Información Agroalimentaria de Consulta. c 2008-(citado 2008 Oct 8). Disponible en:
http://www.campomexicano.gob.mx/portal_siap/Integracion/EstadisticaBasica/Pecuario/PoblacionGanadera/EstadoRegion/puepob.pdf
- Sigurdardottir OG, Press CM, Saxegaard F, Evensen O. Bacterial isolation, immunological response, and histopathological lesions during the early subclinical phase of experimental infection of goats kids with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Vet. Pathol. 1999; 36: 542-550.
- Sigurethardóttir OG, Valheim M, Press CM. Establishment of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* infection in the intestine of ruminants. Adv Drug Deliv Rev. 2004; 566: 819-834.
- Sohal JS, Singh SV, Tyagi P, Subhodh S, Singh PK, Singh AV, Narayanasamy K, Sheoran N, Singh Sandhu K. Immunology of mycobacterial infections: with special reference to *Mycobacterium avium* subespecies *paratuberculosis*. Immunobiology Epub. 2008; 213(7):585-598.
- Speer CA, Scott MC, Bannantine JP, Waters WR, Mori Y, Whitlock RH, *et al.* A novel Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for diagnosis of *Mycobacterium avium* subsp.

Paratuberculosis infections (Johne's Disease) in Cattle. *Clinical and vaccine immunology* 2006; 13(5):535-540.

- Stabel JR. Johne's disease: a hidden threat. *J. Dairy Sci.* 1998; 81:283-288
- Stabel JR, Palmer MV, Harris B, Plattner B, Hostetter J, Robbe-Austerman S. Pathogenesis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in neonatal calves after oral or intraperitoneal experimental infection. *Vet Microbiol.* 2009; 136(12):306-313.
- Stehman SM. Paratuberculosis in small ruminants, deer, and South American camelids. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 1996; 12:441-455
- St-Jean G, Jernigan AD. Treatment of *Mycobacterium paratuberculosis* infection in ruminants. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 1991; 7:793-804.
- Streeter RN, Hoffsis GF, Bech-Nielsen S, Shulaw WP, Rings DM. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows. *Am. J. Vet. Res.* 1995; 56: 1322-1324.
- Sweeney RW, Whitlock RH, Rosenberger AE. *Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. *J. Clin. Microbiol.* 1992a; 30:166-171.
- Sweeney RW, Whitlock RH, Rosenberger AE. *Mycobacterium paratuberculosis* isolated from fetuses of infected cows not manifesting signs of the disease. *Am. J. Vet. Res.* 1992b; 53:477-480.
- Sweeney RW. Transmission of paratuberculosis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 1996; 12:305-312.
- Taylor TK., Wilks CR, McQueen DS. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from the milk of a cow with Johne's disease. *Vet. Rec.* 1981; 109:532-533.
- Tanaka S, Sato M, Taniguchi T, Yokomizo Y. Relationship of acid phosphatase activity to ultrastructural features in mice inoculated with *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Comp. Pathol.* 1996; 114: 81-91.

- Tharaldsen J, Djonne B, Fredriksen B, Nyberg O, Siguroardottir O. The National Paratuberculosis Program in Norway. *Acta Vet. Scand.* 2003; 44: 243-246.
- Thomas G.W. Paratuberculosis in a large goat herd. *Vet. Rec.* 1983; 113:464-466.
- Thorel MF, Krichevsky M, Levy-Frebault VV. Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1990; 40:254-260.
- Timms JV, Gehringer MM, Mitchell MH, Daskalopoulos G, Neilan AB. 2011. How accurately can we *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection? *Journal of Microbiological Methods* 2011; 85:1-8.
- Toledo OA, Favila HLC, Diaz AE, Santillan FMA, Lopez CD, Isidro RLM, Pastor LFJ. Seroprevalencia de paratuberculosis caprina en la Región Lagunera: resultados preliminares. Memorias de XLVI Reunión Nacional de Investigación Pecuaria 2010. Campeche (Campeche) México.
- Tooker BC, Burton JL, Coussens PM. Survival tactics of *M. paratuberculosis* in bovine macrophage cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2002; 87: 429-437.
- Villalobos SI. Estudio epidemiológico de brucelosis y paratuberculosis caprina en la costa chica de Guerrero (tesis de licenciatura). DF (Ciudad de México) México: FMVZ UNAM, 2011.
- West G, Agobo M, Willeberg P, Ruppanner R, Aalund O, Behymer D. Paratuberculosis in California dairy goats. *Calif Vet.* 1979; 33:28-31.
- Whitlock RH, Buergelt C. Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 1996; 12:345-356.
- Whittington RJ, Reddacliff LA, Marsh I, McAllister S, Saunders V. Temporal patterns and quantification of excretion of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in sheep with Johne's disease. *Aust. Vet. J.* 2000; 78:34-37.

- Whittington RJ, Sergeant ES. Progress towards understanding the spread, detection and control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in animal populations. *Aust Vet J.* 2001; 79(4):267-278.
- Whittington RJ, Taragel CA, Ottaway S, Marsh I, Seaman J, Fridriksdottir V. Molecular epidemiological confirmation and circumstances of occurrence of sheep (S) strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cases of paratuberculosis in cattle in Australia and sheep and cattle in Iceland. *Vet Microbiol.* 2001; 79(4):311-322.
- Whittington RJ, Marshall DJ, Nicholls PJ, Marsh IB, Reddacliff LA. Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment. *Appl Environ Microbiol.* 2004; 70(5):2989-3004.
- Whittington RJ, Marsh IB, Reddacliff LA. Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dam water and sediment. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71(9):5304-5308.
- Windsor P, Eppleston J, Whittington R, Jones S, Britton A. Efficacy of a killed *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* vaccine for the control of OJD in Australian sheep flocks. En: *Proceedings of the Seventh International Colloquium on Paratuberculosis.* Juste, R.A., Geijo, M.V., Garrido, J.M. Eds. Bilbao, España. 2002:420-423.
- Yayo W, Macháckova and Pavlik I. The transmission and impact of paratuberculosis infection in domestic and wild ruminants. *Vet Med.* 2001; 46:205-224.
- Yokomizo Y, Yugi H, Merkal RS. A Method for Avoiding False- Positive Reactions in a Enzyme- Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for diagnosis of bovine paratuberculosis. *Japanese Society of Veterinary Science* 1985; 47(1):111-119.
- Zurbrick BG, Czuprynski CJ. Ingestion and intracellular growth of *Mycobacterium paratuberculosis* within bovine blood monocytes and monocyte-derived macrophages. *Infect. Immun.* 1987; 55:1588-1593.