



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Situación de la Paratuberculosis en el Área de Bovinos Lecheros y de Ciervos en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano (CEIEPAA). Propuestas de control.

TESIS DE LINCECIATURA

Para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA.

Presentada por:

LÓPEZ YURAME JACQUELINNE.

Asesor:

MVZ. DR. GILBERTO CHÁVEZ GRIS



México, D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

CONTENIDO

Resumen	5
Agradecimientos	6
Dedicatorias	7
1.-Introducción.....	8
1.1.-Antecedentes Históricos.....	10
1.2.-Distribución de la Paratuberculosis en México.....	10
1.3.-Control.....	11
1.4.-Relación entre Paratuberculosis y Enfermedad de Crohn.....	14
1.4.1.-Enfermedad de Crohn.....	14
1.5.-Cultivos y sus Características.....	16
1.6.- <i>Mycobacteria Avium sub. Paratuberculosis</i> y su Dependencia a la Micobactina.....	17
1.7.-Aspectos Generales Sobre Prevalencia e Incidencia.....	17
1.8.-Descripción del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano(CEIEPAA).....	18
1.8.1.-Sistema de Producción.....	18
2.-Justificación.....	20
3.-Objetivo General.....	21
3.1.-Objetivos Específicos.....	21
4.-Hipótesis.....	22
5.-Material y Métodos.....	23

5.1.-Origen de las Muestras.....	23
5.1.1.-Descripción de la Procedencia de las Muestras.....	23
5.2.-Colección y Toma de Muestras para Estudios Serológicos.....	23
5.2.1.-Bovinos Lecheros.....	23
5.2.2.-Ciervos Rojos.....	23
5.3.- Colección y Toma de Muestras para Estudios Bacteriológicos.....	24
5.4.- Colección y Toma de Muestras para Estudios de Biología Molecular.....	24
5.5.-Ejecución de Pruebas.....	26
5.5.1.-ELISA (Inmunoensayo Enzimático).....	26
5.5.2.-Protocolo de PCR a partir de Leche (filtros).....	27
5.5.3.-Ziehl-Neelsen (ZN).....	29
5.5.4.-Aislamiento Bacteriano a Partir de Heces.....	29
5.6.-Encuestas.....	30
6.- Resultados.....	31
6.1.-Estudios Serológicos (ELISA).....	31
6.1.1.-Bovinos de Leche.....	31
6.1.2.-Ciervos.....	34
6.2.-Estudios Bacteriológicos.....	37
6.2.1.-Ziehl Neelsen ZN.....	37
6.2.2.- Cultivos Bacterianos	37
6.3.- Biología Molecular	38
6.3.1. Reacción en cadena de Polimerasa PCR	38
6.4.-Encuestas.....	40

7.-Discusión.....	41
8.-Bibliografía.....	45
9.-Anexos.....	50
9.1.- Reactivos requeridos para el desarrollo de la prueba de ELISA.....	50
9.2.-Cuestionarios.....	52
9.2.1. Trabajadores.....	52
9.2.2. Encargados de Área.....	53
9.3.- Cuadros.....	54
9.4.- Marcas de Reactivos e Instrumental Utilizado.....	60
9.5.- Fotografías	61
9.6.- Croquis de la Sala de Ordeño.....	65

RESUMEN

López Yurame Jacqueline. “Situación de la paratuberculosis en el área de bovinos lecheros y de ciervos en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en el Altiplano (CEIEPAA). Propuestas de control.” Bajo la supervisión de MVZ. DR. Gilberto Chávez Gris.

La paratuberculosis es una enfermedad crónica infecciosa, que afecta a los rumiantes tanto domésticos y silvestres; es causada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). Causa lesiones granulomatosas en intestino y linfonodos mesentéricos. El proceso de incubación de MAP es prolongado. El objetivo fue determinar la situación de la paratuberculosis dentro del rebaño de ciervos y ganado de bovinos lecheros; así como realizar una propuesta de control en relación a la situación. Se realizaron tres muestreos uno por año a partir de 2008 hasta 2010 para conocer la situación de paratuberculosis; en estos tres muestreos se realizaron pruebas serológicas (ELISA), bacteriológicas (Ziehl Neelsen, cultivos bacterianos) y biología molecular (Reacción en Cadena de la Polimerasa) en los rebaños; así como la incidencia y prevalencia de cada rebaño. Dentro del primer muestreo se obtuvo un total de 54 animales en bovinos de los cuales el 100% fue negativo a PTB en ZN y ELISA, un total de 68 ciervos del cual un animal fue positivo en ELISA, en el segundo muestreo se obtuvieron 62 muestras de bovinos siendo nuevamente 100% negativos a PTB, en cuanto a ciervos se obtuvieron 113 muestras de los cuales 48 animales fueron positivos a PTB en la prueba de ELISA, mientras que en el tercer muestreo fueron un total de 91 bovinos de los cuales 4 fueron positivos a PTB en ELISA, en ciervos fueron un total de 46 animales y un total de 14 positivos a PTB nuevamente en ELISA.

Las pruebas serológicas fueron las más reveladoras en cuestión a la enfermedad debido que fueron donde encontramos a nuestros animales positivos; en cuanto a los cuestionarios aplicados revelaron que la falta de bioseguridad y últimamente la cercanía de las salas de ordeño han incrementado la positividad de los animales tanto bovinos como ciervos.

En conclusión si se desea la disminución de la PTB en los rebaños, es necesario incrementar las medidas de bioseguridad dentro de todas las áreas de producción, así como mantener informados a los trabajadores acerca de la enfermedad y la necesidad de establecer medidas de manejo que ayuden a disminuir la presentación de la paratuberculosis.

AGRADECIMIENTOS

A mi UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO por haberme acunado en sus instalaciones, y haber sido los cimientos de mi educación desde hace 10 años GRACIAS.

A mi hermosa FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA por enseñarme tantas cosas nuevas, por ser testigo de cada uno de mis triunfos y también de mis caídas, por ser el lugar donde encontré maestros, amigos, conocidos y el amor.

A GILBERTO CHAVEZ GRIS por haberme apoyado durante esta proceso de la vida, por haberme enseñado tantas cosas y darme la oportunidad de seguir adelante en mis estudios.

A EDITH MALDONADO por ser paciente durante el proceso de aprendizaje, por transmitirme sus conocimientos y sobre todo por ser una confidente y amiga.

A USEDICO, CEIEPAA, ordeña y personal que laboran en ellos, por haberme brindado alojamiento y amistad durante mi estancia, por la ayuda que me brindaron cuando la necesitaba, y la paciencia que mostraron durante el proceso de aprendizaje.

A los alumnos que me ayudaron durante las tomas de muestras de este documento, por haberme permitido transmitir mis conocimientos y ala vez aprender de ellos.

DEDICATORIAS

A mis padres Felix y Yolanda por estar siempre ahí cuando los necesito por alentarme cuando mas lo necesitaba, por enseñarme esos valores q tengo, por nunca dejarme caer a pesar de tantas trampas que tiene esta vida, simplemente por darme la vida GRACIAS.

A mis hermanos Erika y Carlos por darme consejos por haber estado ahí desde siempre, y haber disfrutado tatos momentos y recuerdos. A mis sobrinos Cinthya, Brandon, Cris y Wallas por sacarme siempre una sonrisa con sus juegos y a ti Cinthya por ser mi cómplice y confidente. A mi abue que donde quiera que este se que me cuida.

A mis amigos Kike, Juanpi, Zoraya, Karla, Zule, Pablo, Estela y Erick por estar ahí cuando necesitaba apoyo, y consejos, por los grandes momentos que pasamos y ser mi paño de lagrimas. A todos aquellos compañeros que estuvieron y compartieron una etapa de mi vida.

Y por supuesto a Omar Aragón por ser parte de mi vida, por haberme mostrado el amor, por ayudarme a levantarme en tantos tropiezos, por ser mi amigo y amor. Por recorrer este camino juntos, por todas esa murallas que hemos logrado derribar. Por estar siempre que lo necesito por eso y mucho mas.

♥TE AMO ♥

1. Introducción

La Paratuberculosis (PTB) es una enfermedad crónica infecciosa, que provoca una enteritis granulomatosa y en fases finales produce diarrea en rumiantes tanto domésticos como silvestres y es causada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). El proceso de incubación de MAP es prolongado, oscilando entre seis meses y cuatro años en los rumiantes; en las fases finales de la enfermedad se presenta además de la diarrea una pobre condición corporal¹.

Los animales pueden infectarse desde los primeros días de vida, aunque también pueden adquirir MAP en etapa adulta. Generalmente los bovinos llegan a manifestar la enfermedad entre los dos a cinco años de edad, mientras que las cabras y los ovinos presentan el cuadro clínico entre el primer y tercer año de vida; la presentación del cuadro clínico depende de varios factores tales como las condiciones inmunológicas, nutricionales, ambientales, entre otras. Es importante realizar el diagnóstico temprano para poder establecer medidas de control, y así evitar la diseminación entre el rebaño.^{2,3,4,5,6,7}

La vía de entrada de MAP es la oral, a través de alimentos o leche contaminados con heces de animales infectados³. Posteriormente la micobacteria tiende a localizarse en yeyuno e íleon donde pasa a las placas de Peyer y ocupa como vía de transporte a los macrófagos para llegar a la lámina propia intestinal para posteriormente llegar a los linfonodos mesentéricos desencadenando una respuesta inmune celular.⁸

Esta enfermedad se encuentra ampliamente difundida en el mundo,

principalmente en las áreas dedicadas a la producción intensiva de leche, teniendo mayor relevancia en zonas con climas húmedos. La importancia de esta enfermedad radica en las grandes pérdidas económicas por la disminución de la producción láctea; así como, la disminución de peso corporal y por lo tanto el sacrificio de los animales infectados o enfermos.^{9,10.}

El diagnóstico oportuno de la PTB contribuye a disminuir la diseminación de MAP, así como la remoción de los animales que presenten cuadro clínico y sean positivos a alguna prueba, de esta manera se disminuyen los riesgos de infección de los animales dentro del hato, por lo que esto puede considerarse como uno de los puntos estratégicos en el control y eventual erradicación de la PTB en un rebaño o hato infectado¹. Es importante considerar el **estatus zoonosario** de la granja, para definir un programa de control adecuado, de acuerdo a la especie afectada.¹¹

Los métodos de control se basan en: 1) Erradicar la infección mediante la eliminación en animales portadores, y 2) Mejorar las prácticas de manejo; tales como la colocación de tapetes sanitarios, desinfección de ropa de trabajo, desinfección de los utensilios ocupados durante el manejo de los animales, siendo estas las medidas más convenientes por ser altamente efectivas y de bajo costo.¹²

Las prácticas de manejo que pueden ser adoptadas en los hatos de rumiantes para el control de la PTB, deben de considerar las características y necesidades de cada una de las especies afectadas.¹²

1.1 Antecedentes Históricos

El primer informe de PTB se estableció en Alemania por H.A. Johne y L. Frothingham; los cuales describieron “*un caso en particular de tuberculosis*” en un caso de una vaca con enteritis crónica en el año de 1985. Al realizar la necropsia se observó engrosamiento de la mucosa intestinal y la presencia de bacilos ácido-alcohol resistente en las lesiones¹³. El caso se remitió a R. Koch, quien supuso que la infección se trataba de un tipo de tuberculosis entérica; años más tarde se dieron cuenta que la causante de esa enfermedad era totalmente diferente a la tuberculosis y además no era causada por *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium avium* o *Mycobacterium tuberculosis*; nombrando a este bacilo *pseudotuberculoso*. En 1912 Tworth e Ingram, lograron el primer aislamiento de esta bacteria y entonces la clasificaron como *M. johnei*¹⁴, y actualmente se denomina *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP).⁸

1.2 Distribución de la Paratuberculosis en México

Los primeros reportes de la enfermedad en México, fueron en el año de 1936 en ganado bovino lechero por R.J. Unzueta, por medio de la prueba de la johnina y tuberculina aviar y además de la observación de bacilos en frotis de heces que contenía una tinción de Ziehl Neelsen.^{15,16} Posteriormente X. Bustamante y M. Garibay en el año de 1974 realizan prueba doble comparativas intradérmica para tuberculosis aviar y mamíferos en ovinos¹⁷; en el mismo año Garibay contribuye con una prueba doble comparativa a la tuberculina aviar y mamífera para la identificación de reactores de la enfermedad en un hato de bovinos¹⁸, años más tarde Ramírez logró el primer aislamiento de MAP a partir de linfonodos

mesentéricos e intestinos delgados ¹⁹; en el mismo año Trigo, presenta un trabajo recapitulativo de los métodos más utilizados en el diagnóstico de la Paratuberculosis ^{20,21}. En 1982 este grupo de investigadores aíslan la bacteria en un hato de cabras en los estados de Querétaro y Guanajuato ^{19,22}. En el año siguiente Praxedis identifica el bacilo en heces de ovino y caprinos y en 1985 identifica la prevalencia del bacilo en 4 rastros a la periferia del Distrito Federal. ²³

1.3 Control

Considerando que en fases iniciales es difícil detectar a los animales infectados y eliminar a estos, surge la necesidad de promover medidas de bioseguridad que permitan el control de la enfermedad y promover la erradicación.¹

Si bien no existe alguna metodología cien por ciento efectiva para interrumpir el ciclo de la enfermedad en un rebaño, se han establecido algunas consideraciones que pueden facilitar este proceso, como la de la separación de neonatos y de alimentarlos con calostro previamente pasteurizado.²⁴

El problema que se presenta dentro de las producciones de rumiantes es principalmente la baja bioseguridad y como consecuencia la diseminación de la enfermedad; dando resultados poco alentadores en cuestión al control y erradicación PTB en un rebaño, desalentando así a los productores. ²⁴

Es importante considerar el tipo de sistema productivo, ya sea extensivo o intensivo; el tipo de especie animal a tratar, así como la prevalencia de PTB en el hato o rebaño, antes de adoptar un programa de control.¹¹

Para la observación del éxito de las estrategias en el control y erradicación de la enfermedad en un hato o rebaño deben considerarse múltiples factores, entre los cuales destaca, la capacidad económica del ganadero, la disponibilidad de las personas que laboran en el área, y un programa pensado solamente en el rebaño a manejar .²⁵

Para esto, los métodos de control se pueden dividir en dos grupos:

- 1) Los que se basan en el intento de erradicar la infección mediante la eliminación de animales y prácticas de manejo, y
- 2) Mediante prácticas de manejo y vacunación. ²⁶

Las prácticas de manejo que deben ser adoptadas para el control de la PTB, tienen que considerar las características y necesidades de cada una de las especies afectadas teniendo en cuenta lo siguiente:

- ✓ Proteger a los animales jóvenes ante cualquier material infectado o sospechosos.
- ✓ Separar a los recién nacidos de sus madres inmediatamente después del parto.
- ✓ Alimentar de calostro pasteurizado el cual debe de ser colectado de ubres con previa limpieza y desinfección .²⁶
- ✓ Limpiar los utensilios empleados para alimentación y acondicionamiento de la recría.²⁴
- ✓ Utilizar pastos o praderas sin contaminar, si estas praderas, serán utilizadas para animales jóvenes y de recría.¹
- ✓ Eliminar de cualquier cubierta innecesaria que impida llegar al sol a

cualquier área ocupada por animales.²⁴

- ✓ Separar inmediatamente cualquier animal con signología digestiva hasta que se establezca un diagnóstico acertado.
- ✓ Envío de rastro a todos los animales descendientes de animales con manifestación de diarrea crónica.
- ✓ Realizar cultivos de heces o cualquier otro método diagnóstico, cada seis meses de todos los animales mayores de un año y sacrificio de todos los positivos.²⁷
- ✓ Las heces se deben de desechar en un área determinada que sea inaccesible para los animales¹.

La inmunización con inmunógenos derivados de MAP, genera una inmunidad adquirida favoreciendo que los macrófagos sean capaces de inhibir la multiplicación microbiana.²⁸

Los animales candidatos para la vacunación son todos aquellos que se encuentren en riesgos de infección, teniendo en cuenta el medio ambiente, tipo de producción, así como, la situación Zoonositaria de cada región en con la intención de la modificación en el curso de la infección e incluso se podrían llegar a evitar cuadros clínicos de la enfermedad.²⁸ Aunque, el empleo de vacunas ha tenido reacciones poco deseables a consecuencia de su aplicación; como el desarrollo de nódulos fibrocáseos de 2 a 5 cm de diámetro, que en ocasiones pueden llegar a romperse.²⁸ Adicionalmente, existe reacción positiva cuando se realizan pruebas de intradermorreacción (IDR) contra la johnina y las tuberculinas aviar y bovina.²⁹

Es importante mencionar que para evitar los falsos positivos en países bajo

programas de control de tuberculosis, la vacunación se encuentra restringida. Se debe de tener en consideración que la vacunación y su eficiencia dependerán del cambio o modificación de las prácticas de manejo que se empleen dentro del rebaño de los animales infectados.²⁹

1.4 Relación entre Paratuberculosis y Enfermedad de Crohn

1.4.1 Enfermedad de Crohn

La enfermedad de Crohn (EC) es propia de los humanos, siendo un trastorno gastrointestinal caracterizado por un dolor abdominal intenso, diarrea, sangrado intestinal con obstrucciones, teniendo una variedad de síntomas sistémicos, tales como diarreas espontáneas durante periodos prolongados, dolores abdominales intermitentes; que en muchas ocasiones llegan a ser demasiado fuertes, los cuales pueden llegar a obstaculizar la capacidad para llevar una vida normal dentro de los episodios crónicos los cuales podrían durar meses e incluso años, variando de paciente a paciente.³⁰

Se ha mencionado la existencia de diversos factores asociados en cuestión a la presentación de la enfermedad, tales como herencia, estimulación del medio ambiente, la inmunodepresión, y la respuesta inflamatoria de cada persona.³¹

En estos momentos la terapia que se realiza en pacientes con esta enfermedad, se basa en disminuir el movimiento intestinal que el mismo cuerpo causa para el desecho del agente extraño. Cabe destacar que las drogas que se ocupan para el tratamiento de la enfermedad no dan el resultado esperado, aunque para algunas personas si tienen mejoría, pero no por tiempo prolongado.

En México se han descrito pocos casos de la EC y existe la impresión de que es

una enfermedad poco frecuente en la población. Se realizó un estudio en el Hospital General de México entre los años de 1980 y 1989, en el que se menciona que la frecuencia de pacientes con dicha enfermedad fue de 8 por cada 10,000.³² Aunque no existen datos concluyentes acerca de la incidencia de la EC en México, se calcula que esta tiene una estadística entre el 0.0008 y el 1.11 % de la población.³³

Estudios indican que la EC alrededor del mundo consistentemente indica una incidencia mayor entre las mujeres que en hombres con una proporción de 1.1 - 1.8.^{21,34}

Hoy en día se realizan investigaciones acerca de la posible contaminación de los productos lácteos así como de productos cárnicos; aunque dichas investigaciones tienen cierto problema al aislar la bacteria.³¹

Un informe acerca del contagio de la enfermedad es mediante alimentos contaminados provenientes de animales infectados con MAP. En un principio se pensó que la enfermedad era autoinmune, estudios recientes han propuesto su asociación con la enfermedad granulomatosa crónica, así como con micobacterias entre éstas MAP.³⁰

Aunque no se ha demostrado la asociación de la EC con MAP, tampoco ha sido descartada esta asociación. Debido a esto, se requiere de mayores estudios sobre su etiología.

1.5 Cultivos y sus Características

Los medios de cultivos sólidos más empleados para el aislamiento de MAP son el Löwenstein-Jensen (LJ), Middlebrook 7H11 enriquecido con ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa (OADC) y el medio de yema de huevo de Herrold (HEYM por Herrold Egg Yolk Medium) todos ellos adicionados con micobactina.³⁵

El crecimiento de MAP en medios de cultivo se caracteriza por ser de crecimiento lento y requerir de ocho a doce semanas de incubación a 37°C para el desarrollo de colonias.³⁶ Es recomendable utilizar al menos dos tipos de medios de cultivo; como el LJ o HEYM y prolongar el periodo de incubación por seis meses para obtener mejores resultados.³⁷

La textura, el color y la forma de cada colonia de MAP depende del cultivo que se emplee; en los medios a base de huevo, las colonias primarias son pequeñas de 1-2mm de diámetro, convexas, transparentes o blanquecinas, con un margen redondeado y liso, teniendo un aspecto húmedo. Entre más tiempo llevan en el cultivo éstas se vuelven más rugosas, opacas y aumentan el tamaño hasta 4mm de diámetro. En Middlebrock las colonias tienen una apariencia rugosa; cuando al medio se le agrega Tween 80 las colonias toman una apariencia lisa³⁸. En raras ocasiones las colonias pueden apreciarse pigmentadas; principalmente cuando las colonias son provenientes de ovinos.³⁵

1.6 *Mycobacteria Avium* sub. Paratuberculosis y su Dependencia a la Micobactina

MAP necesita una fuente de hierro, el hierro es quelado extracelularmente por exoquelinas y después integrado a la bacteria por lípidos complejos asociados a la membrana del microorganismo, que se conocen como micobactinas. Para el aislamiento de colonias primarias de MAP se requiere suplementar cualquier medio de cultivo con micobactina a razón de 2mg/ l de medio, ya que éstas muestran dependencia extrita a este sideróforo.^{21,35}

1.7 Aspectos Generales Sobre Prevalencia e Incidencia

Su evaluación determina el grado de infección de los animales del hato.³⁹

La prevalencia es una cifra relativa que relaciona el número de animales enfermos de una población susceptible, en un espacio y un tiempo determinado. No es una tasa verdadera sino una porción utilizada para cuantificar la frecuencia de enfermedad de una población en un momento determinado en el tiempo; y se define como:

$$\frac{\text{Total de enfermos en la unidad de tiempo}}{\text{Población expuesta al riesgo}} \times 100n$$

Población expuesta al riesgo

Incidencia, por otra parte, es el número relativo de nuevos casos de la enfermedad en una población un espacio y tiempo determinado definida como:

$$\frac{\text{Total de nuevos casos en la unidad de tiempo}}{\text{Población expuesta al riesgo}} \times 100 n$$

Población expuesta al riesgo

1.8 Descripción del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano CEIEPAA.

El CEIEPAA es uno de los 5 ranchos pertenecientes a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (FMVZ), que se encuentra ubicado en el kilómetro 8.5 de la carretera Tequisquiapan-Ezequiel Montes, Municipio de Tequisquiapan, Qro.

Dentro de las funciones del CEIEPAA destaca la enseñanza, investigación y difusión animal a través del desarrollo de modelos prácticos productivos dentro del área de bovinos, caprinos, ovinos, dentro del ámbito lechero y de cárnicos; así como producción de ciervo rojo. Las funciones que desarrolla es el apoyo a los departamentos de la FMVZ en la enseñanza dentro de los aspectos técnicos, científicos y financieros de la producción agrícola forrajera y ganadera. Así como implementar y difundir la tecnología eficiente y validada de producción agrícola y ganadera, que coadyuve a la satisfacción de las necesidades técnicas, económicas y ecológicas del país.⁴⁰

1.8.1 Sistema de Producción

El CEIEPAA cuenta con una superficie de 187 Ha, de las cuales 112 están habilitadas con estructura tecnificada de irrigación.

Dentro de la producción agrícola se busca la autosuficiencia forrajera para alimentar al ganado existente en el centro, a partir del establecimiento de praderas mixtas y alfalfares; siendo irrigados mediante dos tipos de sistemas tecnificados

(Aspersión mediante equipos de pivotes centrales, side roll y cañones y el sistema de Goteo enterrado), que permite una alta eficiencia en el manejo del recurso hídrico.

Los Bovinos Productores de Leche están basados en el esquema de pastoreo intensivo con semovientes de raza Holstein del tipo neocelandeses, Jersey y la cruce de los anteriores, a efecto de producir leche de alta calidad rica en sólidos.

En el modulo de ciervos (*Cervus elaphus*) se trabaja para la producción de animales de pie de cría así como para el abasto de carne.

El CEIEPAA cuenta con una Unidad de Servicios de Diagnóstico y Constatación (USEDICO) para brindar apoyo a la ganadería regional, a partir de laboratorios de bioseguridad clase II en el área de Patología (necropsias e histopatología), serología y ciencias de la leche.

Asimismo, celebra cursos de actualización y capacitación a profesionales y productores del área. Ofrece venta de leche y semovientes para abasto o pie de cría, teniendo también el servicio de consultoría agropecuaria.⁴⁰

2. JUSTIFICACIÓN

En el CEIEPAA existen antecedentes de paratuberculosis, fundamentalmente en el área de ovinos y caprinos en donde se han detectado casos clínicos y se han realizados aislamientos. En el 2008 mediante ELISA en estas áreas se detectó un 14 y 22% respectivamente. En el área de ciervos, si bien no han existido casos clínicos ni realizado aislamiento bacteriológico alguno se detectó un 2%; mientras que en el área de bovinos fue del 0% y tampoco existían antecedentes clínicos ni bacteriológicos de este proceso, en la misma fecha. Por lo anterior, es importante realizar un análisis sobre la situación que presenta la paratuberculosis en diferentes áreas del Centro, susceptibles a que se presente o incremente esta micobacteriosis..

Tener conocimiento de la situación sanitaria y las medidas de bioseguridad que puedan aplicarse en un hato o rebaño contribuye a limitar la diseminación de la Paratuberculosis. El diagnóstico oportuno de la enfermedad en los bovinos, ciervos, ovinos y caprinos, contribuye a establecer medidas de bioseguridad que lleven al control y posible erradicación de la enfermedad

3. OBJETIVO GENERAL

Determinar presencia de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en las áreas de bovinos y ciervos rojos ubicados en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en el Altiplano (CEIEPAA) perteneciente a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

3.1 Objetivos Específicos

3.1.1 La seroprevalencia se determinara mediante las pruebas de Inmunoensayo Enzimático (ELISA)

3.1.2 Se realizarán estudios bacteriológicos para determinar la eliminación de la micobacteria a partir de heces.

3.1.3 Evaluar la prevalencia e incidencia de la Paratuberculosis en las áreas de estudio.

3.1.4 Proponer medidas de control de acuerdo a los resultados de prevalencia e incidencia, para evitar la diseminación de la infección por *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis*.

4. HIPÓTESIS

El diagnóstico serológico y bacteriológico de la Paratuberculosis en bovinos y ciervos, permitirá conocer la incidencia y prevalencia en el CEIEPAA.

El establecer la incidencia y prevalencia de la Paratuberculosis en el hato de bovinos y ciervos, permitirá establecer las medidas de control para evitar la diseminación de la enfermedad y facilitará el desarrollo de un programa de control y erradicación en el CEIEPAA.

El no contar con las estrategias para el control de la paratuberculosis en las diversas áreas del centro, permite una mayor diseminación de casos detectables de paratuberculosis.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Origen de las muestras

5.1.1 Descripción de la procedencia de las muestras

El presente estudio se realizó en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano (CEIEPAA), perteneciente a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, ubicado en el kilómetro 8.5 de la carretera Tequisquiapan-Ezequiel Montes, Municipio de Tequisquiapan, Qro.

5.2 Colección y Toma de Muestras para Estudios Serológicos

5.2.1.- Bovinos Lecheros.

Bovinos lecheros. Se obtuvieron muestras de sangre de vacas productoras y rectoras ala prueba de tuberculina, así como en vaquillas (mayores a un año y menores de dos) mediante venopunción de la vena coccígea, por medio tubos al vacío y sin anticoagulanteⁱ de siete ml con agujas del número veintidósⁱⁱ y adaptador para la misma.

5.2.2.- Ciervos Rojos

Ciervos rojos. Las muestras se obtuvieron dentro de la manga de manejo; a través de la punción a la vena yugular, en tubos de vacío y sin anticoagulante de

ⁱ Tubos BD Vacutainer FERUM 7ml. BD Franklin Lakes NJ USA

ⁱⁱ Venojet Multi-Sample 22G x 1^{1/5} USA

siete ml empleando aguja del número veintidós y su respectivo adaptador.

5.3.- Colección y Toma de Muestras para Estudios Bacteriológicos

Las muestras de heces se tomaron después de la toma de sangre, directamente de recto con ayuda de guantes de palpación para cada animal, estas muestras consistieron en aproximadamente 10g de heces.

Así mismo, se tomaron muestras de la grasa láctea a partir de los filtros de leche, acumulado durante la ordeña.

Todas las muestras fueron transportadas inmediatamente a temperatura ambiente a la Unidad de Servicios de Diagnostico y Constatación (USEDICO) del CEIEPAA; durante las primeras dos horas después de su obtención.

En el primer muestreo que se realizó en septiembre de 2008, obteniéndose un total de sesenta y cuatro muestras de heces dentro del área de producción bovinos de leche, de las cuales treinta y ocho fueron pertenecientes a vacas productoras, once correspondientes a vacas reactoras y quince al grupo de vaquillas. Dentro de las muestras correspondientes a ciervos fueron un total de sesenta y ocho muestras de heces dentro de las cuales cuarenta y seis corresponden a vientres, ocho a reemplazo, tres a sementales, tres a engorda y ocho a otra categoría. Cuadro 1. Anexos

El segundo muestreo se realizó en septiembre de 2009 donde al igual en el primero se obtuvieron muestras de heces, sangre así como de leche. Se obtuvieron un total de sesenta y dos muestras de heces y de sangre de los bovinos productores de leche, de las cuales treinta y uno corresponden a las

vacas productoras, catorce a vacas reactoras y diecisiete a vaquilla.

En los ciervos, se obtuvieron un total de ciento trece muestras de heces de las cuales corresponden cuarenta y tres a vientres, veintinueve a reemplazo, cuatro a sementales, cuatro a engorda y treinta y tres a cervatos. Cuadro 2. Anexos

El tercer muestreo se realizó en junio de 2010 donde se obtuvieron muestras de sangre y heces. Se obtuvieron un total de ochenta y seis muestras de heces de los bovinos productores de leche, dentro de las cuales treinta dos son vacas del grupo de productoras, catorce a vacas reactoras, diecisiete a vaquillas grupo 1 y diecisiete a vaquillas grupo 2.

En ciervos se obtuvieron un total de setenta y tres muestras de heces de las cuales cuarenta y uno son vientres, catorce a recria, catorce a reemplazo y cuatro a sementales. Cuadro 3. Anexos

5.4. Colección y Toma de Muestras para Estudios de Biología Molecular

Así mismo, se tomaron dos muestras de la grasa láctea a partir de los filtros de leche, acumulado durante la ordeña. Este proceso se realizo solo durante el segundo muestreo. La muestra se mantuvo en congelación hasta su utilización

5.5. Ejecución de Pruebas. Estudio Serológico

5.5.1.-ELISA (Inmunoensayo enzimático)

Se utilizó, la técnica de ELISAⁱⁱⁱ indirecta para la detección de vacas seropositivas empleando el antígeno protoplasmático de Paratuberculosis (PPA3)^{iv}. Ver Anexo 1. Para la absorción del antígeno en las placas^v de ELISA, se depositaron 100µl del antígeno a cada pozo a una concentración de 0.040µg con tampón carbonato, se mantuvieron a 4° C durante toda la noche para después realizar tres lavados con PBS Tween Gelatina^{vi}, las placas secas se mantienen a -20° C hasta el momento de su utilización. Para el incremento de la especificidad de la prueba, los sueros problema y los controles se preabsorbieron con una solución de *Mycobacterium phlei*^{vii} al 5% (solución salina) en una proporción 1:1 durante toda la noche; al día siguiente en una placa previamente sensibilizada con PPA3 se agregan 1:100 99µl de solución amortiguadora de fosfatos Tween Gelatina (PBS TG) y se añade 1µl de suero enfrentado con *M. phlei* se agitaran durante tres minutos en la agitadora orbital, se dejó incubar dos horas en una cámara húmeda; posteriormente se realizan tres lavados con PBS TG y se agregan por pozo 100µl

ⁱⁱⁱ Placas 96 pozos Sarstedt /Alemania

^{iv} Antígeno PPA-3 Allier Monitor, Inc/USA,

^v Placas 96 pozos Sarstedt /Alemania

^{vi} Tween 80 Merck/Alemania, NaCl Merck / Alemania, KCL Sigma Chemical/USA, Na₂HPO₄ Golden Bell/Méx, KH₂

^{vii} M. Fhlei Allier Monitor/ Inc USA

de anti-IgG caprina a una dilución de 1/4500 con PBS TG y se incuban en una cámara húmeda durante dos horas mas a temperatura ambiente; a término de este tiempo se realizan tres lavados mas con PBS TG; colocando inmediatamente 100µl de buffer citrato y peroxido de hidrogeno (ABTS)^{viii} recién preparado, solución de revelado, una vez colocado se deja agitar durante quince minutos en el agitador orbital protegiéndolo de la luz. La lectura se realizó en un espectrofotómetro de 8 canales empleando un filtro de 450nm.

Para la determinación de la positividad de sueros problema, el promedio de la densidad óptica de cada suero se dividirá entre el promedio de la densidad óptica del control positivo (suero cabra positiva), si el cociente resultar mayor o igual a 0.800 se considera prueba positiva.²⁹

5.5.2.- PCR a Partir de Leche (filtros)

Extracción de DNA a partir de filtros de leche

Los filtros de leche se obtuvieron cada miércoles después de la ordeña, durante tres semanas; estos se colocaron en guantes de palpación nuevos, se identificaron y se mantuvieron en refrigeración hasta el momento del procesamiento.

En el procesamiento de la muestras, la leche de un filtro se obtuvo de la concentración al final del guante, de otro de los filtros se obtuvo de la colecta a partir de cortes pequeños del filtro, ambos se colocaron en tubos falcón de 50ml cada muestra en un tubo diferente. A cada una se colocó PBS hasta homogenizar la suspensión y se aforo a 30ml se centrifugaron a 3000 rpm^{ix} (7000 xg), durante

^{viii} ABTS Sigma Chemical/USA,

^{ix} Centrifuga 5810R Eppendorf/ Alemania

30 min., se desecho el suero y se recuperó la fase cremosa y la pastilla, se incubaron en baño maría a 100° C durante 30 min. se agrega 50µl de lisozima (10 mg/ml) y se incubo a 37° C durante toda la noche con agitación a 100 rpm.

Se sacan los tubos de la incubadora se agregaron 75 µ de SDS (lauril sulfato de sodio) 10% y 20µl de proteinasa k (10 g/ ml) y se incubaron 10 min. a 65° C .

Se agregaron 400µl de cloroformo/ alcohol isoamilico (24:1) y se centrifugaron a 900 rpm (6000 xg) durante 30min a temperatura ambiente. Se tomó el sobrenadante y se agregó 250µl de isopropanol, se guardaron a -20° C.

Se centrifuga 30min a temperatura ambiente a 900rpm (6000 xg), se descartó el sobrenadante, se agrego 1ml de etanol al 70% se centrifugó a 9000 (6000 xg), rpm durante 15min, se descarto el sobrenadante, se centrifugó 5min a 9000 rpm (6000 xg), una vez obtenida la pastilla se resuspendieron en 50µl de buffer.

Se realizó un PCR con cinco carriles en el primer carril se coloco el marcador de peso molecular, en el carril dos control positivo en los carriles tres y cuatro las muestras de los filtros de leche y en el carril cinco el control negativo.

Las muestras se numeraron del uno al cinco y se les identificó de la siguiente manera:

Mpm. Marcador de peso molecular 100pb

1. Control positivo (Aislamiento de Cepa de intestino)
2. Filtro de leche 230909
3. Filtro de leche 141009
4. Control negativo (Agua)

Posteriormente se realizó la amplificación de ADN (IS900 3N -5' GGG TGT GGC GTT TTC CG3', IS9005N – 5' ATT TCG CCG CCA CCG CCA CG3') mediante las

siguientes condiciones, El primer ciclo a 94 °C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos a 94 °C durante 40 segundos para después obtener una temperatura de 67 °C durante 40 segundos, y al final una temperatura de 72 °C durante otros cuarenta segundos y así consecutivamente hasta finalizar los 35 ciclos, para terminar con un ciclo de 72 °C durante 5 minutos.

5.5.3.-Ziehl-Neelsen (ZN)

Se realizaron frotis de heces de cada una de las muestras obtenidas con la ayuda de un asa bacteriológica, la cual se esterilizó a fuego directo en mechero previamente sumergiendo en etanol para quitar cualquier excedente de materia orgánica. Todas las muestras fueron identificadas para posterior tinción mediante la técnica de ZN de la siguiente manera: Se agregó sobre cada preparación Fuscina^x durante una hora, después de esta hora se lava con agua destilada, se decolora alcohol-ácido durante cuatro minutos, y se lavan con agua destilada hasta quitar el excedente de ácido alcohol y se contrasta con azul de metilo por veinte minutos, seguido de lavado con agua destilada. Una vez realizado lo anterior, se dejó secar a temperatura ambiente el tiempo necesario. Y se realizó montaje empleando cubreobjetos y una gota de medio de montaje para su posterior observación en el microscopio óptico.

5.5.4.- Aislamiento Bacteriano a Partir de Heces

Por cada 2g de heces se añadieron 35ml de agua destilada estéril, separándolas

^x Azul de metilo, Fuscina Fenicada Hycel / D.F México, Alcohol High Purity

por especie, y se mantuvieron a temperatura ambiente (TA) durante 30 min. Posteriormente, se removió el sobrenadante y se vertió en tubos estériles de 50 ml. Estas muestras se centrifugaron a 1700 G durante 20 min, Decantándose el sobrenadante y la pastilla obtenida se resuspendió en 30 ml de solución de hexadecilpiridinio (HPC) al 75%. La descontaminación se realizó durante toda la noche a TA, manteniendo las muestras en posición vertical. Al siguiente día, con una pipeta de transferencia estéril se tomó el material de la interfase y se inocularon dos tubos con medio Herrold^{xi} con micobactina^{xii} (2mg/l) y dos tubos sin micobactina.

Los tubos se mantuvieron en posición horizontal durante una semana con los tapones sin apretar para permitir la absorción y evaporación de la humedad en la superficie del medio a una temperatura de 56°C; posteriormente se cerraron y se mantuvieron en posición vertical. Su revisión se realizó semanalmente a partir de las 16 semanas de incubación y hasta las 52 semanas.

5.6. Encuestas

Se diseñó una encuesta, tanto para los trabajadores de las áreas como para los responsables de las mismas. Se realizaron un total de trece encuestas, de las cuales ocho fueron dirigidas hacia trabajadores de cada área a investigar y cinco a los encargados de las áreas de producción. Esta encuesta se observa en el

^{xi} Peptona de Carne Bioxon, Edo. Mex., Cloruro de Sodio Merck, Alemania, Agar Bacteriológico, Extracto de Carne Bioxon, Edo. Mex., Glicerol Jalmeck, N.L. Méx, Verde de Malaquita Merck, Alemania, Piruvato de Sodio Golden Bell; Jalisco, Méx, Alcohol High Purity,

^{xii} Micobactina Allied Monitor, USA, anfotericina B Sigma, USA, vancomicina Amresco, USA

anexo 2.

6. RESULTADOS

6.1 Estudios Serológicos (ELISA)

6.1.1 Bovinos de Leche

Se obtuvieron 54, 62 y 91 muestras respectivamente, en cada una de las tomas de muestra siendo los resultados negativos en los dos primeros muestreos, sin embargo en el tercer muestreos 4 bovinos (4/91) resultaron positivos obteniéndose un 4.39% de positividad. Cuadro 4. figura 1.

La prevalencia se muestra en el cuadro 5 mientras que en la figura 2 se muestra la prevalencia de bovinos.

ESPECIE	NUMERO DE MUESTRAS			POSITIVAS			NEGATIVAS			Porcentaje Positivas		
	1°	2°	3°	1°	2°	3°	1°	2°	3°	1°	2°	3°
Muestreo												
Bovinos	54	62	91	0	0	4	54	62	87	0%	0%	4.39%

Cuadro 4. Seropositividad de bovinos de todos los muestreos. Se observa el aumento en la última muestra.

Especie	1° Muestreo	2° Muestreo	3° Muestreo
Bovinos	0%	0%	4.3%

Cuadro 5. Prevalencia de Bovinos del CEIEPAA comparación de los tres muestreos, aquí se observan el aumento en el último muestreo

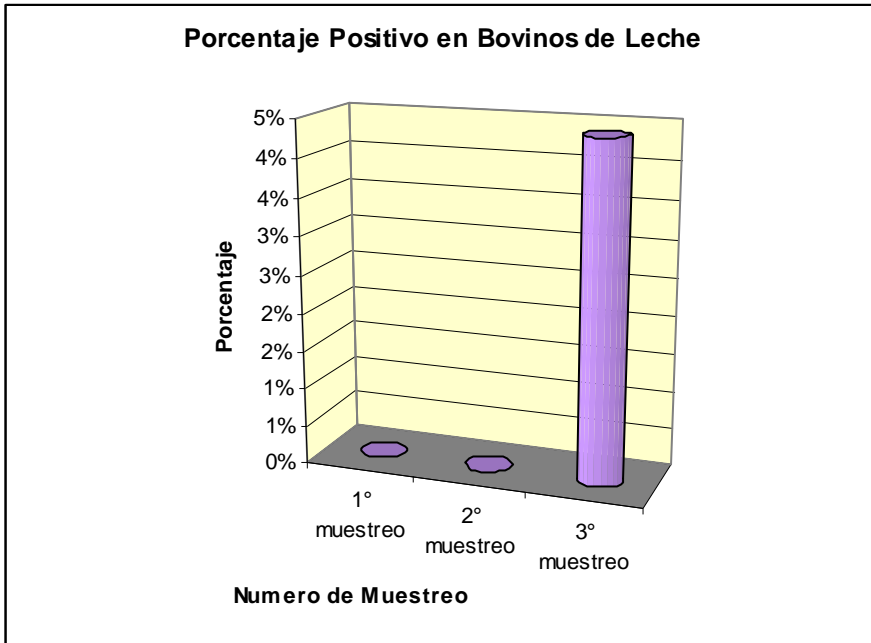


Figura 1. Porcentaje de seropositividad en Bovinos de Leche del CEIEPAA durante los tres muestreos se observa el aumento en la última toma. 1 muestreo 0%, 2 muestreo 0%, tercer muestreo 4.39%

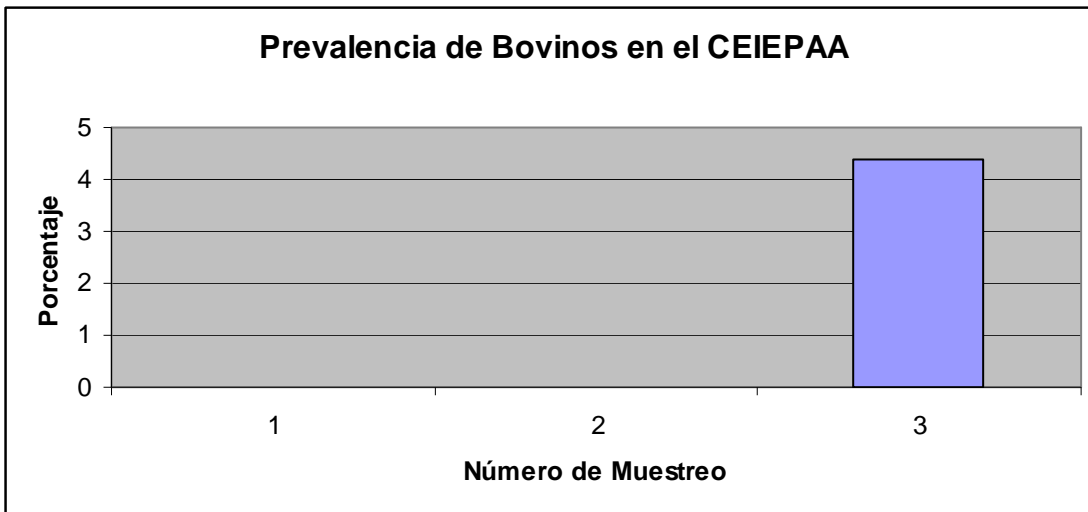


Figura 2. Prevalencia de Bovinos de Leche del CEIEPAA. En el muestreo uno y dos la prevalencia fue de 0%, mientras que en el tercer muestreo aumento al 4.3 %

La incidencia de Bovinos de Leche en el segundo y tercer muestreo es de 0% y de 6.45% respectivamente.³⁷ Cuadro 6 Figura 3

Especie	2° Muestreo	3° Muestreo
Bovinos	0%	6.45%

Cuadro 6. Incidencia de Bovinos del CEIEPAA. Aumento de incidencia en el segundo muestreo.

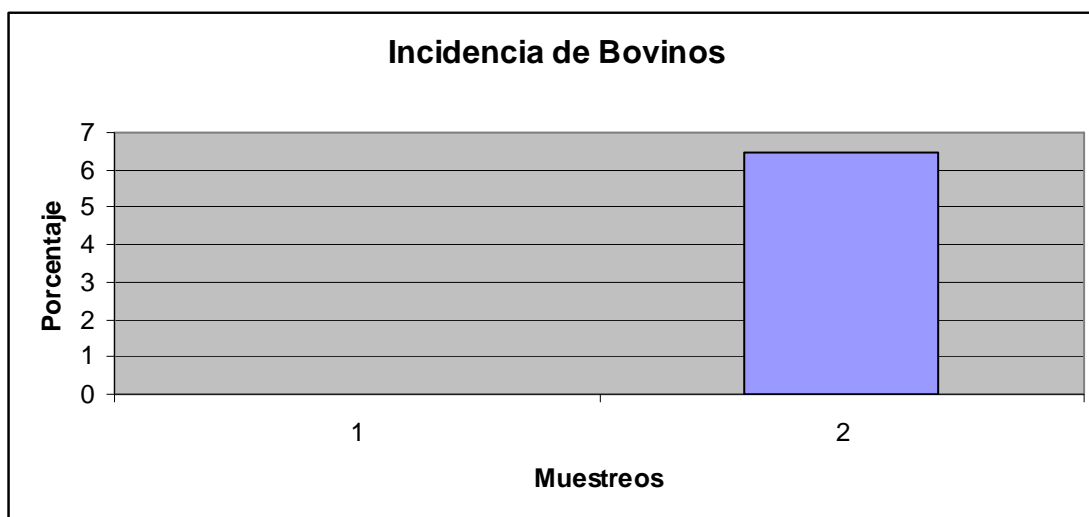


Figura 3. Incidencia de bovinos. El primer dato es de 0% de incidencia mientras que el segundo es de 6.45 %

6.1.2 CIERVOS:

En el primer muestreo se realizó la prueba a 68 animales siendo Solo un animal positivo a la prueba (1.47%). En la segunda toma de muestras, se realizó la prueba a 113 animales obteniéndose un 42.47% de seropositividad del total de los animales. En el tercer muestreo se realizo la prueba a 46 animales de los cuales 14 fueron positivos y obteniéndose 30.43% de positividad En el cuadro 7 se muestra a detalle la cantidad de muestras todos los muestreos. En la Figura 4 se aprecia el aumento de la seropositividad de los ciervos.

ESPECIE	NUMERO DE MUESTRAS			POSITIVAS			NEGATIVAS			Porcentaje Positivas		
	1°	2°	3°	1°	2°	3°	1°	2°	3°	1°	2°	3°
Ciervos	68	113	46	1	48	14	67	65	32	1.47%	42.47%	30.43%

Cuadro 7. Número de muestras de ciervos y positividad de ciervos en los tres muestreos

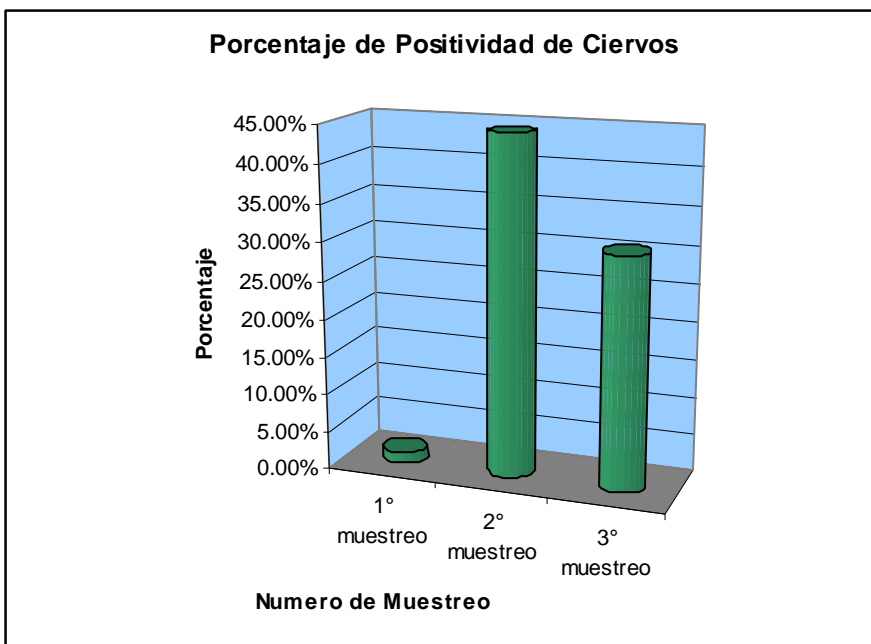


Figura 4. Porcentaje de seropositividad en Ciervos del CEIEPAA. En el primer muestreo la positividad es de 1.47% el segundo muestreo aumento a 42.47 % mientras que en el tercer muestreo disminuyo a 30.43 %

En cuestión a la prevalencia de Ciervos en el primer muestreo tenemos un 1.4% en el segundo muestreo fue de 42.4% y en el tercer muestreo de 30.4%.³⁹

8 Figura 5

Especie	1° Muestreo	2° Muestreo	3° Muestreo
Ciervos	1.4%	42.4%	30.4%.

Cuadro 8. Prevalencia de Ciervos del CEIPAA. En el primer muestreo es de 1.4 % en el segundo muestreo hubo un aumento de al 42.4 % mientras que en el tercero disminuyo a 30.4 %.

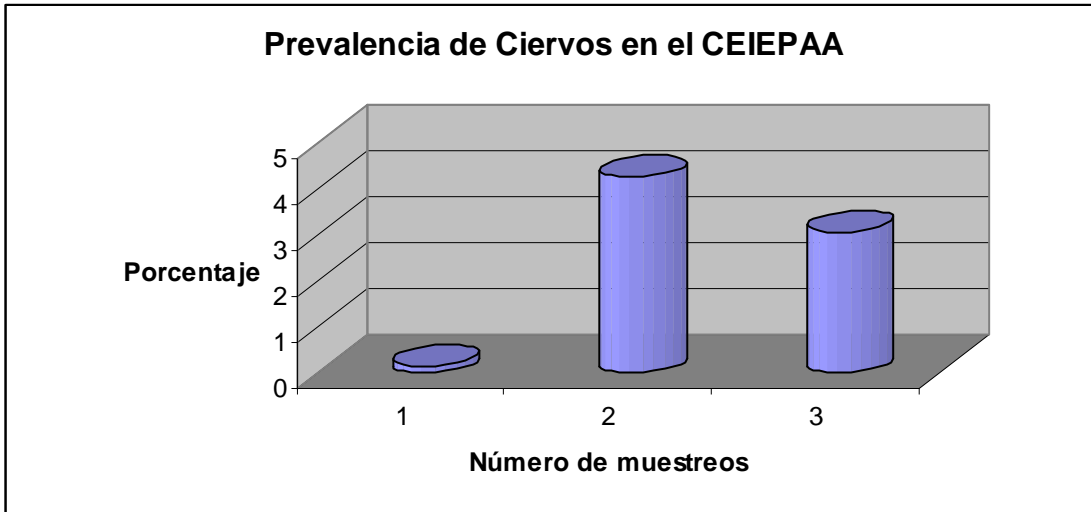


Figura 5. Prevalencia de Ciervos del CEIEPAA. En el primer muestreo es de 1.4 % en el segundo muestreo hubo un aumento de al 42.4 % mientras que en el tercero disminuyo a 30.4 %.

La incidencia de Ciervos en el segundo muestreo es de 69.11 mientras en el tercer muestreo fue de 54.86% ³⁹ Cuadro 9 Figura 6

Especie	2° Muestreo	3° Muestreo
Ciervos	69.11%	54.86%

Cuadro 9 Incidencia de ciervos en el CEIEPAA. En el segundo muestreo la incidencia de fue de 69.11% mientras que en el tercero hubo una disminución del 54.86%

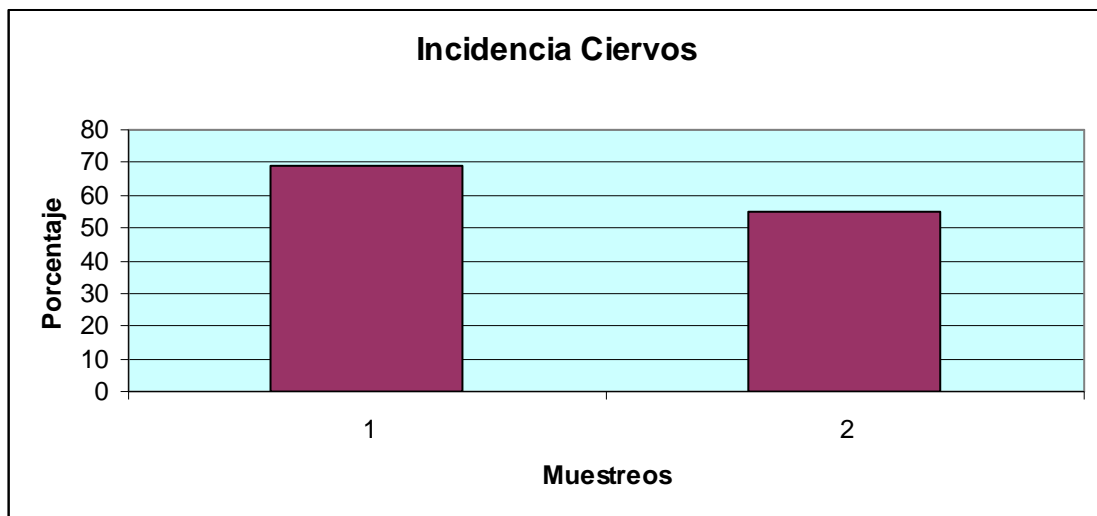


Figura 6. Incidencia de ciervos del CEIEPAA. En la toma numero uno la incidencia fue de 69.11% mientras para el siguiente muestreo es de 54.86%.

6.2 Estudios Bacteriológicos

6.2.1 Ziehl Neelsen ZN

Se realizaron 54 frotis de ZN en el primer muestreo, 62 en la segunda toma y 91 en la tercera toma de muestras dentro del área de bovinos siendo negativas todas las pruebas realizadas.

En el área de ciervos en el primer muestreo se realizaron un total de 68 pruebas, mientras que el segundo muestreo se obtuvo un total de 113 muestras y en el tercer muestreo un total de 46; en todos los muestreos se obtuvo el 0% de positividad. Cuadro 10

ESPECIE	NUMERO DE MUESTRAS			POSITIVAS			NEGATIVAS			PORCENTAJES POSITIVAS		
	1°	2°	3°	1°	2°	3°	1°	2°	3°	1°	2°	3°
Muestreos												
Bovinos	54	62	91	0	0	0	54	62	91	0%	0%	0%
Ciervos	68	113	46	0	0	0	68	113	46	0%	0%	0%

Cuadro 10. Positividad de ciervos y bovinos en la prueba de ZN. Aquí se muestra el número de muestras totales así como las positivas negativas y el porcentaje de las mismas.

6.2.2 Cultivo Bacteriológico

Estos se revisaron cada semana, desde la semana 16 hasta la 52 como ya se había mencionado anteriormente en las dos tomas de muestras tanto para bovinos como para ciervos dieron negativos así que los tubos se desecharon.

6.3 Biología Molecular

6.3.1 Reacción en Cadena de Polimerasa. PCR IS900

Se obtuvo un amplificado de los controles positivos obteniendo la presencia de bandas intensas de 314 pb, indicando las condiciones óptimas para una adecuada amplificación. Figura 7. En el control negativo no se obtuvo ninguna banda, el super mix no se encuentra contaminado, al igual que los controles positivo y negativo. No se observó amplificación en las muestras de la extracción de los filtros, por lo cual se consideran negativos. Cuadro 11

Especie	Muestra	Resultado
Bovinos	MX 23-09-09 FILTRO DE LECHE	Negativo
	MX 14-10-09 FILTRO DE LECHE	Negativo

Cuadro 11. Resultados Filtros de Leche. Ambas muestras fueron negativas

Resultados de amplificación de Filtros de Leche

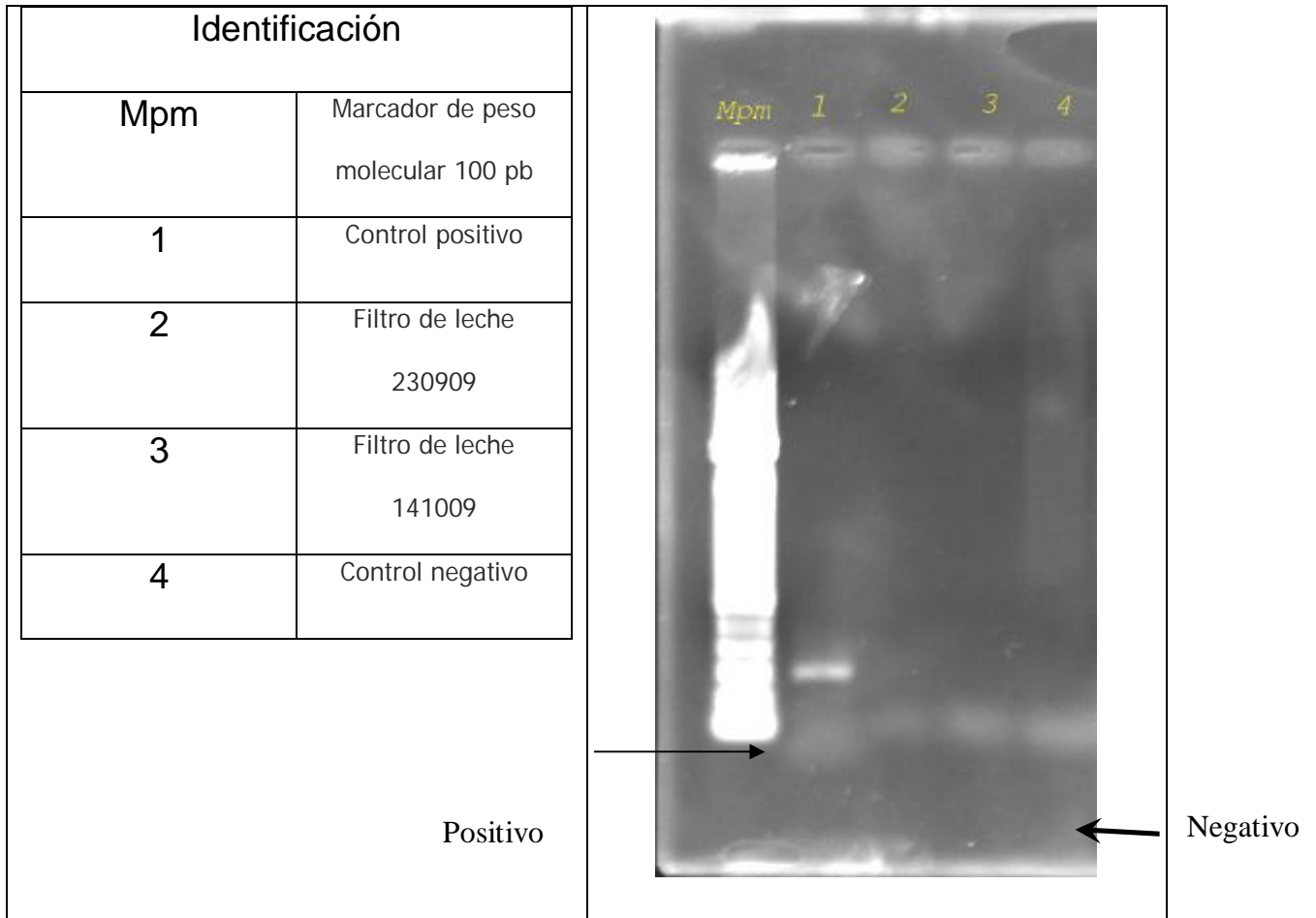


Figura 7. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, en el que se observa en el primer carril el marcador de peso molecular 100pb, carriles identificados 2,3 producto de la amplificación del PCR a partir de filtros de leche, carriles identificados 1,4 control positivo y negativo respectivamente. Las flechas indican q en los tres últimos carriles son negativos mientras el segundo el contraste del positivo

6.4 Encuestas

En los resultados obtenidos dentro de las encuestas se destaca la falta de bioseguridad que tienen en las áreas, en las fotografías 1 y 2 se aprecia que los animales pueden estar en contacto con personas tanto ajenas como del mismo centro. Fotografías 4-6 Algunos trabajadores dentro del área donde laboran, tal es el caso de los trabajadores que se comparten en el área de pequeños rumiantes y el área de ciervos dichos trabajadores en su mayoría no tienen una rutina de higiene antes de realizar el trabajo asignado para su área. Fotografías 7-8. Tal como una desinfección del uniforme que utilizan o el uso de dicho uniforme. Fotografías 9 y 10. Cabe destacar que los trabajadores del área de bovinos no tienen acceso con ninguna otra área.

Los únicos trabajadores que se comparten en el área de pequeños rumiantes y bovinos de leche son los ordeñadores, en este caso es importante destacar la rutina de limpieza que estos llevan a cabo antes de la realización de su trabajo tal es el caso de la desinfección de botas, manos y uniformes Fotografías 11,12. Así como el uso de guantes y la limpieza que deben de tener antes y después de realizar las ordeñas. Fotografías 13-16.

Otro aspecto que contribuye a las buenas prácticas es la asesoría de los trabajadores por parte de los responsables del área.

7. Discusión

En el hato bovino se apreciaron resultados negativos en los dos primeros muestreos en todas las pruebas realizadas. Mientras que en el tercer muestreo se aprecia un incremento en la positividad del hato sugiriendo que la cercanía entre las salas de ordeño a sido el factor determinante en el aumento, combinado con la falta de tapetes sanitarios dentro de la sala de los tanques enfriadores^{12,24}. Pues si bien se aprecia buena higiene por parte del personal que trabaja dentro del área de bovinos, ya que cuenta utensilios exclusivos para el área; tales como botas de trabajo, guantes y overol. También contribuye que el área de bovinos de leche se encontraba alejada de las otras producciones con las que cuenta el rancho CEIEPAA (ciervos, pequeños rumiantes, bovinos de carne), en algunas de las cuales existe antecedentes clínicos, bacteriológicos y anatomopatológicos de PTB.¹¹ Otro aspecto a destacar para tener una menor seroprevalencia e incidencia es el sistema de producción extensiva para los bovinos lecheros, la rotación de los bovinos dentro de los diferentes potreros destinados a esta área de producción a disminuido el riesgo de la transmisión de PTB por medio de alimento contaminado con heces de los animales portadores. Así también, el no tener contacto con animales de las otras áreas al contar con potreros exclusivos, este es un factor que evita que los bovinos puedan infectarse por esta vía o un aumento de la incidencia de los mismos.^{12,24} Aunque al parecer no ha sido suficiente para evitar el contagio con MAP No debe descartarse la participación de micobacterias saprófitas *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium celatum*, *Mucobacterium. gordonae* entre otras; ya que pueden generar falsos positivos y ser responsables del sacrificio animales en este hato.

En la actualidad la cercanía de las salas de ordeña, tanto de pequeños rumiantes

como de bovinos de leche, implica un gran riesgo para la diseminación de la enfermedad, por tal motivo, se debe sensibilizar a los trabajadores acerca de las medidas preventivas, adecuada desinfección, y la rutina de higiene que se deben de realizar antes, durante y después de la realización de las actividades cotidianas, dentro de sus trabajo, así como el uso de tapetes sanitarios, los cuales deben de separar cada sala de ordeño para evitar la diseminación de micobacterias.¹

Por su parte, en los casos detectados serológicamente de la paratuberculosis en ciervos, puede asociarse a diversas prácticas de manejo como el compartir los mismos trabajadores con diferentes áreas como los ovinos y caprinos destacando menores medidas de bioseguridad como la no desinfección de botas al ingresar a otras áreas y el empleo de la misma ropa, incrementando el riesgo de contagio, lo anterior se base tanto en observaciones como en las respuestas al cuestionario realizado a los trabajadores de esta área.²⁴

Además se destaca la falta de tapetes sanitarios dentro de las áreas que los trabajadores manejan (ciervos y pequeños rumiantes) y el poco espacio destinado para el pastoreo de ciervos aumenta el riesgo de contagio al tener el poco descanso el área de pastoreo; así como los malos hábitos que los trabajadores del área tienen al destacar dentro del cuestionario realizado a los mismos.¹¹

Se recomienda que para mejorar la bioseguridad en las áreas de ciervos y bovinos de leche lo siguiente:

- ❖ La desinfección previa y posterior a la entrada al área de ciervos y la sala de ordeno en las botas de trabajo (tapetes sanitarios).¹³
- ❖ El uniforme proporcionado para cada trabajador, no cuenta con una

desinfección adecuada o previa antes de las actividades diarias cotidianas, al no tener una rutina de higiene previa al trabajo.²⁵

- ❖ Los trabajadores al ser los encargados de la alimentación de los animales juegan un papel muy importante dentro del control de infección por la vía de entrada oral al contaminar el alimento de los animales.
- ❖ Identificación temprana de la infección.
- ❖ La cercanía del área de pequeños rumiantes a la carretera y el libre acceso de automóviles ajenos al rancho sin previa desinfección, y provenientes de otros ranchos con actividades ganaderas incrementan el riesgo de infección a causa de fómites.¹
- ❖ La falta de concientización de los productores para la realización de las pruebas necesarias para la identificación de animales seropositivos dificulta el control de la enfermedad dentro del área de pequeños rumiantes afectando directamente el área de ciervos rojos y bovinos de leche.²⁷
- ❖ Baja credibilidad de la presencia de la enfermedad dando una mayor importancia de otro tipo de enfermedades presentes en el área de pequeños rumiantes dificulta el control y erradicación de la misma.²⁷

A pesar de haber tomado las medidas pertinentes como, el sacrificio, en cuanto a los animales seropositivos durante las primeras pruebas el aumento de dicha enfermedad en la manada de ciervos, debemos de tomar en cuenta que podríamos disminuir la presencia de micobacterias teniendo un diagnóstico temprano de la enfermedad, un establecimiento de medidas zoonositarias dentro de cada área, dando platicas tanto a trabajadores como personas ajenas al rancho, ya sean alumnos, o productores antes de la visita a cada área.^{11,12}

Debido a los pocos signos clínicos que los animales presentan, los productores llegan a pensar que su hato es libre de dicha enfermedad. El prolongado periodo de incubación de la enfermedad dificulta el diagnóstico de la misma.¹ Dando como consecuencia que se le de importancia a la enfermedad hasta la presentación de signos clínicos tales como son: caquexia, baja en la producción láctea, siendo esta ya la etapa final de la enfermedad.²⁵

Ahora bien, la verdadera importancia para la erradicación y control de la enfermedad es: la realización de un diagnóstico temprano; así como, prever y concientizar tanto a trabajadores como personal que ingresan y tienen contacto con los hatos pertenecientes al rancho.

8. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Chiodini RJ, Van Kruiningen HJ MerKal RS. Rumiant Paratuberculosis (Johne's Disease):The current status and future prospects. Cornell Veterinarian 1984 74(3):218-262.
- 2.- Kess Kalis; mayo 2003 Diagnosis and control of Paratuberculosis in dairy heads.9-49
- 3.- Beeman, K.B; Huber , B. and Leipold, H. W., 1989. Johnne's disease (paratuberculosis) in sheep. Comp Cont Educ 11:1415-1422
- 4.- Elsken, L.; Lewis-Hintz A. and Whipple D., 1985. The pathogenesis, diagnostic and control of Paratuberculosis (Johne's disease) in goats. Amer Ass Vet Lab Diag, 28th Annual Proceedings: 121-130.
- 5.- Juste, R.A., 1984. Paratuberculosis: una revisión. Med. Vet. 1:197-210.
- 6.- Setlz, S.; Heider, L.; Heston, W.D.; Bech-Nielsen, S.; M.and Spangler, L.1989.Bovine fetal infection with Mycobacterium Paratuberculosis. JAVMA 194: 1423-1426.
- 7.- Wren , G., 1993. What's new with Johnne's disease? Bovine Veterinarian 39:40-43
- 8.- Sweeney, R., 1997. Pathogenesis and immunology of paratuberculosis. Proceedings of 5° Inter Colloq Paratuberculosis:_1-4. USA.
- 9.- Benedictus, G 1985. Dijkhuizen, A.A., Stelwagen,J. 1985. Economic losses to farms due to paratuberculosis in cattle. Tijdschr. Diergeneeskd.110:310-319.
- 10.- Hudchinson, L. L 1996. Economic impact of paratuberculosis. Vet. Clin. North Am., Food Anim. Pract. 12: 373-383
- 11.- Vélez HMV. Comparación de diferentes tecnicas de diagnostico en paratuberculosis caprina (*Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*). Tesis de

maestría. FMVZ, UNAM. 1998

12.- Pérez V.; García Marín J. F. and Badiola, J. J: 1996 Description and clasification of different types of lesion associated with natural paratuberculosis infection in sheep. J Comp Path 114:107-122

13.- Clarke, c.j., 1997. Paratuberculosis and molecular biology. Vet Journal 153:245-247.

14.- Goudswaard, J. and Terporten, W.M, 1972. Johne's disease in goats: Compararison of serological tests. Neth J Vet Sci 4: 93-112.

15.- Unzueta R.J Contribución al estudio de la enteritis paratuberculosis bovino en México. (Tesis de licenciatura). México (DF): Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1936.

16.- Thorel MF, Krichevsky M, Levy- Frebault VV. Numerical taxonomy of mycobactindependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *mycobacterium avium* subsp.. *Avium* subsp. Nov., and *mycobacterium avium* subsp.. *Silvaticum* subsp.. Nov. Int J Syst Bacteriol 1990;40(3): 354-260.

17.- Bustamante J. Detección de anticuerpos a *Mycobacterium* Paratuberculosis por medio de la prueba de fijación del complemento. (Tesis de Licenciatura). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

18.- Garibay V.M. Prueba doble comparativa intradérmica a la tuberculina aviaria y mamífera para identificación de reactores a *Mycobacterium* paratuberculosis en un hato de ovinos. (Tesis de Licenciatura). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

19.- Ramirez C, Trigo E, Suarez F, Merkal R. Aislamiento e identificación de

- Mycobacterium paratuberculosis* en México. *Téc Pec Méx* 1979; 36:74-75
- 20.- Trigo FJ. Diagnostico de la paratuberculosis. *Enfermedad de Johne*. *Vet. Méx.* 1979; 10: 239-245.
- 21.- Favila Humara Lucia del Carmen. 2007 Detección de *Mycobacterium avium paratuberculosis* en leche de vacas y cabras seropositivas del centro de México. Tesis Maestría. UNAM
- 22.- María de la Cruz Domínguez Punaro, 2000. Características Anatomopatológicas, Hallazgos Bacteriológicos y Respuesta Inmune Posteriores a un Año de la Inmunización de un Rebaño Caprino con Antecedentes de Paratuberculosis. Tesis Maestría. UNAM
- 23.- Ramirez C, Tenorio V, Valero G, Trigo E, Merkal R. Presencia de anticuerpos contra *Mycobacterium Paratuberculosis* en ovinos y caprinos. *Memorias de la reunión de investigación Pecuaria en México DF, SAGAR, 1982: 177-181.*
- 24.- Juste RA; García Marin, J.F.; Peris, B.; Sáez de Ocariz, C. and Badiola , J.J.; 1994 experimental infección of vaccinated and non-vaccinated lambs with *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Comp* 110: 185-1994.
- 25.- Collins, M T ., 1994. Clinical approach to control of bovine paratuberculosis. *JAVMA* 204: 208-210
- 26.- Perez V.; García Marín J. F. and Badiola, J. J: 1991 Description and clasification of different types of lesion associated whit natural paratuberculosis infection in sheep. *J Comp Path* 114:107-122
- 27.- Collins MT, Sockket 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 Ass 1994; 204(4): 636-641

28.- Larsen, A.B.; Moyle, A.I. and Himes, E.M., 1978. Experimental vaccination of cattle against paratuberculosis (Johne's Disease) with killed bacterial vaccines: a controlled field study. Am J Vet Res 39: 65-69.

29.- Chavez GG. Estudio comparativo de las lesiones y de la respuesta inmunológica observadas en corderos infectados experimentalmente con *Mycobacterium Paratuberculosis* y *Mycobacterium avium* sp. Y silvaticum. Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza, España, 1993.

30.- Tim J. Bull, Elizabeth J. McMinn, Karim Sidi-Boumedine, Angela Skull, Damien Durkin, Penny Neild, Glenn Rhodes, Roger Pickup, and John Hermon-Taylor. Detection and Verification of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in Fresh Ileocolonic Mucosal Biopsy Specimens from Individuals with and without Crohn's Disease. 2003 Disponible en: <http://jcm.asm.org/cgi/reprint/41/7/2915>

31.- Pathogen that Causes Disease in Cattle Also Associated with Crohn's Disease; Research Urgently Needed to Evaluate Potential Risks to Humans. 2005 Disponible en: URL://www.asm.org/?option=com_content&view=article&id=60291&Itemid=417

32.- Pérez E., Sobrino S., García VAM, Abdo M, Murguía D, Bernal F. Enfermedad de Crohn. Experiencia médico-quirúrgica. Estudio retrospectivo de 10 años. Revista Gastroenterología México 1992; 57 (1):21-26

33.- Rodríguez LGA. Enfermedad inflamatoria: Epidemiología y patogénesis, Méd Sur 2001;8(3): 84-89.

34.- Mishina D, Katsel P, Brown ST, Gilberto ECAM and Greenstein RJ. On the etiology of Crohn disease. Proc Natl Acad Sci. USA, septiembre 1996,93:9816-

9820.

35.- Juste RA, Marco JC, Saez de Ocariz C, Aduriz JJ. Comparison of different media for the isolation of small ruminant strains of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet Microbiol*. 1991; 28(4):385-390.

36.- Lambrecht RS, Carriere JF and Collins MT. A model for analyzing growth kinetics of a slowly growing *Mycobacterium paratuberculosis*. Factors that influence mycobactin. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1992; 15(3): 239-46.

37.- De Juan L, Alvarez J, Romero B, Bezos J, Catellanos E, Aranaz A, Mateos A, Domínguez L, Comparison of four different culture media for isolation and growth of type II and type I/III *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* strain isolated from cattle and goats. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72(9):5927-5932

38.- Payer JB, Jarnagin JL, Marquardt JG, Schaper LA, Martin BM. Métodos de laboratorio en Micobacteriología Veterinaria para el aislamiento e identificación de micobacterias. Laboratorio Nacional de servicios Veterinarios AMEX, Iowa.1992.

39.- . Tarabla D. Héctor. Epidemiología diagnóstica. Argentina 2000. 55:58

40.- <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/centros/ceiepaa/sistem>

9. Anexos

9.1. Reactivos requeridos para el desarrollo de la prueba de ELISA.

Suspensión de *Mycobacterium phlei*

5 g de *M. phlei*

Solución salina al 8.5% (NaCl 8.5%) cbp1l

Buffer Carbonato

5.3 de bicarbonato de sodio (Na₂CO₃)

Agua destilada c.b.p 1 l

Ajustar el pH a 9.6

Antígeno

0.04 mg de antígeno PPA3

1 ml de Buffer Carbonato

PBS-TG (solución amortiguadora tween gelatina)

8 g de Cloruro de sodio (NaCl)

0.2 g de cloruro de potasio (KCl)

1.44 g de fosfato dibásico de sodio (Na₂HPO₄)

0.24 de fosfato monobásico de potasio (KH₂PO₄)

Agua destilada c.b.p. 1l

Ajustar pH a 7.4

Esterilizar en autoclave a 121 ° C, 15 minutos

Agregar 1g de gelatina bacteriológica y 500ml de Tween 80

Conjugado

Diluir 1:4500 el anticuerpo anti-IgG en PBS-TG

Tampón citrato 0.05M

Solución de ácido cítrico monohidratado

22 g de ácido cítrico monohidratado (C₆H₈O₃)

Agua destilada c.b.p. 1 l

Solución de citrato sódico

22.49g de citrato sodico (Na₃ C₆H₅O₇)

Agua destilada c.b.p. 1 l

Mezclar 660 ml de solución de ácido cítrico con 470 ml solución citrato sódico, aforar a 2l con agua destilada. Ajustar el pH a 4.0.

Cromógeno

50 ml tampón citrato pH4+5.48 mg de ABTS

19ml de solución madre (10 ml de H₂O₂ + 120 ml de agua destilada)

Preparar al momento de utilizar protegiendo de la luz.

9.2. Cuestionarios

9.2.1 Trabajadores

1. ¿Es la única área en donde usted labora?
2. ¿Cuáles son las áreas donde labora?
3. ¿Con cuantos uniformes cuenta?
4. ¿Cada uniforme lo ocupa para cada área?
5. ¿Cada cuando limpia sus uniformes?
6. ¿Los desinfecta?
7. ¿Cómo?
8. ¿Cuenta con zapatos específicos para laborar?
9. ¿Cuántos pares tiene?
10. ¿Los desinfecta?
11. ¿Cómo?
12. ¿Cuándo entra al área donde labora hay tapetes sanitarios?
13. ¿Tiene una rutina de higiene antes de realizar su trabajo?

9.2.2 Encargados de Área

1. ¿Los animales con los que se trabaja están lotificados?
2. ¿Cuenta con un programa de medicina preventiva?
3. ¿En que consiste?
4. ¿Contra que enfermedades tienen un programa de control y en que consisten estos?
5. ¿Las diferentes áreas de animales cuentan con tapetes sanitarios?
6. ¿Cuál es la bioseguridad con las que cuenta el rancho?
7. ¿Cuántas personas visitan el rancho?
8. ¿Conocen la procedencia de estas personas?
9. ¿Tienen medidas de sanidad para estas personas?
10. ¿Las personas que laboran en cada área, Tienen pláticas acerca de la higiene y bioseguridad que debe de haber en cada área?

	Reemplazos	✓	✓	8	8
	Sementales	✓	✓	3	3
Especie	Categoría	Tipo de Muestra		Número de Muestras	
	Engorda	✓	✓	3	3
		Heces	Sangre	Heces	Sangre
	Cervatos	✓	✓	8	8
Bovinos	Productoras	✓	✓	38	38
	Reactoras	✓	✓	11	11
	Vaquillas	✓	✓	15	15
Ciervos	Vientres	✓	✓	46	46

9.3. CUADROS

Cuadro 1. Clasificación de animales, número y tipo de muestras, primer muestreo

Especie	Categoría	Tipo de Muestra			Número de Muestras		
		Heces	Sangre	Leche	He ces	San gre	Leche
Vaca	Productoras	✓	✓	✓	31	31	2
	Reactoras	✓	✓	✓	14	14	2
	Vaquillas	✓	✓	-----	17	17	-----
Ciervo	Vientres	✓	✓	-----	43	43	-----
	Reemplazos	✓	✓	-----	29	29	-----
	Sementales	✓	✓	-----	4	4	-----
	Engorda	✓	✓	-----	4	4	-----
	Cervatos	✓	✓	-----	33	33	-----

Cuadro 2. Clasificación de animales, número y tipo de muestras, segundo muestreo

	Reactoras	✓	✓	14	14
	Vaquillas	✓	✓	17	17
Especie	Categoría	Tipo de Muestra		Número de Muestras	
		Otras	✓	✓	17
		Heces	Sangre	Heces	Sangre
Ciervos	Vientres	✓	✓	41	41
Bovinos	Productoras	✓	✓	32	32

	Recría	✓	✓	14	14
	Reemplazos	✓	✓	14	14
	Sementales	✓	✓	4	4

Cuadro 3. Clasificación de animales, número y tipo de muestras, tercer muestreo

Cuestionario: Trabajadores áreas

Trabajadores	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Preguntas									
¿Es la única área en donde usted labora?	No	No	No	No	No	No	No	No	No
¿Cuáles son las áreas donde labora?	Cabras y ciervos	Cabras y ciervos	Cabras y ciervos	Cabras y ciervos	Bov. de carne y leche	Bov. de leche y agrícola	Cabras y Bov. de leche	Cabras y Bov. de leche	Cabras y Bov. de leche
¿Con cuantos uniformes cuenta?	Dos	Dos	Uno	Dos	Uno	Ninguno	Dos	Dos	Dos
¿Cada uniforme lo ocupa para cada área?	No	No	----- --	No	-----	-----	-----	-----	-----
¿Cada cuando limpia sus uniformes?	Cada tercer día	Cada tercer día	Cada tercer día	Cada tercer día	Diario	Diario me cambio de ropa	Cada tercer día	Cada tercer día	Cada cinco días
¿Los desinfecta?	No	No, solo los lavo	No	No, solo los lavo	No	No	Si	Si	Si
¿Cómo?	----- -	----- -	----- ---	----- -	----- -	-----	Cloro y jabón	Cloro y jabón	Cloro
¿Cuenta con zapatos específicos para laborar?	Si	Si	Si	Si	No	Si	Si	Si	Si
¿Cuántos pares tiene?	Dos	Dos	Dos	Dos	-----	Uno	Dos	Dos	Dos

Cuadro 13. Encuestas trabajadores

¿Los desinfecta?	No	No	No	No	Si	Si	Si	Si	Si
¿Cómo?	----	----	-----	----	Cloro y jabón	Cloro y jabón	Cloro y jabón	Cloro y jabón	Cloro y jabón
¿Cuándo entra al área donde labora hay tapetes sanitarios?	No	No	No	No	No	No	No	No	No
¿Tiene una rutina de higiene antes de realizar su trabajo?	No	No	Si, me lavo las manos, uso guantes cuando aplico cada tratamiento, y lavo el termómetro antes de utilizarlo para cada animal	No	No	No	Si, me lavo las manos, las desinfecto y utilizo guantes	Si, me lavo las manos, las desinfecto y utilizo guantes	Si, me lavo las manos, las desinfecto y utilizo guantes

Cuestionario encargados del área

Encargados	Encargados bovinos de leche	Encargado cabras	Encargados ciervos
Preguntas			
¿Los animales con los que se trabaja están lotificados?	Si	Si	Si
¿Cuenta con un programa de medicina preventiva?	Si	Si	Si
¿En que consiste?	Vacunación, bacterinización, pruebas de diagnostico de mastitis, tuberculoso (TB), brucilla	Control de brucelosis, campaña control de Artritis Encefalitis Caprina (AEC),y PTB	
¿Contra que enfermedades tiene un programa de control y en que consisten estos?	California Mastitis Test (CMT), así como diagnostico de tuberculosis y brucella, pruebas oficiales de campaña	Separación de animales seropositivos a AEC eliminación de positivos	

¿Las diferentes áreas de animales cuentan con tapetes sanitarios?	No	No	No
¿Cuál es la bioseguridad con las que cuenta el rancho?	Máxima	Rebaño cerrado, cuarentena de animales nuevos	
¿Cuántas personas visitan el rancho?	Alrededor de 3000 personas	Alrededor de 300 personas	
¿Conocen la procedencia de estas personas?	Si	Si	
¿Tienen medidas de sanidad para estas personas?	Básicas, ropa y calzado adecuado y limpio	No	
¿Las personas que laboran en cada área, Tienen pláticas acerca de la higiene y bioseguridad que debe de haber en cada área?	Si, platicas	Si	

Cuadro 14. Encuestas encargados de área

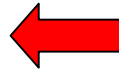
9.4. Marcas de Reactivos e Instrumental Utilizado

- ✓ Centrifuga 5810R Eppendorf/ Alemania
- ✓ Placas 96 pozos Sarstedt /Alemania
- ✓ Antigeno PPA-3 Allier Monitor, Inc/USA
- ✓ M. Fhlei Allier Monitor/ Inc USA
- ✓ Tween 80Merck/Alemania, NaCl Merck / Alemania, KCL Sigma Chemical/USA, Na_2HPO_4 Golden Bell/Méx, KH_2PO_4 J.T.Backer / Edo. Méx
- ✓ ABTS Sigma Chemical/USA,
- ✓ Cajas de petri Industrias Ruisanchez Méx,D.F.
- ✓ Agarosa Invitrogen / USA
- ✓ Azul de metilo, Fuscina Fenicada Hycel / D.F México, Alcohol High Purity
- ✓ Peptona de Carne Bioxon, Edo. Mex., Cloruro de Sodio Merck, Alemania, Agar Bacteriológico, Extracto de Carne Bioxon, Edo. Mex., Glicerol Jalmeck, N.L. Méx, Verde de Malaquita Merck, Alemania, Piruvato de Sodio Golden Bell; Jalisco, Méx, Alcohol High Purity,
- ✓ Micobactina Allied Monitor, USA, anfotericina B Sigma, USA, vancomicina Amresco, USA

✓ Tubos BD Vacutainer FERUM 7ml. BD Franklin Lakes NJ USA

✓ Venojet Multi-Sample 22G x 1^{1/5} USA

9.5. Fotografías



Fotografía 1-2 En esta fotografía se muestra como los ciervos se encuentran dentro de praderas, así como la falta de bioseguridad de dichos animales al no tener un tapete sanitario, flecha roja.



Fotografía 3,4 En estas dos fotografías se muestran la relación física que puede tener una persona ajena al rancho con ciervos.



Fotografía 5-6. Interacción de personas con corrales de ciervos sin uniforme ni medidas de bioseguridad adecuadas.





Fotografía 7-8. Manga de manejo dentro del área de ciervos nótese la falta de limpieza de estos.



Fotografía 9-10. En estas fotografías se muestra la falta de uniformes de los empleados dentro del área de ciervos, los cuales se comparten con el área de cabras.





Fotografía 11-12. En contraste en el área de bovinos de leche se encuentra el uso de uniforme.



Fotografía 13-14. Nótese la limpieza que hay dentro del área de bovinos



Fotografía 15-16. Uso de guantes y botas dentro del área de bovinos de leche

9.6. Croquis Sala de Ordeño

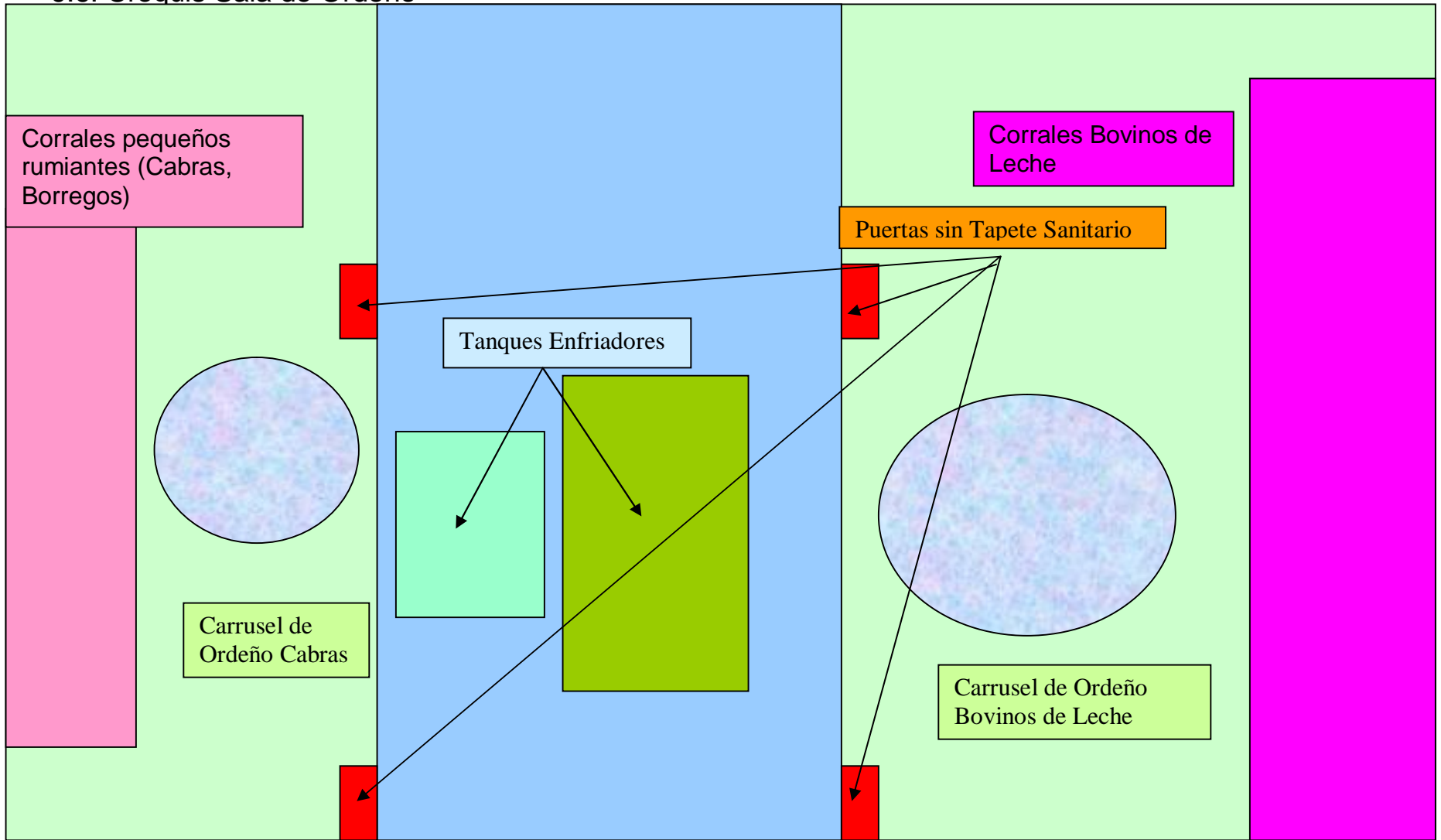


Figura 22 Croquis de la ordeña