



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“FACTORES DE RIESGO Y
SEROPREVALENCIA DE *Mycobacterium
avium* subespecie *paratuberculosis* EN DOS
UNIDADES DE PRODUCCIÓN LECHERA DE
LA REGIÓN CENTRO- NORTE DE MÉXICO.”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA:

ELIZABETH VELASCO GUTIÉRREZ

ASESORES

Dr. CSP. ORBELÍN SOBERANIS RAMOS

M en C. JESÚS DE N. ZAVALA HERNÁNDEZ

MÉXICO

2013





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 Dios por haberme permitido llegar hasta este punto en mi vida y rodearme de personas tan maravillosas.

A mis padres, Amalia y Alberto, quienes siempre con el ejemplo me han alentado a perseguir mis sueños, a nunca darme por vencida, ser ese apoyo y fortaleza incondicional.

A mis hermanos, Alberto e Illiana que a través de su compañía y alegría han iluminado cada momento de mi vida.

A mi abuelita, Esther quien siempre fue un punto de apoyo y quien siempre confió en mí.

A mis asesores, Orbelín y Jesús que más que mis asesores se convirtieron en mis amigos, en los cuales siempre encontré un consejo y mucha disposición para trabajar. Así como también con su incondicional ayuda hemos concluido con mucho esfuerzo este trabajo.

A Rodrigo, por siempre alentarme, creer en mí y estar en todo momento desde el inicio de este proyecto.

A mis amigas que son como mis hermanas, Mariana, Daniela e Ixchel por siempre estar a mi lado, tener un consejo, escucharme y por su amistad incondicional.

A mis amigos de la facultad, Moni, Richie, Fer, Chino, Hugo, Manu y Lalo, por acompañarme estos cinco años, por los momentos vividos y por compartir este sueño de convertirnos en Médicos Veterinarios.

A mi amiga Maya por estar conmigo, ser mi fortaleza en momentos de debilidad y escucharme siempre.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme formar parte de ella.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por formarme como profesionista e inculcarme esa ética profesional.

Al Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública así como del personal que ahí labora por permitirme formar parte de ellos y siempre tener las puertas abiertas para mi proyecto, así como del apoyo recibido.

Al Laboratorio de Patología y Diagnóstico en Salud Animal del Grupo Industrial de la Leche, S.A, así como del personal, por el apoyo en especie para darle pies y cabeza a este proyecto, por darme la oportunidad de formar parte de esta empresa y hacerme sentir como parte de ustedes.

A mis sinodales, el Dr. Jorge Ávila García por sus observaciones y toda su disposición para enriquecer este trabajo. Al Dr. Tomás Más, Dra. Ina Ramírez y la Dra. Lucía Favila por tomarse el tiempo de leer este trabajo y siempre enriquecerlo para concluirlo de la mejor manera.

A las Unidades de Producción Lechera en las que se realizó el estudio por siempre estar en la mejor disposición para trabajar conmigo y por todo el apoyo recibido.

A Elfego Maldonado por todo el apoyo, comprensión y recibirme en su área de trabajo.

A Omar por atender mis dudas y proporcionarme material para enriquecer este trabajo

Al personal del Laboratorio de Medios de la FMVZ- UNAM por abrirme las puertas y brindarme una oportunidad de seguir aprendiendo.

CONTENIDO

RESUMEN.....	7
INTRODUCCIÓN.....	9
Justificación	25
Hipótesis	26
Objetivos	27
MATERIAL Y MÉTODOS.....	28
RESULTADOS	36
DISCUSIÓN.....	59
CONCLUSIÓN	64
REFERENCIAS	66
ANEXOS.....	83

RESUMEN

VELASCO GUTIÉRREZ ELIZABETH. Factores de riesgo y seroprevalencia de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* en dos unidades de producción lechera en la región Centro- Norte de México (bajo la dirección de: MVZ. M. en C. Dr. CSP. Orbelín Soberanis Ramos y MVZ. M en C. Jesús de Nazare Zavaleta Hernández).

Se determinó la prevalencia de MAP por prueba de ELISA en dos sitios de estudio (UPL1: Jalisco y UPL2: Aguascalientes) así como también se elaboró un cuestionario para determinar los factores de riesgo en cada Unidad de Producción Lechera y se realizó un programa de control y bioseguridad en base a los resultados obtenidos por producción.

Así mismo, se analizaron los datos junto con los resultados de las pruebas a través del paquete estadístico STATA 11.0®, en donde se determinaron los factores de riesgo por unidad de producción, se calculó y se obtuvo la prevalencia.

Se muestrearon 223 animales en total, el 51.5% (115/223) corresponde a la UPL1, y el 48.5% (108/223) a la UPL2. En la UPL1, el 20% (23/115) resultaron positivos y sólo el 0.87% (1/115) sospechosos a MAP por prueba de ELISA. En la UPL2, el 73.14% (79/108) resultaron positivos y el 2.79% (3/108) sospechosos. Si conjuntamos ambos resultados se obtuvo el 45.74% (102/223) de animales positivos y el 1.79% (4/223) de animales sospechosos a MAP por prueba de ELISA. Al realizar el análisis bivariado y de regresión logística, se observó que aquellas vacas que pertenecían a la UPL2 (RM 3.03 IC 95% 1.95-4.73) tenían más posibilidades de resultar positivas a la prueba de ELISA ($p < 0.05$).

Al analizar las variables presentes en la UPL2 se obtuvo una OR de 10.89 ($p < 0.05$), es decir que las vacas presentes en la UPL2 tienen 10.8 veces más probabilidad de obtener un resultado positivo por prueba de ELISA para la detección de anticuerpos contra MAP que las vacas de la UPL1.

Así mismo, se determinó para la prueba utilizada una sensibilidad del 97.06% y una especificidad del 100%.

INTRODUCCIÓN

La paratuberculosis o enfermedad de Johne fue descrita por primera vez en 1895 por H.A Johne y L. Frothingham en Alemania¹ y en Estados Unidos en 1908. Actualmente su distribución es mundial y es considerada como una de las enfermedades más importantes que afectan a los rumiantes².

Se ha descrito a la paratuberculosis como una enteropatía de larga incubación que ocasiona diarreas intermitentes, mala absorción, emaciación e incluso la muerte³, afectando a los rumiantes domésticos y silvestres. Sin embargo se han reportado casos en diferentes aves⁴, ratones, ratas, liebres, zorros⁵, cerdos⁶ y primates⁷, que no desarrollan la enfermedad, pero se consideran portadores del agente causal.

La paratuberculosis es causada por *Mycobacterium avium paratuberculosis* (MAP), que pertenece al complejo *Mycobacterium avium* (MAC). Se ha clasificado al MAC como bacilos ácido alcohol resistentes de crecimiento lento⁸. Los microorganismos pertenecientes a este complejo, son oportunistas y capaces de infectar tanto a los humanos como a los animales⁹⁻¹¹.

El complejo está compuesto por 28 serovariedades de las especies *Mycobacterium avium* y *Mycobacterium intracellulare*, algunos autores consideran un tercero; *Mycobacterium scrofulaceum*. No obstante, las subespecies más importantes que alberga el complejo son: *Mycobacterium avium* (MAA), *Mycobacterium avium*

silvaticum (MAS), *Mycobacterium avium paratuberculosis* (MAP) y *Mycobacterium intracellulare*⁸.

De manera general, el complejo produce tres diferentes tipos de colonias⁸.

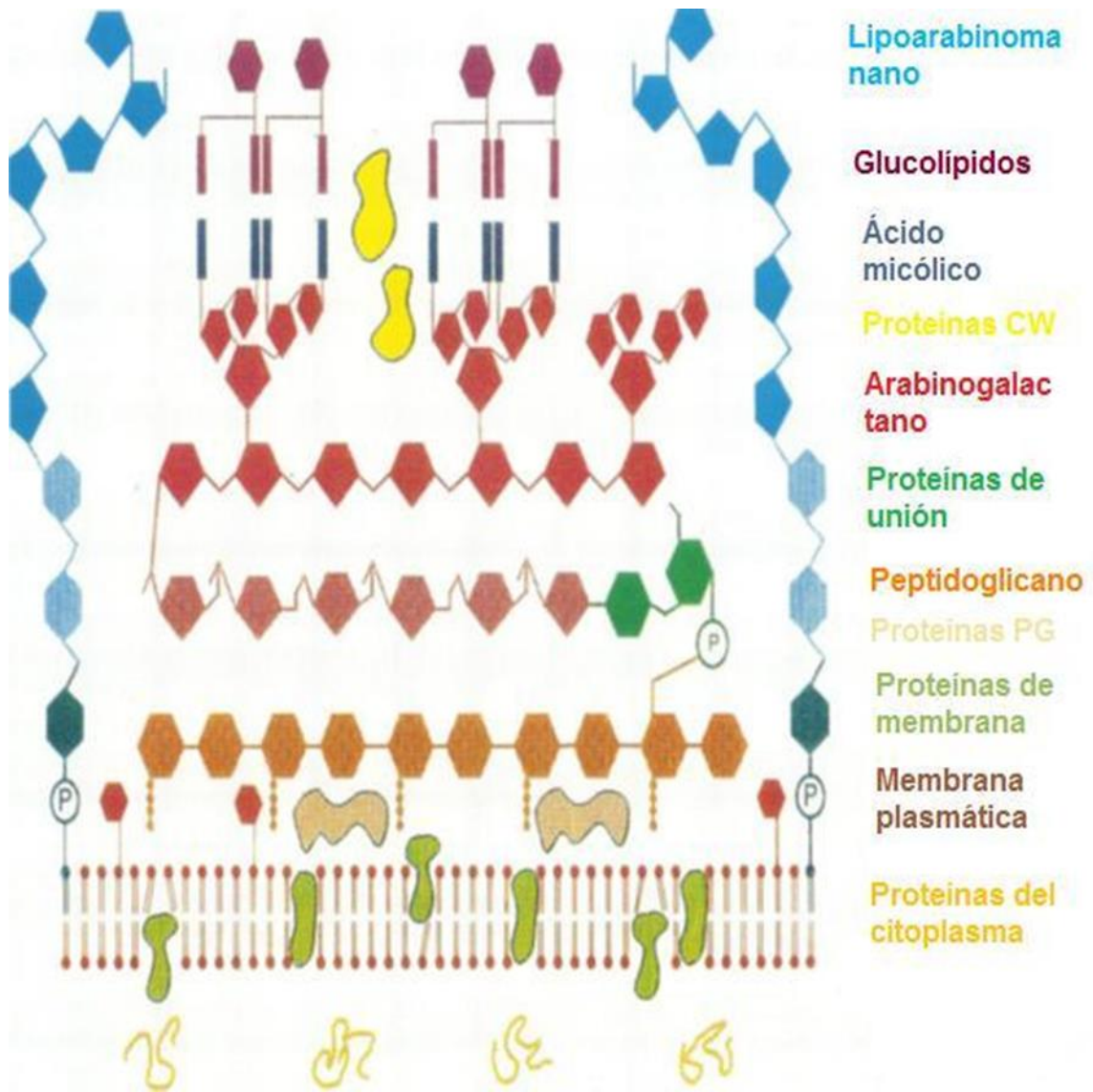
- 1) Colonias lisas, opacas y en forma de cúpula.
- 2) Colonias lisas, transparentes y planas.
- 3) Colonias “duras”.

Sin embargo, la característica más importante del complejo es la estructura de la membrana, la cual está compuesta de diversas proteínas solubles, carbohidratos y lípidos⁸.

La membrana básicamente está compuesta de tres macromoléculas insolubles; arabinogalactano, peptidoglicano y ácido micólico, que juntos constituyen el micolarabinogalactanpeptidoglicano, que es el núcleo de la pared celular que a la vez constituye uno de los dos lipopolisacáridos (LPS) más comunes en todas las micobacterias. El otro LPS corresponde al lipoarabinomanano¹² (Figura 1).

Otra característica destacable para las micobacterias pertenecientes al complejo es que son resistentes a la mayoría de los antibióticos utilizados frecuentemente^{13, 14}. Esta característica se debe a la estructura de su pared celular y la impermeabilidad que ésta le confiere^{15, 16} y porque son capaces de producir β - lactamasas¹⁷.

Figura 1. Estructura de la membrana celular del MAC⁸ (modificado).



Finalmente, los microorganismos pertenecientes al MAC son ubicuos, es decir pueden ser aislados de manera natural en el agua, charcos, suelo, plantas y polvo¹⁸⁻

MAP, presenta las mismas características descritas para el MAC. Pero además, esta subespecie tiene características fenotípicas y genotípicas únicas. Fenotípicamente destaca su dependencia a la micobactina²², que es un compuesto producido en condiciones limitantes de hierro, para poder transportar el metal al interior de la célula²³.

Genotípicamente, se habla que presenta múltiples copias del elemento de inserción, IS900^{24, 25}, también presenta otros elementos de inserción en su genoma como IS*Mav2*, IS1311, los dos primeros exclusivos de MAP y el último común a todas las micobacterias del MAC²⁶.

En términos generales, MAP es un bacilo ácido alcohol resistente, no formador de esporas, sin motilidad, aerobio estricto, sin embargo, no muere en ausencia de oxígeno por tres meses a 39°C²⁷.

Se le conoce como un parásito obligatorio, patógeno, capaz de vivir dentro de los macrófagos del huésped²⁷. Adicionalmente, se conocen dos tipos de cepas de MAP, la cepa C (“cattle”) y la cepa S (“sheep”), denominadas inicialmente así por el hospedador donde se encontraron, en la actualidad se ha debatido la existencia de otra cepa más, encontrada en el bisonte considerada como una cepa intermedia (cepa I)²⁸. Hoy en día, esta denominación ya no se utiliza, la cepa S cambió por la cepa I, la cepa C por cepa II y la cepa del bisonte por cepa III²⁹.

Sin embargo, se ha demostrado que la cepa III o intermedia como algunos autores la denominan, es sólo una variante de la cepa I y no existe una tercera como tal³⁰.

Las cepas de MAP difieren en cuanto a la facilidad del aislamiento y la velocidad del crecimiento, la cepa II es más fácil de aislar en medios artificiales, crece bien en medios sólidos o líquidos enriquecidos con micobactina y comienza su desarrollo entre la semana 4 a la 16. Mientras que la cepa I o cepa III, crece de manera más lenta y es mucho más exigente, el tiempo de desarrollo varía de 4 hasta 12 meses³¹, se sabe que es necesario adicionar micobactina J para el crecimiento de esta cepa, no obstante, otros autores han establecido que ésta no es necesaria^{32, 33}.

En general, los tipos de cepas de MAP no se pueden diferenciar de acuerdo a la morfología de sus colonias, pero si se pueden diferenciar por el tipo de pigmento producido, ya que la cepa I produce un pigmento amarillo tanto *in vitro* como *in vivo* y produce lesiones más severas en comparación con la cepa II³⁴.

MAP tiene la capacidad de evadir el sistema inmune del hospedador alojándose en los macrófagos, por lo tanto puede considerarse un patógeno intracelular. MAP llega al hospedador a través de diversas maneras: uterina, semen, transferencia de embriones, las cuales son vías de transmisión vertical consideradas como poco frecuentes. A la vez existe la vía de transmisión horizontal, por medio de fuentes contaminadas con MAP, tales como alimento contaminado con heces, heces, leche y el calostro proveniente de animales infectados³⁵.

La vía fecal-oral es el mecanismo de transmisión más común, una vez ingerido el MAP llega al tejido linfóide del intestino (Placas de Peyer) activando en el hospedador los mecanismos de defensa, principalmente las células M³⁶ y los macrófagos subepiteliales de la lámina propia³⁷.

Primeramente, MAP busca introducirse a las células M o en su defecto a las células epiteliales de las vellosidades de las placas de Peyer³⁸⁻⁴³. Las células M representan el primer objetivo de MAP debido a la presencia de lisosomas y enzimas hidrolíticas que contienen⁴⁴. MAP logra pasar inadvertido por las células M debido a las propiedades antigénicas que presenta la micobacteria, ya que cuenta con proteínas de fijación de fibronectina (FN) que facilitan la entrada de la micobacteria formando un puente con las integrinas $\beta 1$ localizadas en las células epiteliales del intestino^{43, 45-47}.

La preferencia que tiene MAP de unirse a las células M y no a los enterocitos se debe a la gran cantidad de integrinas $\beta 1$ existentes en el lumen de las células M, todavía no está del todo claro cómo MAP invade las vellosidades epiteliales, pero se cree que se debe a un mecanismo dependiente de la fibronectina^{45, 46}.

Aunque MAP vive en los macrófagos, las células epiteliales juegan un papel muy importante para la colonización de éstos, ya que se cree que de la misma manera en que se invade a las células epiteliales lo hace con los macrófagos³⁷.

Una vez invadidas las células M, MAP se encontrará con células dendríticas y/o macrófagos, donde comenzará una interacción a través de su pared celular cuyo lipoarabinomanano y glucolípidos manosilados (ManLAM), se unirán al receptor de las células dendríticas denominado: DC- SIGN⁴⁸. Estratégicamente MAP invade a este tipo de células, cuya principal función es presentar las bacterias al tejido linfóide del intestino, siendo así como logra evadir las barreras de defensa para poder ser transportado a la lámina propia e interactuar con los macrófagos subepiteliales³⁷.

Es importante mencionar que la interacción ManLAM- DC- SIGN es la responsable de la respuesta Th₂ durante la infección por MAP³⁷.

MAP a través de su ManLAM interactúa con sus receptores ubicados en la superficie de los macrófagos para poder invadirlos, sin embargo, la mejor interacción que existe entre MAP y los macrófagos se da a través de los receptores de manosa, mejorando así la fagocitosis de MAP^{47, 49-51}.

Al principio de la infección, los macrófagos se encuentran no activados, por lo tanto son incapaces de fagocitar a las micobacterias que se encuentren dentro de éstos, por otra parte, la micobacteria impide la formación del fagolisosoma, permitiendo la evasión del sistema inmune y su replicación al interior del macrófago no activado³⁶.

Una vez que MAP logra entrar a los macrófagos, comienza a replicarse y el sistema inmune del hospedador comienza a actuar con la respuesta Th₁^{50, 52, 53}. Durante la

respuesta Th₁ se produce IFN- γ y algunas IgG₂, así como también MAP es eliminado en pequeñas cantidades⁵⁴.

MAP impide la unión fagosoma- lisosoma debido a que evita la maduración del fagosoma afectando así la interacción entre el macrófago y las células T haciendo inefectiva la respuesta Th₁. Durante la replicación de MAP en los macrófagos, las células del hospedador han sido limitadas, por lo que MAP logra salir de las células fácilmente induciendo así apoptosis e interactuando con los macrófagos vecinos.

Los macrófagos infectados migran a las vías linfáticas al mismo tiempo que la enfermedad va progresando para obtener así una propagación bacteriana hacia los linfonodos regionales, incluyendo los mesentéricos^{39, 55-57}. Es importante mencionar que MAP continúa replicándose en los linfonodos mesentéricos, observándose así las lesiones macroscópicas típicas de la enfermedad; descritas como “intestino de lavadero”, que es un engrosamiento y corrugamiento de la pared intestinal⁵⁶.

Una vez dentro del macrófago, MAP permanece invisible para el sistema inmune, en especial para las células T³⁷.

El bovino que está infectado con MAP inicialmente desarrolla una respuesta inflamatoria. Esta respuesta disminuye conforme va progresando la infección, favoreciendo la respuesta de Th₂ y produciendo anticuerpos primeramente IgM y sucesivamente IgG₂³⁶ los cuales no pueden controlar el proceso infeccioso^{54, 58- 60} (Figura 2).

La paratuberculosis bovina tiene un largo período de incubación que va desde uno hasta quince años³⁵ y en la mayoría de los animales la presentación es subclínica donde se encuentran eliminando a la micobacteria por lo que contaminan el agua, suelo, cama, alimento y con ello infectan a los animales sanos⁶¹.

A su vez, la enfermedad se clasifica en cuatro estadios: infección silenciosa, infección subclínica, enfermedad clínica y enfermedad clínica avanzada^{62, 63} (Figura 3).

Los signos clínicos tardan en aparecer, por lo que el diagnóstico constituye el mayor reto para la erradicación y control de la paratuberculosis, ya que se requiere del uso de pruebas que permitan identificar a los animales positivos en cualquier estadio de la enfermedad. Al principio de la infección, aparece una respuesta inmune del tipo Th₁ o celular donde predominan las citosinas proinflamatorias como el IFN- γ , TNF- α , IL- 12⁶⁵ en esta etapa es conveniente el uso de pruebas diagnósticas como la intradérmica o la de IFN- γ .

Mientras que para el intervalo existente entre la inmunidad celular y humoral, que es donde la micobacteria comienza a ser eliminada, es conveniente el uso de pruebas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), aislamiento bacteriológico. Para la última fase, donde se presenta la respuesta inmune del tipo Th₂ o humoral, es de mucha utilidad realizar pruebas que midan la cantidad de anticuerpos contra MAP tales como la inmunodifusión en gel agar (IDGA), fijación del complemento (FC), ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)^{36,66}

Figura 2. Invasión de MAP a las células M y macrófagos³⁷ (modificado)

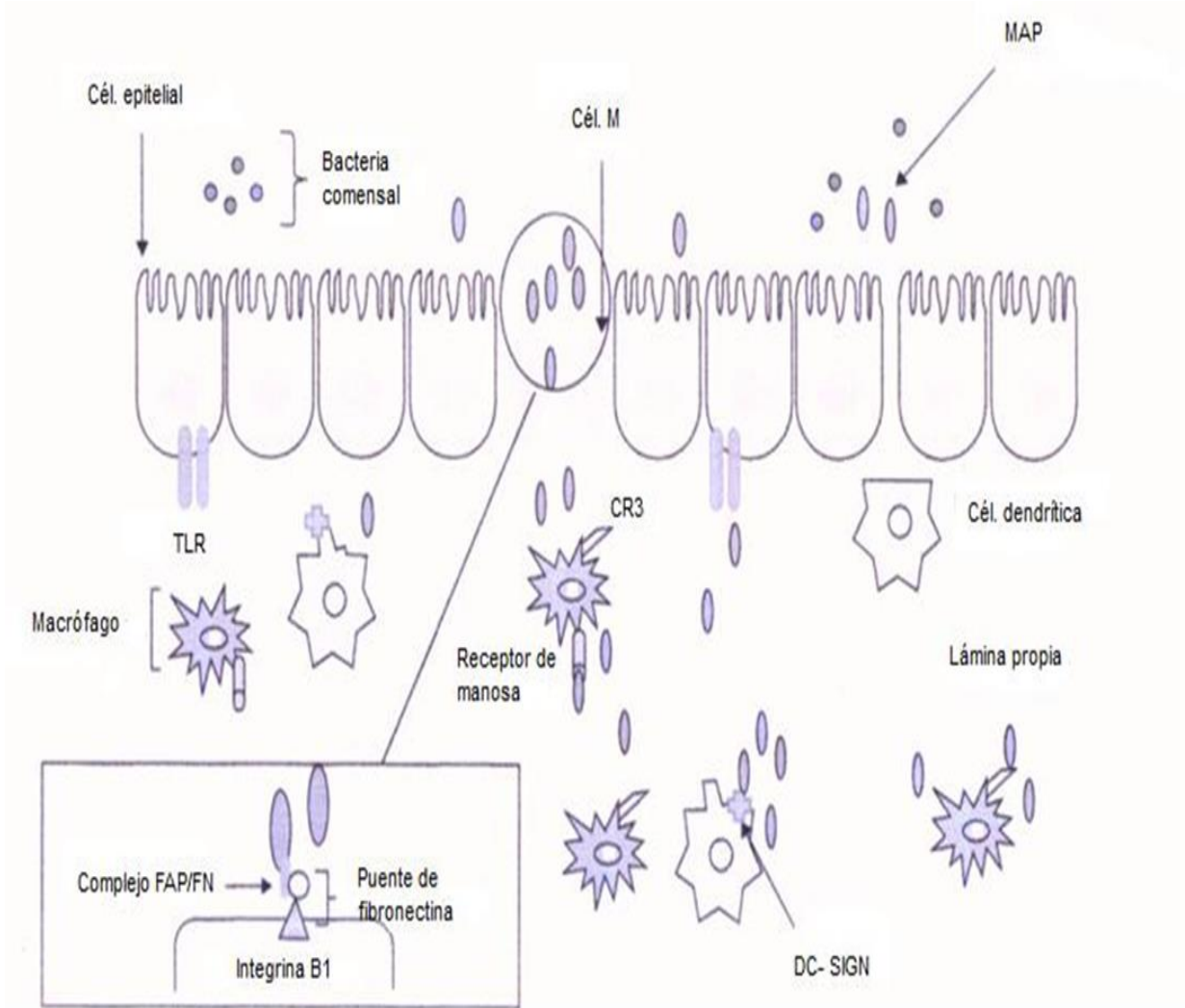
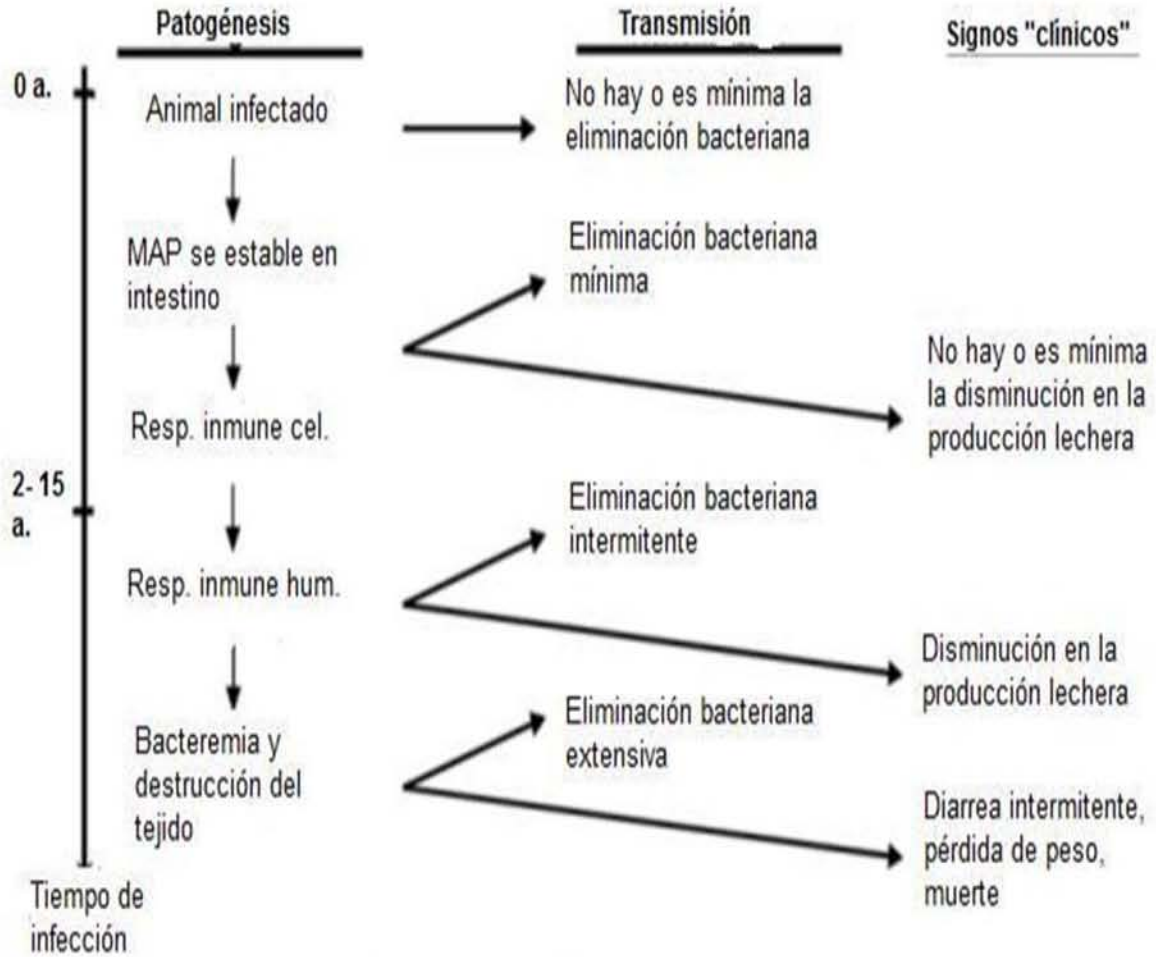


Figura 3. Patogénesis, transmisión y signos de la paratuberculosis⁶⁴ (modificado)



El método de diagnóstico más común y utilizado es la prueba de ELISA. Además ha sido recomendada por la Asociación de Salud Animal de Estados Unidos (USAHA) para identificar bovinos y hatos infectados⁶⁷.

Se han realizado diversos estudios donde se ha determinado que la prueba de ELISA tiene una sensibilidad del 70 al 94% y una especificidad de 41 al 100%⁶⁴. Sin embargo, algunos autores sugieren realizar una confirmación del diagnóstico, ya que existe la posibilidad de tener resultados falsos positivos (animales que la prueba los determina como positivos pero que no están infectados), lo que puede deberse al muestreo en estadio temprano de la enfermedad o reacciones cruzadas que pueda haber con otras micobacterias^{68, 69- 71}, así como la capacidad individual del sistema inmune⁷². También es importante mencionar que variará la especificidad y sensibilidad de la prueba de acuerdo al kit comercial utilizado (Cuadro 1).

Se han realizado diversos estudios para determinar la efectividad de la prueba de ELISA para el kit comercial utilizado en este trabajo. En el 2002, Nielsen *et al*, observaron que la sensibilidad de la prueba de ELISA fue de 27-86% y que la especificidad se encuentra entre un 55-98% en bovinos⁷¹. Mientras que para el 2000, Gasteiner *et al*, utilizaron en dos grupos diferentes la prueba de ELISA, una en animales clínicos y otra en animales subclínicos a paratuberculosis y encontraron una sensibilidad entre 70- 74% y una especificidad entre 82-98%⁷³. Así mismo, Whitlock *et al*, observaron una sensibilidad entre 15- 75%⁷⁴. Mientras que en estudios anteriores se reportó una sensibilidad entre 15- 87% en bovinos⁷⁵ y para

1992 se había reportado una sensibilidad entre 47- 65% en bovinos, la menor sensibilidad se debe a los animales subclínicamente afectados⁷⁶.

En la práctica se han observado ciertas ventajas en la prueba de ELISA con respecto a otras pruebas diagnósticas, entre ellas destaca el poco tiempo utilizado para obtener un resultado, la posibilidad de muestrear a una gran cantidad de animales, el costo por animal y actualmente la capacidad de la prueba para evitar reacciones falsas positivas. Se ha reportado que la preabsorción del suero con *Mycobacterium phlei* reduce las reacciones cruzadas en la prueba, por lo tanto elimina a los falsos positivos⁷⁷. Este principio hoy en día se mantiene en algunos kits comerciales⁷⁸ logrando obtener una especificidad cercana al 100%^{77, 79}.

El kit comercial de IDEXX[®] es el más utilizado en Estados Unidos para determinar la prevalencia de la paratuberculosis en los establos lecheros en donde se ha estimado una sensibilidad y especificidad para este kit del 45 y 99% respectivamente en bovinos de alrededor de dos años y que no han mostrado signos clínicos aún. Sin embargo, el kit en general reporta una sensibilidad del 83% y una especificidad del 89%⁸⁰.

Estudios realizados en establos lecheros de Estados Unidos han demostrado que si se muestrean a los animales por un período de tiempo prolongado, es decir tres meses después del muestreo inicial, los resultados negativos seguirán siendo negativos, los positivos se mantendrán como positivos y los sospechosos se volverán positivos en el 23% de los casos. Es así, como se podrá determinar la

seroprevalencia en los diferentes establos lecheros del país y se podrá realizar un programa de control de la enfermedad⁸¹.

Esta prueba tiene la capacidad de poder aplicarse a grandes hatos e incluso también se aplica en la leche de tanque, pudiendo así determinar la seroprevalencia de la enfermedad en diversas regiones. Diversos países han obtenido diferentes valores de seroprevalencia a través de la prueba de ELISA como Nueva Zelanda, donde se determinó el 3-6%⁸², Brasil con el 2.7%⁸³, Italia reportó un 7.5%^{84, 85, 86}, Canadá un 4.8%⁸⁷, Estados Unidos 3%⁸⁸, Uruguay 16.02%⁸⁹ y Eslovenia 4.77%⁹⁰.

Hasta el día de hoy no existe un tratamiento efectivo que ayude a combatir la paratuberculosis además de no estar permitidos en animales de producción, excepto la monensina que en países como Canadá es utilizada como método de control, sin embargo no es tan efectivo⁸⁸. Los medicamentos que se han utilizado van encaminados a la disminución de los signos clínicos, pero no evitan la eliminación del MAP de los animales positivos ni la proliferación en los tejidos⁸⁸.

Históricamente se había utilizado la isoniazida como tratamiento contra la paratuberculosis reportándose con éxito, sin embargo la isoniazida únicamente mata al MAP en fase de crecimiento. Otro tratamiento utilizado con éxito ha sido el uso de la clofazimina, medicamento de elección para la lepra humana, sin embargo como ya se había mencionado antes su uso se encuentra prohibido para animales de producción⁸⁸.

Cuadro 1. Sensibilidad y especificidad de diferentes kits comerciales de ELISA para la detección de anticuerpos contra MAP (modificado de Nielsen *et al*, 2008)

Prueba	Antígeno	Sensibilidad	Especificidad
Varios	ATCC 19698	0.50	--
HerdChek	IDEXX	0.87	--
Parachek	VRI316	0.77	--
Varios	ATCC 19698	0.48	1.00
HerdChek	IDEXX	--	--
HerdChek	IDEXX	0.74	0.88
HerdChek	IDEXX	0.25	0.94
HerdChek	IDEXX	0.36	--
HerdChek	IDEXX	0.32	0.98
Varios	LAM	0.60	0.83
Varios	PPA3	0.63	0.90
Varios	PPA3	0.63	0.69
Varios	PPA3	0.40	0.95
Varios	Varios	0.62	0.41
Varios	Varios	0.83	0.89
Varios	Varios	0.94	0.83
Varios	Varios	0.71	0.83
Parachek	VRI316	0.24	0.98
Parachek	VRI316	0.34	0.99
Varios	VRI316	0.37	0.94
HerdChek	IDEXX	0.31	0.95
HerdChek	IDEXX	0.24	1.00
SVANOVA	LAM	0.40	0.91
Varios	PPA3	0.80	0.90
IDEXX Scand	Varios	0.33	0.93
IDEXX Scand	Varios	0.26	0.97
Pourquier	Varios	0.28	1.00
SERELISA	Varios	0.45	0.85
Varios	Varios	0.81	1.00
HerdChek	IDEXX	0.09	0.98
Parachek	VRI316	0.80	0.90
Varios	Varios	0.47	1.00
Parachek	VRI316	0.31	0.98
HerdChek	IDEXX	0.09	0.98
Varios	LAM	0.18	0.96
SVANOVA	Varios	0.17	0.91
Parachek	VRI316	0.07	0.96
Parachek	VRI316	0.22	--
Parachek	VRI316	--	0.99
Parachek	VRI316	--	1.00
Parachek	VRI316	--	0.98

La paratuberculosis se ha convertido en una de las enfermedades más importantes que afecta a los rumiantes a nivel mundial y se encuentra en la lista de enfermedades, infecciones e infestaciones comunes a varias especies de la OIE⁹¹.

Actualmente se ha debatido la relación entre la paratuberculosis y la enfermedad de Crohn que afecta a los humanos, cuestionándose su relación e importancia para la salud pública. La evidencia que respalda a MAP como causa de la enfermedad de Crohn es porque se ha aislado a la micobacteria de pacientes con Crohn⁹². Sin embargo, la enfermedad de Crohn al tratarse de un síndrome sus causas son multifactoriales. Existen dos teorías sobre la patogénesis de la enfermedad de Crohn: la autoinmune y la micobacterial. La teoría autoinmune sugiere que hay un defecto en la retroalimentación de los controles de la respuesta inmune, es decir, hay una irregularidad donde existe un exceso de Th₁ logrando así que la respuesta inmune se inicie y persista. Mientras que la teoría micobacterial, establece que MAP estimula la respuesta de Th₁⁹³.

También MAP se ha considerado como un patógeno potencial en los alimentos, algunos estudios sugieren que MAP es menos susceptible a ser destruida por algún tratamiento térmico como otras zoonosis bacterianas, entre ellas la *Listeria spp* y *Mycobacterium bovis*⁹⁴. En algunos estudios, se reporta que sobrevive a la pasteurización⁹⁵. Sin embargo, el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA: United States Department of Agriculture) no considera al MAP como un patógeno potencial para el humano⁹³.

Es importante enfatizar que el mejor método de eliminación y erradicación de la paratuberculosis es la higiene, seguido de la eliminación de animales positivos y un buen programa de bioseguridad para evitar introducir la enfermedad. El uso de la vacunación en bovinos se encuentra restringido debido a que interviene con las pruebas de diagnóstico de tuberculosis bovina⁸⁸.

Sin embargo, para que un programa sea efectivo es necesario conocer los factores de riesgo involucrados para poder prevenir y erradicar la enfermedad. Diversos estudios, han demostrado que los principales factores de riesgo para la presentación de la paratuberculosis son: poca higiene, alta densidad animal, volumen de producción, calostro y leche provenientes de animales infectados⁹⁶, acumulación de estiércol en el área de partos y su propagación a otras áreas^{97, 98}, que las becerras de recría provengan de madres seropositivas⁹⁹, estrés; parto, mala alimentación, deficiencias nutricionales¹⁰⁰, adquisición de animales cuyo estatus sea desconocido y propagación de estiércol¹⁰¹.

Justificación

La paratuberculosis es una de las enfermedades más importantes que afectan a los rumiantes, incluso se ha observado una mayor prevalencia en las vacas lecheras que las productoras de carne, debido a que existe una mayor densidad de población lo cual contribuye a la exposición de animales infectados con los que no lo están¹⁰²⁻

Su importancia radica en que dicha enfermedad tiene un largo período de incubación, la dificultad en el diagnóstico, el posible vínculo con la enfermedad de Crohn, pero lo más destacado son las altas pérdidas económicas que ocasiona al productor¹.

Las vacas infectadas con MAP pueden disminuir mensualmente su producción lechera entre 0.05 a 1 kg comparadas con las no infectadas¹⁰⁶. Otras pérdidas son la infertilidad, la susceptibilidad a otras enfermedades, acortamiento de la vida del ganado pues al tratarse de una enfermedad incurable es considerada como una casusa de desecho prematuro¹.

En Estados Unidos se cuantificaron las pérdidas que ocasionaba dicha enfermedad para la industria lechera por un monto de 1.5 billones de dólares anuales¹.

En México, se desconoce la magnitud y trascendencia que tiene MAP, sólo hay algunos estudios aislados.

Hipótesis

La prevalencia de *Mycobacterium avium paratuberculosis* en los hatos de bovinos lecheros, será muy similar a la reportada en estudios previos y estará asociada a las características de producción y alimentación en los hatos muestreados.

Objetivos

- Determinar la prevalencia de MAP por medio de la prueba de ELISA en los sitios de estudio.
- Diseñar, elaborar y aplicar un cuestionario para obtener los factores de riesgo relacionados a la infección por MAP en los establos estudiados que servirá como base para la elaboración de un diagnóstico de situación.
- Elaborar una propuesta de programa de control y bioseguridad con base en los resultados que se obtengan para los hatos del estudio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de estudio

El estudio se realizó en dos unidades de producción lecheras ubicadas en la región centronorte de México.

La Unidad de Producción Lechera 1 (UPL1) se encuentra ubicada en la comunidad de Bajío de San José, Jalisco. Geográficamente se encuentra a $21^{\circ} 31' 46.86''$ de latitud Norte y $102^{\circ} 14' 33.64''$ de longitud Oeste; a 1960 metros sobre el nivel del mar (Figura 4).

Figura 4. Vista satelital de la UPL1 a través de Google Earth®



La Unidad de Producción Lechera 2 (UPL2) localizada en el municipio de Aguascalientes, Aguascalientes. Geográficamente se encuentra a $21^{\circ} 46' 55.16''$ de latitud Norte y $102^{\circ} 17' 26.34''$ de longitud Oeste; a 1850 metros sobre el nivel del mar (Figura 5).

Figura 5. Vista satelital de la UPL2 a través de Google Earth®



Población Animal

UPL1

Constituido por un total de 511 cabezas de ganado bovino especializado en la producción lechera de la raza Holstein- Fresian. El 48.92% (250) de la población son vacas en producción, el 6.65% (34) son vacas en período seco, 36.20% (185)

son vaquillas que van a tener su primer parto (>15 meses), el 8% (40) son becerras y 0,39% (2) de la población corresponde a los sementales.

UPL2

El inventario es de 5,767 cabezas de ganado bovino especializado en la producción lechera de la raza Holstein- Fresian. El 55.85% (3,221) de la población son vacas en producción, el 9.90% (571) son vacas en período seco, 12.13% (700) son vaquillas que van a tener su primer parto (>15 meses), 22.02% (1,270) son becerras y 0.08% (5) de la población corresponde a los sementales.

Tamaño mínimo de muestra

Se determinó considerando la población en producción de bovinos lecheros en cada uno de los establos UPL1 (n=250) y UPL 2 (n=3,221), así como también se consideraron los antecedentes de prevalencia de esta enfermedad en Aguascalientes (60.4%), un nivel de confianza del 96% y un error del 0.15, utilizando la fórmula de proporciones de Levy¹⁰⁷.

$$n = \frac{z^2 N P y (1 - P y)}{z^2 P y (1 - P y) + (N + 1) E^2 P y^2}$$

Donde:

n = tamaño de la muestra requerido

z = nivel de confianza (1.96)

N = población animal

P_y = proporción en que existe el fenómeno de la población (0.604)

$1 - P_y$ = (1- 0.604)

E = nivel de precisión (0.15)

Por lo tanto para la UPL1= $(1.96)^2(250)(0.604)(1-0.604)/((1.96)^2(0.604)(1-0.604)+(250+1)(0.15)^2(0.604)^2= 78$. Para la UPL2= $(1.96)^2(3221)(0.604)(1-0.604)/((1.96)^2(0.604)(1-0.604)+(3221+1)(0.15)^2(0.604)^2= 108$. Con un 95% de confianza y un 80% de poder estadístico el tamaño mínimo de muestra para la UPL1 es de 78 animales para prueba de ELISA y para la UPL2 de 108.

Toma de muestras de sangre

Las muestras fueron tomadas por personal capacitado del Laboratorio de Patología y Diagnóstico en Salud Animal así como personal de las Unidades de Producción Lechera. Se utilizó material estéril y nuevo para realizar la flebotomía en la vena caudal de las vacas, en donde se obtuvieron 10 mL de sangre en tubo Vacutainer®, se dejaron las muestras por 20- 30 minutos a temperatura ambiente para esperar la retracción del coágulo, posteriormente se colocaron las muestras en la hielera con refrigerante donde fueron enviadas al laboratorio para su procesamiento. En el laboratorio se centrifugaron las muestras a 2500 rpm durante 5 minutos para la obtención de suero.

Criterios de inclusión

Los animales a muestrear fueron todos aquellos que cumplieron con los siguientes criterios:

1. Hembras
2. Animales mayores a 15 meses de edad
3. Con autorización del dueño

Período de tiempo

La UPL1 se muestreó durante el 2011 donde se obtuvieron 6 muestras y en 2012 se obtuvieron 109. Mientras que en la UPL2 durante el 2012 se obtuvieron 77 muestras y principios del 2013, 31 muestras.

Prueba de ELISA

El procesamiento de los sueros se realizó en el Laboratorio de Patología y Diagnóstico en Salud Animal de Aguascalientes. Los sueros fueron probados mediante la técnica de ELISA utilizando los reactivos comerciales específicos para la detección de anticuerpos frente a *Mycobacterium paratuberculosis* de IDEXX® laboratorios. La técnica se llevó a cabo de acuerdo al instructivo facilitado por el fabricante (Anexo 1).

Se calculó la media del control positivo de la siguiente manera:

$$Cpx = \frac{CP1 A450 + CP2 A450}{2}$$

Donde:

Cpx= Media del control positivo

CP1 A450= Control positivo 1 leído a 450 nm

CP2 A450= Control positivo 2 leído a 450 nm

Así como también se calculó el porcentaje de M/P en las muestras analizadas a través de la ecuación de M/P%

$$M/P\% = \frac{\text{muestra A450} - \text{CN A450}}{\text{CPx A450} - \text{CN A450}} \times 100$$

Donde:

M/P%= Porcentaje de anticuerpos contra MAP

CN A450= Control negativo leído a 450 nm

CPx A450= Media del control positivo leído a 450 nm

Los criterios de validación a utilizar fueron los siguientes:

- Muestras con porcentaje M/P inferior o igual a 45% se consideraron negativas a la presencia de anticuerpos frente a MAP.
- Muestras con porcentaje M/P superior a 45% e inferior a 55% se consideraron dudosas y se repitió la prueba.
- Muestras con porcentaje M/P superior o igual a 55% se consideraron positivas a la presencia de anticuerpos frente a MAP¹⁰⁸.

Resultados de la prueba de ELISA

Se muestrearon 223 animales en total, el 51.5% (115/223) corresponde a la UPL1, y el 48.5% (108/223) a la UPL2 (Cuadro 2).

En la UPL1, el 20% (23/115) son positivos y sólo el 0.87% (1/115) es sospechoso a la presencia de anticuerpos contra MAP por prueba de ELISA (Cuadro 2).

En la UPL2, el 73.14% (79/108) son positivos y el 2.79% (3/108) es sospechoso a la presencia de anticuerpos contra MAP por prueba de ELISA (Cuadro 2).

En conjunto se obtuvo el 52.46% (117/223) de animales negativos, el 45.74% (102/223) de animales positivos y el 1.79% (4/223) de animales sospechosos a la presencia de anticuerpos contra MAP (Cuadro 2).

Cuadro 2. Distribución de los resultados de la prueba de ELISA en las dos UPL

Resultado	UPL1	UPL2	Total
Positivo	23	79	102
Negativo	91	26	117
Sospechoso	1	3	4
Total	115	108	223

Entrevista y Aplicación del cuestionario

Mediante entrevista a los encargados del establo a través de un cuestionario estructurado por diversas áreas: unidad pecuaria, sistema de producción, alimentación, reproducción, medicina preventiva y que en total contaba con 205 variables (Anexo 2).

Análisis de la información

Se utilizó el programa estadístico STATA 11.0¹⁰⁹, para un análisis descriptivo de cada una de las variables cualitativas y cuantitativas, mediante las frecuencias absolutas y relativas, así como por medio de la mediana, la moda, desviaciones estándar y varianzas en el caso de las cuantitativas. Además de un análisis bivariado para observar diferencias entre grupos, cuando las variables continuas presenten distribución normal se utilizó la prueba de “t”, en caso contrario el estadístico de U de Mann-Whitney; para las variables categóricas la prueba de X^2 . Se obtuvo la razón de momios (RM) y su intervalo de confianza al 95% para cada uno de los diferentes factores de riesgo y la variable dependiente principal^{110, 111} (Anexo 3).

De acuerdo a los resultados obtenidos, se elaboró un programa de bioseguridad para cada Unidad de Producción (Anexo 4).

Adicionalmente se realizó la PCR de muestras de intestino a seis animales de la UPL2 que resultaron positivos por prueba de ELISA, así como también el examen histopatológico (Anexo 5).

RESULTADOS

Cuestionario para determinar la situación sanitaria de la paratuberculosis

A continuación se describen los resultados para cada una de las variables analizadas en el cuestionario:

1) Datos generales

1.1) En la entrevista para el requisitado del cuestionario, en la UPL1 el encargado tiene laborando en el establo 27 años, mientras que para la UPL2 el encargado tiene laborando 7 años.

2) Unidad Pecuaria

2.1) Tanto la UPL1 como la UPL2 son establos propios

2.2) La UPL1 y la UPL2 cuentan con instalaciones tales como: bodega, corrales, sala de ordeño, parideros, oficina, casa habitación propia y casa habitación para los trabajadores. Adicionalmente la UPL1 cuenta con un área de aislamiento y la UPL2 con una manga de manejo.

2.3) Las UPL's están integradas por corrales divididos en diferentes áreas, en cada corral existe una densidad de población específica. A continuación se detalla el área de los corrales (Cuadro 3).

Cuadro 3. Distribución de la población animal por corrales en las UPL's

Corral	Área en m² de la UPL1	Número de animales en la UPL1	Área en m² de la UPL2	Número de animales en la UPL2
Enfermería	600	10	4800	133
Producción	1,800	250	129,600	3,221
Secas	600	34	14,400	181
Jaulas (becerreras)	625	40	9,000	316
Vaquillas	800	185	14,400	700
Reto	600	20	9,600	221
Gestantes	N/A	N/A	43,200	619

N/A: No aplica

2.4) En ambas producciones la raza de las vacas es Holstein- Fresian

2.5) La población animal de cada UPL se encuentra dividida en diversas etapas de producción y cada etapa cuenta con cierta cantidad de animales como se observa en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Distribución de la población en las UPL'S

División de animales con base en la producción	UPL1	UPL2
Vacas en producción	250	3,221
Vacas secas	34	571
Vaquillas	185	700
Becerras	40	1,270
Sementales	2	5
Total	511	5,767

2.6) La UPL1 cuenta con un total de 11 trabajadores, mientras que la UPL2 con un total de 51 trabajadores.

2.7) Los trabajadores que se encuentran laborando en cada UPL cuentan con ciertas actividades, las cuales se distribuyen de la siguiente manera (Cuadro 5).

Cuadro 5. Distribución de los trabajadores con base en su actividad u oficio en las UPL's

Oficio o actividad	UPL1	UPL2
Administrador	N/A	1
MVZ	2	4
Encargado	1	1
Pasturero	1	5
Becerrero	1	3
Ordeñador	3	24
Tractorista	1	6
Secretaria	0	1
Soldador	0	6
Jornalero	0	0
Barrendero	2	N/A
Total	11	51

N/A: No aplica

3) Sistema de producción

3.1) En la UPL1 la producción diaria de leche es de 6,500 L y en la UPL2 es de 85,000 L diarios.

3.2) El promedio de producción de leche por vaca en la UPL1 es de 26 litros, mientras que en la UPL2 es de 29.29 litros (Cuadro 6).

3.3) Las vacas en producción se dividen en la UPL1 por frescas, altas, medianas y bajas. Para la UPL2 la división de producción es de altas y medianas (Cuadro 6).

3.4) Además de la leche, las Unidades de Producción obtienen ingresos a partir de otras actividades, como la UPL1 por la venta de becerros calostrados y la UPL2 por venta de becerros sin calostrear (Cuadro 6).

3.5) El destino de la leche para ambas UPL´s es la venta de leche fluida a empresas particulares. La UPL1 a la empresa "2" y la UPL2 a la empresa "1" (Cuadro 6).

3.6) La UPL1 recibe un premio de 0.15 centavos por litro de leche si cumple con los estándares de calidad y sanidad impuestos por la empresa particular "2". Así como la UPL2 recibe un premio de 0.55 centavos por litro de leche si cumple con los estándares de calidad y sanidad que tiene la empresa "1" (Cuadro 6).

3.7) Tanto la empresa "1" como la empresa "2" exigen condiciones de alimentación, sanidad, ordeño y almacenamiento de la leche para poder comprarla, tales como ausencia de sustancias extrañas, bajo contenido de microorganismos, bajo contenido de células somáticas (<300,000), color, olor y sabor propios de la leche, almacenada a 4°C.

3.8) Las empresas encargadas de recolectar la leche en las UPL´s realizan periódicamente el conteo de las células somáticas de la leche de tanque (Cuadro 6).

3.9) Tanto la UPL1 como la UPL2 cuentan con un área de recría propia, en donde se reponen las vacas o vaquillas que se mueren o se llevan al rastro (Cuadro 6).

3.10) La UPL1 cuenta con servicios de Médicos Veterinarios Zootecnistas, sin embargo, los médicos atienden también otras explotaciones. En caso contrario, la UPL2 cuenta con los servicios de Médicos Veterinarios Zootecnistas que sí laboran exclusivamente para este estable (Cuadro 6).

Cuadro 6. Producción y calidad del producto terminado en las UPL's

Concepto	UPL1	UPL2
Producción diaria	6,500 litros	85,000 litros
Promedio producción/ vaca	26 litros	29.29 litros
Número de ordeños	2	3
División de producción	Frescas, altas, medianas y bajas	Altas y medianas
Ventas extras	Becerras calostradas	Becerras sin calstrar
Destino de la leche	2	1
Premio o penalización	+ 0.15	+ 0.55
Condiciones del comprador	Sí	Sí
Conteo de células somáticas	Sí	Sí
Recría	Propia	Propia
MVZ	Sí, atiende varias explotaciones	Sí, trabaja exclusivamente para este estable

3.11) En la UPL1 existe un promedio de 6 partos antes de ser consideradas como desecho y se den de baja. En la UPL2 el promedio es de 4.

3.12) Tanto la UPL1 como la UPL2 manejan diversos motivos por los cuales son desechadas sus vacas entre los que destacan: baja producción lechera, problemas reproductivos y problemas podales.

3.13) En ambas Unidades de Producción el principal destino de los animales que se desechan es el rastro.

3.14) En porcentaje, la UPL1 maneja un 45% de desechos anuales. Mientras que la UPL2 maneja un 31% de desechos anuales.

3.15) El manejo de las becerras después del nacimiento es similar en ambas Unidades de Producción, el cual consiste en la limpieza y desinfección del cordón umbilical, la administración de calostro, aplicación de vacunas y aretado. Adicionalmente, la UPL2 realiza refractometrías en las becerras después de la administración del calostro para poder medir la cantidad de anticuerpos presentes en las becerras.

3.16) En ambas producciones la edad de destete es a los 60 días.

3.17) Aproximadamente al mes, en la UPL1 mueren 25 animales. Mientras que en la UPL2 mueren 33 animales.

4) Alimentación

4.1) En ambas producciones se administra calostro a las becerras recién nacidas (Cuadro 7).

4.2) El calostro también es evaluado en las dos Unidades de Producción antes de ser administrado (Cuadro 7).

4.3) Sin embargo, el manejo que se le da al calostro difiere en cada Unidad de Producción. En la UPL1, el calostro no sufre ningún tratamiento antes de ser

suministrado. A diferencia de la UPL2, donde es pasteurizado. Sin embargo, ambas producciones almacenan el calostro congelado (Cuadro 7).

4.4) Así también difieren las Unidades de Producción en cuanto a la cantidad administrada de calostro. La UPL1 administra a sus becerras 3 litros de calostro. En tanto que la UPL2 administra 4 litros (Cuadro 7).

4.5) Otra diferencia importante en ambas Unidades de Producción es el momento en que es administrado el calostro. En la UPL1 el calostro es administrado a partir de la primera hora, mientras que la UPL2 administra el calostro a las dos horas (Cuadro 7).

4.6) La procedencia del calostro administrado también es otra diferencia encontrada en las Unidades de Producción. La UPL1 ofrece el calostro de la madre. La UPL2 ofrece el calostro de otras vacas (Cuadro 7)

4.7) El alimento ofrecido a las becerras en el área de recría es por medio de cubeta en ambas producciones.

4.8) A las becerras en el área de recría en ambas producciones se les ofrece concentrado. Sin embargo, la UPL1 también ofrece leche a diferencia de la UPL2 que ofrece sustituto (Cuadro 7).

4.9) La UPL1 es la única que ofrece leche a las becerras sin embargo esta leche no recibe ningún tratamiento térmico antes de ser proporcionada (Cuadro 7).

Cuadro 7. Consumo de becerras en área de crianza durante las primeras etapas

Concepto	UPL1	UPL2
Evaluación del calostro	✓	✓
Manejo del calostro	Ninguno	Pasteurización
Cantidad de calostro	3 litros	4 litros
Momento en que se administra calostro	A partir de la primera hora	A las 2 horas
Procedencia del calostro	Madre	Otras vacas
Consumo de becerras en recría	Leche y concentrado	Sustituto y concentrado
Tratamiento térmico de la leche antes de ser proporcionada	No	N/A

N/A: No aplica

4.10) En ambas producciones alimentan dos veces al día a las becerras.

4.11) Las dietas para las etapas posteriores en el área de crianza consiste en la UPL1 en concentrado y heno de avena. Mientras que en la UPL2 consiste en concentrado, alfalfa achicalada, alfalfa fresca y triticales (Cuadro 8).

Cuadro 8. Dieta para el área de crianza

Ingrediente	UPL1	UPL2
Concentrado	✓	✓
Alfalfa achicalada		✓
Alfalfa fresca		✓
Maíz roado		✓
Heno de avena	✓	
Triticales		✓

4.12) La dieta para alimentar al ganado adulto en la UPL1 consiste en ensilado, concentrado, maíz roado, alfalfa achicalada, sales minerales, aceites, núcleo. Para la UPL2 la dieta del ganado adulto consiste en ensilado, concentrado, maíz roado, alfalfa achicalada, canola, salvado, sales minerales, aceites y triticales (Cuadro 9).

Cuadro 9. Ingredientes en la dieta del ganado adulto

Ingrediente	UPL1	UPL2
Ensilado	✓	✓
Concentrado	✓	✓
Maíz roado	✓	✓
Alfalfa achicalada	✓	✓
Canola		✓
Salvado		✓
Sales minerales	✓	✓
Aceites	✓	✓
Núcleo	✓	
Triticales		✓

4.13) La UPL1 ofrece tres veces al día el alimento al ganado. Mientras que la UPL2 alimenta dos veces al día.

4.14) La UPL1 alimenta al ganado por medio de tatoma o mezclador y tractor al igual que la UPL2.

4.15) Tanto para la UPL1 como para la UPL2, las dietas cambian su composición y porcentaje de acuerdo al nivel de producción. Para las altas productoras, la UPL1 ofrece 12 kgBS, mientras que la UPL2 ofrece 24.49 kgBS. En el caso de las medianas productoras, la UPL1 ofrece 10 kgBS y la UPL2 22.03 kgBS. Dado que la UPL1 es la única que cuenta con vacas bajas productoras, esta producción ofrece

6 kgBS a esta etapa y para las vacas frescas ofrece 8 kgBS de alimento. Todos los valores son totales al día, sin embargo se pueden dividir para la UPL1 en 3, que es el número de veces que alimenta al ganado durante el día y para la UPL2 en 2 (Cuadro 10).

Cuadro 10. Adición de la dieta de acuerdo al nivel de producción

Dieta	UPL1	UPL2
Altas productoras	12 kg	24.49 kg
Medianas productoras	10 kg	22.03 kg
Bajas productoras	6 kg	N/A
Frescas	8 kg	N/A

N/A: No aplica

4.16) La dieta de la vaca en período seco difiere en comparación con la del ganado en producción, así como también es diferente la composición de los ingredientes por Unidad de Producción. La UPL1 ofrece una dieta que consiste en ensilado y rastrojo. Mientras que la UPL2 ofrece a las vacas en período seco una dieta cuya composición es de ensilado, rastrojo, maíz rolado, alfalfa achicalada, salvado y sales minerales (Cuadro 11).

Cuadro 11. Ingredientes de la dieta de las vacas en período seco

Ingrediente	UPL1	UPL2
Ensilado	✓	✓
Rastrojo	✓	✓
Maíz rolado		✓
Alfalfa achicalada		✓
Salvado		✓
Sales minerales		✓

4.17) La UPL1 administra secuestrante de micotoxinas. Mientras que en la UPL2 no

5) Reproducción

5.1) Ambas Unidades de Producción cuentan con personal encargado para la detección de calores. Sin embargo, la UPL1 sólo cuenta con una y la UPL2 cuenta con dos personas responsables en la detección de calores.

5.2) De igual manera, en ambas producciones, se destinan 12 horas del día para la detección de calores.

5.3) El número de partos promedio por vaca en la UPL1 es de seis. Mientras que en la UPL2 es de cuatro.

5.4) Así mismo en las dos Unidades de Producción, se lleva a cabo la sincronización de las vacas.

5.5) En ambas producciones la sincronización se realiza con prostaglandinas (PG).

5.6) Otra característica que comparten las Unidades de Producción es el método que utilizan para gestar a las vacas, el cual es Inseminación Artificial.

5.7) Cada Unidad de Producción, maneja diferentes parámetros reproductivos. Por ejemplo, las vacas de la UPL1 tienen su primer parto a los 24 meses, mientras que las vacas de la UPL2 a los 20.5 meses. La UPL1 maneja un intervalo entre partos de 14.2 meses, y la UPL2 de 14.6 meses. En la UPL1 el número de días abiertos

es de 155 y en la UPL2 es de 165. Para la UPL1 existe un porcentaje de abortos del 1%, mientras que en la UPL2 es de 4%. El porcentaje de fertilidad de la UPL1 es de 75%, mientras que para la UPL2 es de 70%. Sin embargo existen similitudes en ambas producciones tales como que ofrecen dos servicios efectivos por vaca y el tercio de la gestación en que más se presentan abortos es el segundo (Cuadro 12).

Cuadro 12. Parámetros productivos de las UPL's

Concepto	UPL1	UPL2
Edad al primer parto (meses)	24	20.5
Intervalo entre partos (meses)	14.2	14.6
Días abiertos	155	165
Servicios efectivos	2	2
Porcentaje de abortos al mes	1%	4%
Tercio en que se presentan más abortos	2	2
Porcentaje de fertilidad	75%	70%

6) Medicina Preventiva

6.1) En ambas producciones aplican vacunas que incluyen virales+ *Leptospira*, en la UPL1 a los dos meses de edad y en la UPL2 a los seis meses de edad, con refuerzo de *Leptospira* en la UPL1 dos veces al año y en la UPL2 tres veces al año. También en ambas producciones se aplica la vacuna contra *Brucella*, en la UPL1 se aplica tres veces al año y en la UPL2 dos veces al año en los mismos animales. Otra vacuna que aplican ambos establos es la bacterina contra mastitis, la cual es aplicada antes de cada producción en ambos establos. Adicionalmente la UPL2 aplica una bacterina contra *Clostridium* tres veces al año (Cuadro 13).

Cuadro 13. Vacunas y periodicidad por UPL

Vacuna	UPL1	UPL2
Virales+ leptospira	2 meses de edad	6 meses de edad
Leptospira (refuerzo)	2	3
Clostridium	N/A	3
Brucella	3	2
Bacterinas	Antes de producción	Antes de producción

N/A: No aplica

6.2) No se realizan necropsias en ambas producciones, de manera que no se han identificado lesiones sugestivas a MAP.

6.3) Ambas producciones albergan perros, gatos y caballos dentro del establo. Adicionalmente la UPL2 alberga patos y pollos de engorda dentro del establo.

6.4) En ambas Unidades de Producción no hay acceso a perros y gatos que no pertenezcan al establo.

6.5) Cada Unidad de Producción presenta con mayor frecuencia ciertas enfermedades tanto en el ganado adulto como en el área de recría. El ganado adulto de la UPL1 presenta con mayor frecuencia problemas podales, acidosis y mastitis. Mientras que en la UPL2 se presentan con mayor frecuencia la metritis, mastitis y neumonía en el ganado adulto (Cuadro 14).

Para el área de recría, la UPL1 sólo reporta dos problemas los cuales son diarrea y neumonía. La UPL2 reporta como enfermedades más frecuentes en esta área neumonía, diarrea e indigestión (Cuadro 15).

Cuadro 14. Principales enfermedades que afectan al ganado adulto

Concepto	UPL1	UPL2
Enfermedad 1	Problemas podales	Metritis
Enfermedad 2	Acidosis	Mastitis
Enfermedad 3	Mastitis	Neumonía

Cuadro 15. Principales enfermedades que afectan al área de cría

Concepto	UPL1	UPL2
Enfermedad 1	Diarrea	Neumonía
Enfermedad 2	Neumonía	Diarrea
Enfermedad 3	-----	Indigestión

6.6) A la semana en la UPL1 se enferman 15 animales. Mientras que en la UPL2 155 animales.

6.7) La UPL1 no reporta problemas de fauna nociva. Sin embargo, la UPL2 sí reporta problemas de fauna nociva principalmente aves.

6.8) La UPL1 no realiza ningún control de fauna nociva, la UPL2 sí realiza control de fauna nociva.

6.9) La UPL2 realiza el control de fauna nociva a través de cebos.

6.10) En la UPL2 el control de moscas se lleva a cabo con insecticidas.

6.11) En ninguna de las Unidades de Producción se realizan pruebas para determinar la presencia de paratuberculosis a los animales que por alguna razón fueron adquiridos fuera del establo.

6.12) En ambas producciones cuando hay un animal sospechoso a paratuberculosis toman muestras de sangre y lo envían al laboratorio para el diagnóstico por ELISA. En la UPL1 si un animal resulta positivo es eliminado y en la UPL2 si un animal resulta positivo no se realiza nada.

6.13) La UPL1 no tiene vacas positivas a *Brucella* y la UPL2 sí.

6.14) En la UPL2 las vacas positivas a *Brucella* no se separan de las demás.

6.15) La UPL1 no cuenta con un programa de limpieza y desinfección, la UPL2 sí.

6.16) En el programa de desinfección de la UPL2 utilizan como sustancias desinfectantes solución de cal clorada, formol al 10% y soluciones de Iodo.

6.17) El almacén de alimento de ambas producciones no evita la entrada de fauna nociva.

6.18) La UPL1 no cuenta con una rutina de desinfección para los trabajadores y visitas previa a la entrada y salida del establo. Sin embargo, la UPL2 sí realiza una rutina de desinfección únicamente para los visitantes.

6.19) En la UPL1 no se lleva a cabo un registro de visitas a diferencia de la UPL2 donde si se lleva a cabo un registro de visitas.

6.20) La UPL1 permite el libre acceso a cualquier área del establo a las visitas. Por el contrario, la UPL2 sólo permite el acceso a las visitas al área donde requieren ingresar.

6.21) Ninguna Unidad de Producción cuenta con tapete sanitario ni vado en funcionamiento para la entrada de vehículos automotores.

6.22) La UPL1 no cuenta con pediluvio para las vacas después del ordeño. Sin embargo, la UPL2 sí cuenta con éste y la sustancia activa utilizada es el formol.

7) Prueba de ELISA

7.1) En total se analizaron 223 muestras. Donde el 51.57% (115/223) de las muestras analizadas corresponden a la UPL1, de las cuales el 79.13% (91/115) resultaron negativas, el 20% (23/115) positivas y el 0.87% (1/115) resultó sospechosa. Así mismo, el 48.43% de las muestras (108/223) corresponden a la UPL2, donde el 24.07% (26/108) resultaron negativas, el 73.15% resultó positivo (79/108) mientras que el 2.78% (3/108) resultó sospechosa.

En total se obtuvieron el 52.47% (117/223) de muestras negativas, el 45.74% (102/223) de muestras positivas y sólo el 1.79% (4/223) de muestras sospechosas (Cuadro 15).

Cuadro 15. Distribución de los resultados de la prueba de ELISA en las dos UPL

UPL	Resultado			Total
	<i>Negativo</i> n(%)	<i>Positivo</i> n(%)	<i>Sospechoso</i> n(%)	
UPL1	91 (79.13)	23 (22.55)	1 (0.87)	115 (51.57)
UPL2	26 (24.07)	79 (73.15)	3 (2.78)	108 (48.43)
Total	117 (52.47)	102 (45.74)	4 (1.79)	223 (100)

7.2) Las muestras se obtuvieron y analizaron durante 2011, 2012 y principios de 2013. El 2.69% (6/223) de las muestras fueron analizadas en el 2011, en donde se obtuvo el 16.67% (1/6) de negativas, el 83.33% (5/6) positivas. Para el año 2012, se analizaron el 83.41% (186/223) de las muestras, donde se obtuvo el 59.68% (111/186) negativas, el 38.17% (71/186) positivas y el 2.15% (4/186) sospechosas. Para 2013, se analizó el 13.90% (31/223) de las muestras, donde se obtuvo el 16.13% (5/31) de muestras negativas, el 83.87% (26/31) como positivas.

En total se obtuvieron el 52.47% (117/223) de muestras negativas, el 45.74% (102/223) de muestras positivas y sólo el 1.79% (4/223) de muestras sospechosas en la misma población bovina (Cuadro 16).

Cuadro 16. Distribución de las pruebas de ELISA por año

Año	Resultado			Total
	<i>Negativo</i> n(%)	<i>Positivo</i> n(%)	<i>Sospechoso</i> n(%)	n(%)
2011	1 (16.67)	5 (83.33)	0 (0.0)	6 (100.00)
2012	111 (59.68)	71 (38.17)	4 (2.15)	186 (100.00)
2013	5 (52.57)	26 (83.87)	0 (0.0)	31 (100.00)
Total	117 (52.47)	102 (45.74)	4 (1.79)	223 (100)

Al realizar el análisis bivariado y de regresión logística, se observó que aquellas vacas que pertenecían a la UPL2 (RM 3.03 IC 95% 1.95-4.73) tenían más posibilidades de resultar positivas a la prueba de ELISA ($p < 0.05$) para la detección de anticuerpos contra MAP.

Análisis de los factores de riesgo

Al realizar la prueba de χ^2 (63.11, $p < 0.05$) se encontró asociación entre el resultado positivo a la prueba de ELISA para la detección de anticuerpos contra *Mycobacterium avium paratuberculosis* con las siguientes variables de la UPL2:

- Manga: debido a que al ser utilizada provoca un hacinamiento con los animales que se encuentran dentro de ésta. Es así como las vacas positivas a MAP podrían eliminarlo y las vacas susceptibles podrían ser infectadas.
- Corrales de enfermería, producción, secas, vaquillas, reto y área de jaulas, que no presentan un hacinamiento dadas las dimensiones y la cantidad de animales que cada una alberga, sin embargo, los corrales de enfermería se encuentran muy cercanos a los corrales de producción y si en el corral de enfermería existen animales positivos a MAP, la micobacteria puede ser transportada de manera fácil a los corrales de producción y con ello afectar las demás áreas como secas, reto, vaquillas y jaulas que alberga animales provenientes de los corrales de producción.
- Problemas de fauna nociva: el principal problema de fauna nociva que presenta es la presencia de aves y al tratarse de una enfermedad ocasionada por una bacteria del complejo *Mycobacterium avium* la presencia de esta fauna nociva constituye un factor de riesgo considerable a la presencia de MAP en las vacas.
- Vacas con *Brucella*: afectando el sistema inmune de las vacas y con ello dejándolas más susceptibles a la presencia de diversas enfermedades en este caso a la paratuberculosis.

- Rutina de desinfección únicamente para las visitas: ya que MAP es eliminado por heces, al no existir una rutina de desinfección para todo el personal que se encuentra en el establo esto representa un vehículo para la micobacteria hacia toda la producción.

El modelo ajustado por las variables anteriormente indicadas determina un OR de 10.89 ($p < 0.05$), es decir las vacas de la UPL2 tiene 10.8 veces más posibilidad de presentar un resultado positivo a la prueba de ELISA para la detección de anticuerpos contra *Mycobacterium avium paratuberculosis* con respecto a las vacas de la UPL1.

Mientras que para la UPL1, los factores de riesgo encontrados fueron:

- Servicios de MVZ que atiende varias explotaciones: donde el MVZ representa un vehículo para la micobacteria entre las Unidades de Producción que atiende.
- Manejo de calostro: el cual no es pasteurizado ni lleva algún otro tratamiento térmico antes de ser suministrado, con lo que si una madre positiva a MAP se encuentra produciendo calostro, eliminará la micobacteria en el calostro y con ello infectará a la cría.

- Acceso a visitas: las cuales al poder ingresar a cualquier área del establo, también sirven de vehículo para la micobacteria, no sólo para la misma UPL1 sino para las demás Unidades de Producción a las cuales tengan acceso libre.

Como factor protector resultaron las variables de la UPL1: presencia de zona de aislamiento, eliminación de vacas positivas a *Brucella* con un OR de 0.09 ($p < 0.05$), es decir las vacas de la UPL1 tienen menor posibilidad de presentar un resultado positivo a la prueba de ELISA para la detección de anticuerpos contra *Mycobacterium avium paratuberculosis* con respecto a las vacas de la UPL2.

Tabla básica de contingencia

Con el programa estadístico STATA 11.0[®], mediante la rutina “estat class” que calcula proporción de predicciones correctas, nos indicó que la prueba de ELISA determinó correctamente la presencia de anticuerpos contra MAP en el 99 de los casos (verdaderos positivos). Así mismo no sugirió la presencia de ningún falso positivo. También se detectaron 3 casos falsos negativos y la presencia de 117 verdaderos negativos. Todos estos datos fueron obtenidos a través del programa STATA 11.0¹¹¹ (Cuadro 17).

Cuadro 17. Tabla de contingencia de la prueba de ELISA para la detección de anticuerpos contra MAP

Clasificación	Positivo	Negativo	Total
Positivo	99	0	99
Negativo	3	117	120
Total	102	117	219

Sensibilidad y Especificidad

Se determinó la sensibilidad y la especificidad de la prueba a través del programa estadístico STATA 11.0®, donde se determinó para la prueba utilizada una sensibilidad del 97.06%, es decir la prueba detecta a los animales positivos en un 97.06% de los casos y una especificidad del 100%, que significa que la prueba detecta correctamente al 100% de los animales negativos.

Así mismo, se obtuvo un valor predictivo positivo del 100% lo que significa que la prueba detecta a todos los animales que poseen anticuerpos contra MAP y un valor predictivo negativo del 97.50% lo que se traduce como que la prueba detecta ese porcentaje de animales que no tienen la presencia de anticuerpos contra MAP (Cuadro 18).

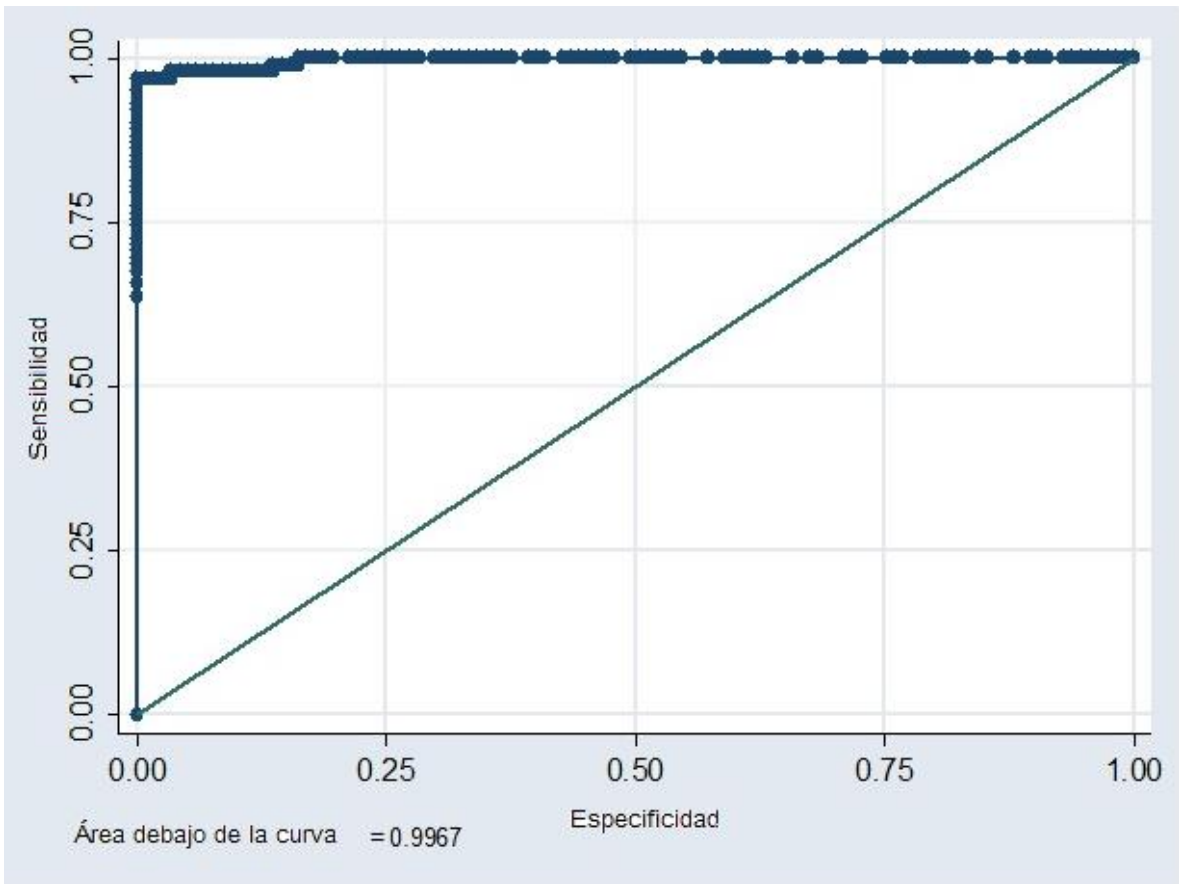
Se realizó una curva de ROC (curva característica operativa del receptor) para determinar la validez de la prueba, en donde se establece que mientras mayor sea el punto en donde se unen la sensibilidad y especificidad mayor será la validez de

la prueba, en este caso tanto la sensibilidad como la especificidad se interceptan en valores cercanos al 1.00 (Gráfica 1).

Cuadro 18. Validación de la prueba de ELISA para la detección de anticuerpos contra MAP

Concepto	Valor
Sensibilidad	97.06%
Especificidad	100%
Valor predictivo positivo	100%
Valor predictivo negativo	97.50%

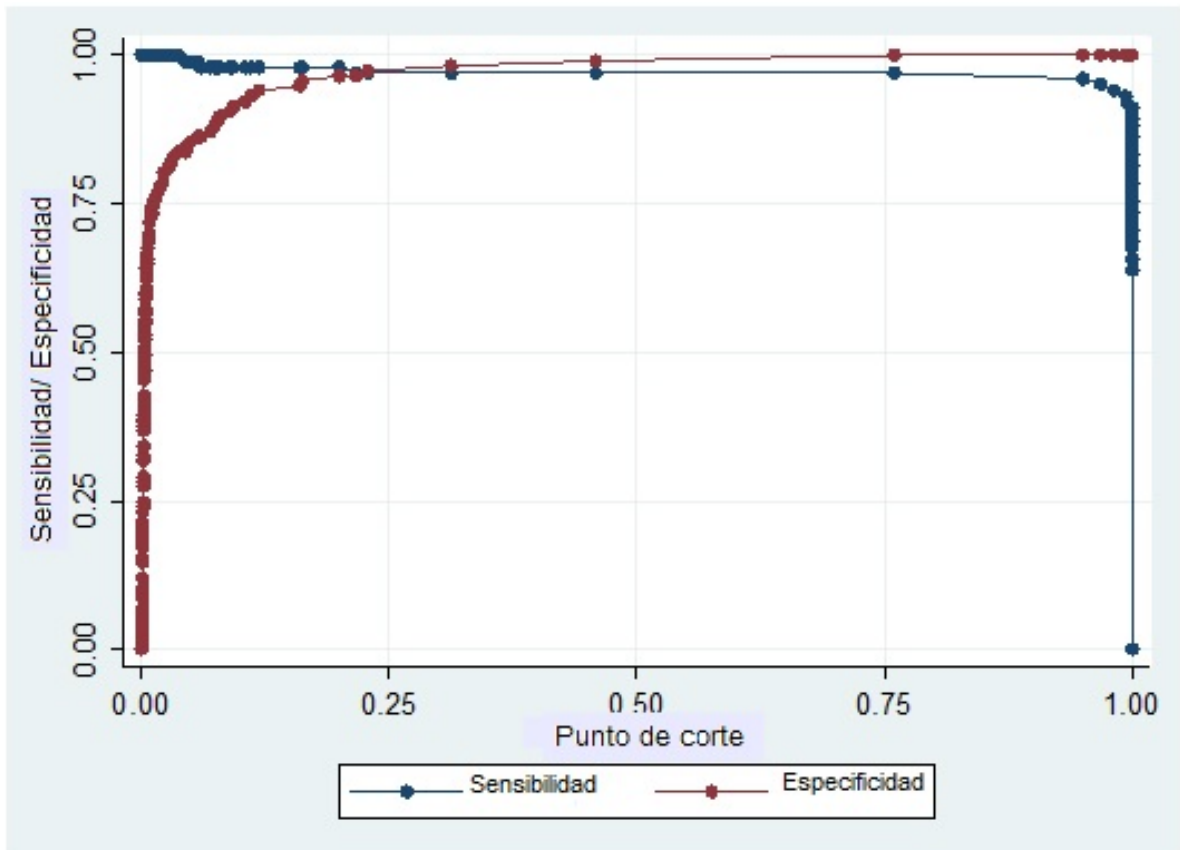
Gráfica 1. Curva ROC para la validación de la prueba de ELISA para la detección de anticuerpos contra MAP



Punto de corte

Se determinó el punto de corte de 0.25 de densidad óptica con un 95% de confianza. Eso quiere decir que los animales de las Unidades de Producción Lechera que tengan en la prueba de ELISA una lectura de densidad óptica mayor a 0.25 se considerarán infectados y los que tengan un valor menor se considerarán no infectados por esta prueba (Gráfica 2).

Gráfica 2. Punto de corte de la prueba de ELISA para la detección de MAP



DISCUSIÓN

La paratuberculosis había sido considerada como una enfermedad exótica, en la actualidad ya no es considerada así, debido a estudios anteriores y el presente, se ha demostrado la presencia de anticuerpos contra MAP, dejando en evidencia la presencia de la micobacteria en la población bovina del país.

En algunos estados y regiones se ha detectado un aumento en la seroprevalencia conforme va pasando el tiempo, esto quizá se deba a la cantidad de animales que existen, las prácticas de manejo, la importación de ganado proveniente de países con alta prevalencia tales como Estados Unidos, Canadá e incluso Nueva Zelanda, el tipo de producción entre otras.

Diversos estudios han reportado la seroprevalencia de la paratuberculosis bovina en diversas regiones del país tal como se determinó en éste. En el 2008, en la Región del Trópico se reportó una seroprevalencia a MAP de 12.4%¹¹². En la Comarca Lagunera se reportó una seroprevalencia del 30%¹¹³. En el Estado de Guanajuato reportaron una seroprevalencia del 8.03% en el 2008¹¹⁴. Tanto la seroprevalencia reportada en la región del trópico como la del Estado de Guanajuato es menor en comparación con la encontrada en este trabajo, debido principalmente a que las condiciones de producción contrastan, ya que nuestro estudio se llevó a cabo en producciones lecheras del tipo intensivo, donde la estabulación total del ganado representa un riesgo importante, por otra parte las condiciones climáticas y de alimentación difieren totalmente de la región tropical del país con la región

centronorte. Así también, en el Estado de Guanajuato, existe una menor población de ganado lechero bovino (186,124 cabezas de ganado productor de leche) con respecto al que se encuentra en la región estudiada (388,445 cabezas de ganado productor de leche). Sin embargo, la seroprevalencia reportada en la Comarca Laguna es muy similar a la encontrada debido a que las condiciones de producción, alimentación, manejo y reproducción son muy similares a las que se presentan en las Unidades de Producción Lechera que participaron en el trabajo.

En el período de 2004 a 2009 se realizó un estudio donde se determinó la prevalencia de la paratuberculosis bovina en diferentes Estados de la República donde se obtuvieron distintas prevalencias, en Coahuila se obtuvo un 5.26%, Tamaulipas 0%, San Luis Potosí 22.29%, Querétaro 7.14%, Hidalgo 9.21%, Estado de México 4.06%, Tabasco 18.54%, Chiapas 9.68%¹¹⁵. Otro estudio realizado en los Estados de Guanajuato y San Luis Potosí, determinaron una prevalencia a la enfermedad de 10.71% y 31.3% respectivamente¹¹⁶. Existe una diferencia considerable de la prevalencia reportada en cada estado, debido a que cada lugar representa condiciones de producción, climáticas, de alimentación, de competitividad y socioeconómicas diferentes, así como también difieren en cuanto a la población bovina y la cantidad de leche producida, por lo que para algunos estados es mucho mayor la seroprevalencia reportada con respecto a otros. Comparando estos resultados con respecto a los obtenidos en el trabajo se encuentran algunas semejanzas en el Estado de San Luis Potosí, esto quizá se deba a la cercanía con los establos muestreados, demostrando así la alta seroprevalencia de paratuberculosis en los bovinos lecheros de la región.

Así mismo, para el año 2012, se reportó una prevalencia en Hidalgo del 10.3%, Guanajuato 10.2%, Jalisco 9.5%, Aguascalientes 8.8%, Chiapas 1.2%, Chihuahua 1.5%¹¹⁷ y en Veracruz una seroprevalencia del 23.05%¹¹⁸. Hidalgo, Chihuahua, Jalisco y Aguascalientes representan condiciones similares a las de las Unidades de Producción de este estudio, sin embargo, la seroprevalencia encontrada tanto en Jalisco como en Aguascalientes difiere, esto quizá se debe a la cantidad de muestras analizadas o el momento en el que fueron tomadas las muestras. No obstante, en Veracruz se reporta una alta seroprevalencia tal como en este trabajo a pesar de que las condiciones de ambas regiones sean totalmente diferentes.

En este trabajo se encontró una seroprevalencia para Jalisco en específico para Bajío de San José del 20% y para Aguascalientes específicamente para el municipio de Aguascalientes del 73%. En conjunto se obtuvo una seroprevalencia del 46%, manifestándose la presencia de anticuerpos en las Unidades de Producción Lechera.

Así mismo, no se han encontrado estudios que reporten los factores de riesgo para la presentación de la paratuberculosis bovina en México. Sin embargo, en otros países se han reportado como factores de riesgo poca higiene, alta densidad animal, volumen de producción, calostro y leche de madres positivas a MAP⁹⁶, acumulación de estiércol en el área de partos^{97, 98} que las becerras de recría provengan de madres seropositivas⁹⁹, estrés; parto, mala alimentación, deficiencias nutricionales¹⁰⁰, adquisición de animales cuyo estatus sea desconocido y propagación de estiércol¹⁰¹.

Como se podrá observar, las seroprevalencias encontradas tanto por estado como en conjunto son más altas a las reportadas en estudios anteriores. Esto se debe principalmente a las prácticas de manejo establecidas para cada Unidad de Producción. Por ejemplo, la UPL1 no cuenta con una rutina de limpieza y desinfección, dado que esta enfermedad representa como vía de contagio más común la vía fecal oral es necesario implementar una mayor higiene en este lugar.

Así mismo, no se lleva a cabo una rutina de limpieza y desinfección tanto para los trabajadores como para las visitas, lo cual representa una vía de entrada para MAP. Otro factor de riesgo importante para la presencia del MAP en la UPL1 es el alimento suministrado a las becerras, ya que se les proporciona leche y en ésta no se lleva a cabo ningún tratamiento térmico, por lo tanto si una vaca es positiva a MAP y se encuentra eliminando la micobacteria en leche, infectará a las becerras. Así como también esta Unidad de Producción permite el libre acceso a las visitas a cualquier área, poniendo en riesgo la bioseguridad.

En la UPL2 los factores de riesgo más importantes son la introducción de animales nuevos directos a la producción sin previa cuarentena o sin conocimiento del estatus zoonosario del lugar donde provienen. El mantenimiento de animales positivos lo que contribuye a la diseminación del MAP por todas las instalaciones aumentando el riesgo de infección y disminuyendo el control de la enfermedad. También cuenta con un problema de fauna nociva muy grave, en específico de aves lo cual también contribuye a la diseminación de la enfermedad. Así como la inexistencia de una rutina de limpieza y desinfección para los trabajadores.

Se considera, que en la UPL2 existe un mayor riesgo de MAP, ya que las diferencias encontradas de seroprevalencia entre ambas pueden deberse a que la UPL1 ha estado eliminando a los animales positivos a MAP con lo que reduce significativamente el riesgo y la prevalencia, así como también esta unidad cuenta con una zona de aislamiento, en donde pueden ser aislados los animales positivos a la prueba. La UPL2 en cambio los mantiene en el corral de enfermería, el cual es muy cercano a los corrales de producción, diseminando así de manera continua a la micobacteria.

CONCLUSIÓN

En este trabajo se demostró la presencia de MAP en las Unidades de Producción, en donde se obtuvo una seroprevalencia conjunta del 46%. En la UPL1 se encontró una seroprevalencia del 20% y en la UPL2 del 73%, dejando en evidencia la presencia de la micobacteria en los establos lecheros.

Así mismo, se analizaron diversas variables que albergaban diferentes factores de riesgo de los sitios de estudio, sin embargo, no todas fueron significativas; de aquellas que si lo fueron se concluye que las vacas que se encontraban en la UPL2 tenían diez veces más posibilidades de tener resultados positivos a la presencia de anticuerpos contra *Mycobacterium avium paratuberculosis* por prueba de ELISA en comparación con las vacas de la UPL1.

En base a los resultados obtenidos, se realizaron propuestas para mejorar el control y la bioseguridad en los sitios de estudio, en donde se observó que la higiene es el principal punto de control para disminuir la prevalencia de la enfermedad en ambas producciones.

REFERENCIAS

1. DREIER S, KHOL JL, STEIN B, FUCHS K, GÜTLER S, BAUMGARTNER W. Serological, Bacteriological and Molecular biological Survey of Paratuberculosis (Johne´s Disease) in Austrian Cattle. *J Vet Med B* 2006; 53: 477- 481.
2. The United States Department of Agriculture. Johne´s disease on US Dairies, 1991–2007. National Animal Health Monitoring System. 2008: N521.0408.
3. ESTÉVEZ DI, HERNÁNDEZ CR, TRUJILLO GAM, CHÁVEZ GG. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in goat and sheep flocks in Mexico. *Small Ruminant Research* 2007; 72: 209- 213.
4. ÁLVAREZ J, DE JUAN L, ARANAZ A, ROMERO B, BEZOS J, MATEOS A, *et al.* A survey on paratuberculosis in wildlife in Spain. Proceedings of the 8th International Colloquium on Paratuberculosis. Copenhagen, Denmark. 2005: 130.
5. FLOROU M, LEONTIDES L, BILLINIS C, KOSTOULAS P, SOFIA M. Isolation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from non-ruminant wildlife in Greece. Proceedings of the 8th International Colloquium on Paratuberculosis, Copenhagen, Denmark. 2005: 134.
6. LARSEN AB, MOON HW, MERKAL RS. Susceptibility of swine to *Mycobacterium paratuberculosis*. *J Vet Res* 1971; 32: 589– 595.
7. CLARKE CJ. The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *J Comp Pathol* 1977; 116: 217–261.

8. INDERLIED BC, KEMPER AC, BERMUDEZ MEL. The *Mycobacterium avium* complex. Clin Microbiol Rev 1993; 6: 266- 310.
9. YOUNG LS, BERLIN OG, INDERLIED BC. Activity of ciprofloxacin and other fluorinated quinolones against mycobacteria. Am J Med 1987; 82: 23-26.
10. ISEMAN MD, CORPE RF, O'BRIEN RJ, ROSENZWEIG DY, WOLINSKY E. Disease due to *Mycobacterium avium intracellulare*. Chest 1985; 87: 139-149.
11. THOEN CO, KARLSON AG, HIMES EM. Mycobacterial infections in animals. Rev Infect Dis 1981; 3: 960-972.
12. MCNEIL MR, BRENNAN PJ. Structure, function and biogenesis of the cell envelope of mycobacteria in relation to bacterial physiology, pathogenesis and drug resistance; some thoughts and possibilities arising from recent structural information. Res Microbiol 1991; 142: 451-463.
13. GOOD RC. Opportunistic pathogens in the genus mycobacterium. Annu Rev Microbiol 1985; 39: 347-369.
14. MIZUGUCHI Y, UDOU T, YAMADA T. Mechanism of antibiotic resistance in *Mycobacterium intracellulare*. Microbiol Immunol 1983; 27:425-431.
15. RASTOGI N, GOH KS, DAVID HL. Enhancement of drug susceptibility of *Mycobacterium avium* by inhibitors of cell envelope synthesis. Antimicrob Agents Chemother 1990; 34: 759-764.
16. RASTOGI N, FREHEL C, RYTER A, OHAYON H, LESOURD M, DAVID HL. Multiple drug resistance in *Mycobacterium avium*: is the wall architecture responsible for the exclusion of antimicrobial agents? Antimicrob Agents Chemother 1981; 20: 666- 677.

17. MODILEVSKY T, SATTLER FR, BARNES PF. Mycobacterial disease in patients with human immunodeficiency virus infection. *Arch Intern Med* 1989; 149: 2201-2205.
18. ICHIYAMA S, SHIMOKATA K, TSUKAMURA M. The isolation of *Mycobacterium avium* complex from soil, water, and dust. *Microbiol Immunol* 1988; 32: 733-739.
19. WALLACE RJ. Nontuberculous mycobacteria and water: a love affair with increasing clinical importance. *Infect Dis Clin North Am* 1987; 1: 677-686.
20. FRY KL, MEISSNER PS, FALKINHAM JO. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria Identification and use of epidemiologic markers for studies of *Mycobacterium avium*, *M. intracellulare*, and *M. scrofulaceum*. *Am Rev Respir Dis* 1986; 134: 39- 43.
21. REZNIKOV M, LEGGO JH, DAWSON DJ. Investigation by seroagglutination of strains of the *Mycobacterium intracellulare-M. scrofulaceum* group from house dust and sputum in southeastern Queensland. *Am Rev Respir Dis* 1974; 104: 951- 953.
22. THOREL MF, DRICHEVSKY M, LE´VY-FRE´BAULT VV. Numerical taxonomy of mycobactin-dependent Mycobacteria, amended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium*, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum*. *Int J Syst Bacteriol* 1990; 40: 254–260.
23. ÁLVAREZ RB. Paratuberculosis bovina: una revisión bibliográfica (tesis de licenciatura). Morelia (Michoacán) México: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 2010.

24. 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.
25. COLLINS DM, DE LISLE GW. Restriction endonuclease analysis of various strains of *Mycobacterium paratuberculosis* isolated from cattle. *Am J Vet Res* 1986; 47: 2226– 2229.
26. LAURENT JP, FASKE S, CANGELOSI GA. Characterization of IS999, an unstable genetic element in *Mycobacterium avium*. *Gene* 2002; 294: 249–257.
27. WHITTINGTON R. Cultivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *CAB International Paratuberculosis: Organism, Disease, Control* 2010: 244-260
28. COLLINS DM, GABRIC DM, LISLE GW. Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. *Journal of Clinical Microbiology* 1990; 28: 1591–1596.
29. DE JUAN L, MATEOS A, DOMÍNGUEZ L, SHARP J, STEVENSON K. Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates from goats detected by pulsed-field gel electrophoresis. *Veterinary Microbiology* 2005; 106: 249–257.
30. STEVENSON K, HUGHES VM, DE JUAN L, INGLIS NF, WRIGHT F, SHARP JM. Molecular characterization of pigmented and nonpigmented isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology* 2002; 40: 1798–1804.

31. WHITTINGTON RJ, MARSH I, MCALLISTER S, TURNER MJ, MARSHALL DJ, FRASER CA. Evaluation of modified BACTEC 12B radiometric medium and solid media for culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from sheep. *Journal of Clinical Microbiology* 1999; 37: 1077–1083.
32. ALEXANDER DC, TURENNE CY, BEHR MA. Insertion and deletion events that define the pathogen *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Journal of Bacteriology* 2009; 191: 1018- 1025.
33. ADURIZ JJ, JUSTE RA, CORTABARRIA N. Lack of mycobactin dependence of mycobacteria isolated on Middlebrook 7H11 from clinical cases of ovine paratuberculosis. *Veterinary Microbiology* 1995; 45: 211–217.
34. STEVENSON K. Comparative Differences between Strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. CAB International Paratuberculosis: Organism, Disease, Control 2010: 126- 132.
35. MARCÉ C, EZANNO P, WEBER FM, SEEGER H, PFEIFFER UD, FOURICHON C. Invited review: Modeling within- herd transmission of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy cattle: A review. *J Dairy Sci* 2010; 93: 4455- 4470
36. CATANIA S, STEFANI E, POZZATO N, MULIARI R, VECENZONI G. [Immunopathogenesis of Paratuberculosis]. Ita. Immunopatogenesi della Paratuberculosis. *Large Animal Review* 2007; 13: 51- 57.
37. COUSSENS P, LAMONT AE, KABARA E, SREEVATSAN S. Host- Pathogen Interactions and Intracellular Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. CAB International Paratuberculosis: Organism, Disease, Control 2010: 109- 120.

38. GREWAL SK, RAJEEV S, SREEVATSAN S, MICHEL FC. Persistence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and other zoonotic pathogens during simulated composting, manure packing, and liquid storage of dairy manure. *Applied and Environmental Microbiology* 2006; 72: 565–574.
39. TIWARI A, VANLEEUEWEN JA, MCKENNA SL, KEEFE GP, BARKEMA HW. Johne's disease in Canada. Part I: clinical symptoms, pathophysiology, diagnosis, and prevalence in dairy herds. *Canadian Veterinary Journal* 2006; 47: 874–882.
40. CROSSLEY BM, ZAGMUTT-VERGARA FJ, FYOCK TL, WHITLOCK RH, GARDNER IA. Fecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by dairy cows. *Veterinary Microbiology* 2005; 107: 257–263.
41. SIGURÐARDÓTTIR OG, VALHEIM M, PRESS CM. Establishment of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in the intestine of ruminants. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2004; 56: 819–834.
42. WHITTINGTON RJ, MARSH IB, REDDACLIFF LA. Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dam water and sediment. *Applied and Environmental Microbiology* 2005; 71: 5304–5308.
43. SIGURÐARDÓTTIR OG, PRESS CMCL, SAXEGAARD F, EVENSEN O. Bacterial isolation, immunological response and histopathological lesions during the early subclinical phase of experimental infection of goat kids with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Pathol* 1999; 36: 542-550.

44. MILLER H, ZHANG J, KUOLEE R, PATEL GB, CHEN W. Intestinal M cells: the fallible sentinels?. *World Journal of Gastroenterology* 2007; 13: 1477–1486.
45. SECOTT TE, LIN TL, WU CC. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* fibronectin attachment protein facilitates M-cell targeting and invasion through a fibronectin bridge with host integrins. *Infection and Immunity* 2004; 72: 3724–3732.
46. SECOTT TE, LIN TL, WU CC. Fibronectin attachment protein homologue mediates fibronectin binding by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Infection and Immunity* 2001; 69: 2075–2082.
47. PIETERS J. Entry and survival of pathogenic mycobacteria in macrophages. *Microbes and Infection* 2001; 3: 249–255.
48. JOZEFOWSKI S, SOBOTA A, KWIATKOWSKA K. How *Mycobacterium tuberculosis* subverts host immune responses. *Bioessays* 2008; 30: 943–954.
49. SOUZA CD, EVANSON OA, SREEVATSAN S, WEISS DJ. Cell membrane receptors on bovine mononuclear phagocytes involved in phagocytosis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *American Journal of Veterinary Research* 2007; 68: 975–980.
50. ROWE MT, GRANT IR. *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* and its potential survival tactics. *Letters in Applied Microbiology* 2006; 42: 305–311.
51. GATFIELD J, PIETERS J. Molecular mechanisms of host–pathogen interaction: entry and survival of mycobacteria in macrophages. *Advances in Immunology* 2003; 81: 45–96.

52. ALONSO S, PETHE K, RUSSELL DG, PURDY GE. Lysosomal killing of *Mycobacterium* mediated by ubiquitin-derived peptides is enhanced by autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 2007; 104: 6031–6036.
53. WOO SR, HEINTZ JA, ALBRECHT R, BARLETTA RG, CZUPRYNSKI CJ. Life and death in bovine monocytes: the fate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Microbial Pathogenesis* 2007; 43: 106–113.
54. STABEL JR. Transitions in immune responses to *Mycobacterium paratuberculosis*. *Veterinary Microbiology* 2000; 77: 465–473.
55. ZHU X, TU ZJ, COUSSENS PM, KAPUR V, JANAGAMA H, NASER S, *et al.* Transcriptional analysis of diverse strains *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in primary bovine monocyte derived macrophages. *Microbes and Infection* 2008; 10: 1274–1282.
56. SIVAKUMAR P, TRIPATHI BN, SINGH N. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in intestinal and lymph node tissues of water buffaloes (*Bubalus bubalis*) by PCR and bacterial culture. *Veterinary Microbiology* 2005; 108: 263–270.
57. AYELE WY, BARTOS M, SVASTOVA P, PAVLIK I. Distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in organs of naturally infected bull-calves and breeding bulls. *Veterinary Microbiology* 2004; 103: 209–217.
58. COUSSENS PM. Model for immune responses to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in cattle. *Infection and Immunity* 2004; 72: 3089–3096.

59. COUSSENS PM. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and the bovine immune system. *Animal Health Research Reviews* 2001; 2: 141–161.
60. TESSEMA MZ, KOETS AP, RUTTEN VP, GRUYS E. How does *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* resist intracellular degradation?. *Veterinary Quarterly* 2001; 23: 153–162.
61. FICHT TA, GARRY AL, KHARE S, O'SHEA B, RICE FCA. Global Analysis of the *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Genome and Model Systems Exploring Host- Agent Interactions. Blackwell Publishing and the Institute of Food Technologist 2004: 87- 99.
62. CHACON O, BERMUDEZ LE, BARLETTA RG. Johne's disease, inflammatory bowel disease, and *Mycobacterium paratuberculosis*. *Annual Reviews of Microbiology* 2004; 58: 329–363.
63. HARRIS JE, LAMMERDING AM. Crohn's disease and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: current issues. *Journal of Food Protection* 2001; 64: 2103–2110.
64. NIELSEN SS, TOFT N. Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: A review of accuracies of ELISA, interferon- γ assay and faecal culture techniques. *Veterinary Microbiology* 2008; 129: 217- 235
65. ISHIKAWA H, SHIRAHATA T, HASEGAWA K. Interferon- gamma production of mitogen stimulated peripheral lymphocytes in perinatal cows. *J Vet Med Sci* 1994; 56: 735- 738.
66. KHOL LJ, GEISBAUER E, WASSERTHEURER M, REVILLA FS, DAMOSER J, ÖSTERREICHER E, *et al.* Outcome of Three Commercial Serum ELISAs and Faecal Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in

- Consecutive Samples from a Cattle Herd with Low Prevalence of Paratuberculosis (Johne's Disease). Blackwell Verlag GmbH. *Transboundary and Emerging Diseases* 2012; 59: 197- 207
67. COLLINS MT, SOCKETT DC. Accuracy and economics of the USDA-licensed enzyme-linked immunosorbent assay for bovine paratuberculosis. *JAVMA* 1993; 203: 1456-1463.
68. BURRELLS C, CLARKE CJ, COLSTON A, KAY JM, PORTER J, LITTLE D, *et al.* A study of immunological responses of sheep clinically-affected with paratuberculosis (Johne's disease). The relationship of blood, mesenteric lymph node and intestinal lymphocyte responses to gross and microscopic pathology. *Vet Immunol Immunopathol* 1998; 66: 343–358.
69. PÉREZ V, TELLECHEA J, BADIOLA JJ, GUTIÉRREZ M, GARCÍA M. Relation between serologic response and pathologic findings in sheep with naturally acquired paratuberculosis. *Am J Vet Res* 1997; 58: 799–803.
70. CLARKE C, PATTERSON I, ARMSTRONG K, LOW J. Comparison of the absorbed ELISA and agar gel immunodiffusion test with clinicopathological findings in ovine clinical paratuberculosis. *Vet Rec* 1996; 139: 618–621.
71. NIELSEN SS, GRONBAEK C, AGGER JF, HOUE H. Maximum-likelihood estimation of sensitivity and specificity of ELISAs and faecal culture for diagnosis of paratuberculosis. *Prev Vet Med* 2002; 53: 191-204.
72. WHITTINGTON RJ, SERGEANT ESG. Progress towards understanding the spread, detection and control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in animal populations. *Aust Vet J* 2001; 79: 267- 278.

73. GASTEINER J, AWAD-MASALMEH M, BAUMGARTNER W. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle in Austria, diagnosis with culture, PCR and ELISA. *Vet Microbiol* 2000; 77: 339- 349.
74. WHITLOCK RH, WELLS SJ, SWEENEY RW, VAN TIEM J. ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. *Vet Microbiol* 2000; 77: 387-398.
75. SWEENEY RW, WHITLOCK RH, BUCKLEY CL, SPENCER PA. Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle. *J Vet Diagn Invest* 1995; 7: 488-493.
76. SOCKETT CD, CONRAD AT, THOMAS BC, COLLINS TM. Evaluation of four serological tests for bovine paratuberculosis. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1134-1139.
77. YOKOMIZO Y, YUGI H, MERKAL RS. A method for avoiding false-positive reactions in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculosis. *Japanese Journal of Veterinary Science* 1985; 47: 111–119.
78. SHIN SJ, CHO D, COLLINS MT. Diagnosis of bovine paratuberculosis by a novel enzyme-linked immunosorbent assay based on early secreted antigens of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Clinical and Vaccine Immunology* 2008; 15: 1277–1281.
79. BECH-NIELSEN S, JORGENSEN JB, AHRENS P, FELD NCJ. Diagnostic Accuracy of a *Mycobacterium phlei*- Absorbed Serum Enzyme Linked-Immunosorbent Assay for Diagnosis of Bovine Paratuberculosis in Dairy Cows. *Clin Microbiol* 1992; 30: 613–618.

80. JUSTE RA, SÁEZ DE OCÁRIZ C, PORTU J, ALDAMIZ M. Seroreactivity of Crohn's patients against paratuberculosis antigens. In: Chiodini, Collins, Bassey, editors. Proceedings of the 4th International Colloquium on Paratuberculosis, Cambridge, United Kingdom. 1994: 321
81. COLLINS MT. Diagnosis of paratuberculosis. In: RW Sweeney, Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, editors. Philadelphia: WB Saunders, 1996: 357-371.
82. NORTON S, GROENENDAAL H, HEUER C. Simulating control strategies for Johne's disease in New Zealand dairy herds. Proceedings of the 8th International Colloquium on Paratuberculosis, Copenhagen, Denmark. 2005: 226- 233.
83. SÁ L, OLIVEIRA J, SANTOS G, BRANDESPIM D, DA SILVA J, MOTA R, *et al.* [Serological evaluation and risk factors for infection with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in herds of Garanhuns, Pernambuco]. Por. Avaliação sorológica e de fatores de risco para a infecção por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* em rebanhos eiteiros da Microrregião de Garanhuns, Pernambuco. *Pesq Vet Bras* 2013; 33: 310- 313.
84. ROBBI C, ROSSI I, NARDELLI S, ROSSI E, TOSON M, MARANGON S, VINCENZI, *et al.* [Prevalence of Paratuberculosis (Johne's disease) in the population of dairy cows in the Veneto Region]. Ita. Prevalenza di Paratubercolosi (Johne's disease) nella popolazione di bovine da latte della Regione Veneto. *Atti Soc Ital Buiatria* 2002; 34: 283-288.

85. SACCO T, GENNERO MS. [A serological survey of farms in the region for the problem paratuberculosis]. Ita. Indagine sierologica in allevamenti problema sul territorio regionale per la paratubercolosi. Vet Ital 1997; 33: 16-18.
86. COLAVITA G, GIACCONE V. [Actuality of paratuberculosis and its diffusion in Italy]. Ita. Attualità della paratuberculosis e sua diffusione in Italia. Obiettivi e Documenti Vet 1995; 16: 25- 31.
87. SORGE U, LISSEMORE K, GODKIN A, JANSEN J, HENDRICK S, WELLS S, *et al.* Risk factors for herds to test positive for *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*-antibodies with a commercial milk enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in Ontario and western Canada. CVJ 2012; 53: 963- 970.
88. SWEENEY RW, COLLINS MT, KOETS AP, MCGUIRK SM, ROUSSEL AJ. Paratuberculosis (Johne's Disease) in Cattle and Other Susceptible Species. J Vet Intern Med 2012; 26: 1239- 1250.
89. PIAGGIO J, NÚÑEZ A, GIL A. Johne's disease serological prevalence in Uruguayan dairy cows. Proceedings of the 7th International Colloquium on Paratuberculosis, Bilbao, Spain. 2002: 455- 456.
90. KUSAR D, OCEPEK M, LOGAR K, PATE M, BRANE K. Seroprevalence of cattle Paratuberculosis in Slovenia in 2008 and a comparison of data from current and previous studies. Slov Vet Res 2011; 48: 39–44.
91. www.oie.int/es [homepage on the Internet]. París: Organización Mundial de Sanidad Animal; 2013. Available from: <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-la-lista-de-la-oie-2013>

92. MCFADDEN JJ, BUTCHER PD, CHIODINI R, HERMON-TAYLOR J. Crohn's disease-isolated mycobacteria are identical to *Mycobacterium paratuberculosis*, as determined by DNA probes that distinguish between mycobacterial species. J Clin Microbiol 1987; 25: 796- 801.
93. CHAMBERLIN W, GRAHAM YD, HULTEN K, EL- ZIMAITY TMH, SCHWARTZ RM, NASER S, *et al.* Review article: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* as one cause of Crohn's disease. Aliment Pharmacol Ther 2001; 15: 337-346.
94. COLLINS MT. Mycobacterium paratuberculosis: A Potencial Food- Borne Pathogen?. J Dairy Sci 1997; 80: 3445- 3448.
95. GRANT IR, BALL HJ, ROWE MT. Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in bulk raw and commercially pasteurized cows milk from approved dairy processing establishments in the United Kingdom. Appl Environ Microbiol 2002; 68: 2428–2435.
96. NIELSEN SS, BJERRE H, TOFT N. Colostrum and Milk as Risk Factors for Infection with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Dairy Cattle. J Dairy Sci 2008; 91: 4610- 4615.
97. BERGHAUS RD, LOMBARD JE, GARDNER IA, FARVER TB. Factor analysis of a Johne's disease risk assessment questionnaire with evaluation of factor scores and a subset of original questions as predictors of observed clinical paratuberculosis. Prev Vet Med 2005; 72: 291- 309.
98. JOHNSON-IFEARULUNDU YJ, KANEENE JB. Management- related risk factors for *M. paratuberculosis* infection in Michigan, USA, dairy herds. Prev Vet Med 1998; 37:41–54.

99. ALY S, THURMOND M. Evaluation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection of dairy cows attributable to infection status of the dam. J Am Vet Med Assoc 2005; 227: 450- 454.
100. DUFOUR B, POUILLOT R, DURAND B. A cost/benefit study of paratuberculosis certification in French cattle herds. Vet Res 2004; 35: 69-81.
101. CAVIRANI S, TADDEI S, MC O, IOTTI A, BOTTARELLI E. Farm factors associated with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections in Northern Italian dairy herds. Proceedings of the 8th International Colloquium on Paratuberculosis. Copenhagen, Denmark. 2005:182–186.
102. PENCE M, BALDWIN C, BLACK CC. The seroprevalence of Johne's disease in Georgia beef and dairy cull cattle. J Vet Diagn Invest 2003; 15: 475–477.
103. BOELAERT F, WALRAVENS K, BIRONT P, VERMEERSCH JP, BERKVENS D, GODFROID J. Prevalence of paratuberculosis (Johne's disease) in the Belgian cattle population. Vet Microbiol 2000; 77: 269–281.
104. BRAUN RK, BUERGELT CD, LITTELL RC, LINDA SB, SIMPSON JR. Use of an enzyme-linked immunosorbent assay to estimate prevalence of paratuberculosis in cattle of Florida. J Am Vet Med Assoc 1990; 196: 1251–1254.
105. MERKAL RS, WHIPPLE DL, SACKS JM, SNYDER GR. Prevalence of *Mycobacterium paratuberculosis* in ileocecal lymph nodes of cattle culled in the United States. J Am Vet Med Assoc 1987; 190: 676–680.
106. SMITH LR, GROHN TY, PRADHAN KA, WHITLOCK HR, VAN KESSEL SJ, SMITH MJ, *et al.* A longitudinal study on the impact of Johne's

- disease status on milk production in individual cows. J Dairy Sci 2009; 92: 2653- 2661
107. LEVY SP, LEMESHOW S. Sampling for health professionals. Belmont, California: Lifetime Learning Publications, 1980.
 108. IDEXX laboratories® ELISA Paratuberculosis Screening/ Paratub. Serum- *S. Mycobacterium paratuberculosis* Antibody Test Kit. Versión P07130/18. Montpellier, France: IDEXX laboratories 2012.
 109. STATA 11: Stata Corporation, College Station, Texas. Stata lab perpetual license: Serial number: 401105284332.
 110. WAYNE WD. Bioestadística, Base para el análisis de las ciencias de la salud. 4ª ed. México (DF): Limusa 2006.
 111. PAGANO M, GAUVREAU K. Fundamentos de Bioestadística. 2ª ed. México (DF): Math Learning, 2001.
 112. BARAJAS RJA. Aplicación de la técnica inmunoenzimática de ELISA para el estudio epidemiológico de enfermedades del ganado bovino en el trópico de México. Memorias del XXXII Congreso Nacional de Buiatría; 2008 agosto 14-16; Boca del Río (Veracruz) México. México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, AC, 2008: 47-53.
 113. DELGADO GR, BAUTISTA BE, BARRÓN FC, ZIMMERMAN S. Estudio serológico de paratuberculosis en bovinos Holstein de la Comarca Lagunera. Memorias del XXII Congreso Nacional de Buiatría; 2008 agosto 14- 16; Boca del Río (Veracruz) México. México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, AC, 2008: 183- 186.

114. GUZMÁN RCC, SANTILLÁN FMA, CÓRDOVA LD, MARTÍNEZ CAG, ROSADO RMI. Características generales de la paratuberculosis bovina en el estado de Guanajuato. Memorias del XXXII Congreso Nacional de Buiatría; 2008 agosto 14-16; Boca del Río (Veracruz) México. México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, AC, 2008: 227.
115. CHÁVEZ GG, MALDONADO CE, CASTRELLÓN AVE. Retos del diagnóstico en paratuberculosis en México. Memorias de la 19ª. Reunión Anual CONASA; 2011 octubre 24- 26; Tuxtla Gutiérrez (Chiapas) México. México (DF): Consejo Técnico Consultivo Nacional de Salud Animal, 2011.
116. MARTÍNEZ CAG, SANTILLÁN FMA, GUZMÁN RCC, FAVILA HL, CÓRDOVA LD, DÍAZ AE *et al.* Desarrollo de un inmuno- ensayo enzimático (ELISA) para el diagnóstico de paratuberculosis en bovinos. Rev Mex Cienc Pecu 2012; 3(1): 1- 18.
117. MARTÍNEZ CA, SANTILLÁN FMA, MEJÍA EF, BARRADAS PF, PEÑA CAL, HERNÁNDEZ AL *et al.* Distribución y prevalencia de paratuberculosis bovina en México. Memorias del XXXVI Congreso Nacional de Buiatría; 2012 agosto 2- 4; Mérida (Yucatán) México. México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, AC, 2012: 251.
118. FAVILA HL, BARRADAS PF, CRISTOBAL CO, LIMÓN GMM, GUTIÉRREZ HJL, HERRERA LE, *et al.* Prevalencia de paratuberculosis en bovinos lecheros del estado de Veracruz: Resultados preliminares. Memorias del XXXVI Congreso Nacional de Buiatría; 2012 agosto 2- 4; Mérida (Yucatán) México. México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, AC, 2012: 259.

119. KALIS CH, HESSELINK JW, RUSSCHEN EW, BARKEMA IIW, COLLINS MT, VISSER IJR. Factors influencing the isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from bovine fecal samples. J Vet Diagn Invest 1999; 11: 345-351.
120. ZIMMER K, DRAGER KG, KLAWONN W, HESS RG. Contribution to the diagnosis of Johne's disease in cattle. Comparative studies on the validity of Ziehl-Neelsen staining, faecal culture and a commercially available DNAProbe® test in detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in faeces from cattle. J Vet Med 1999; 46: 137-140.
121. GWOZDZ JM, REICHEL MP, MURRAY A, MANKTELOW W, WEST DM, THOMPSON KG. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in ovine tissues and blood by the polymerase chain reaction. Vet Microbiol 1997; 51:233-244.
122. CHALLANS JA, STEVENSON K, REID HW, SHARP JM. A rapid method for the extraction and detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from clinical specimens. Vet Rec 1994; 134: 95-96.
123. VARY CPH, ANDERSEN PR, GREEN E, HERMON-TAYLOR J, MCFADDEN JJ. Use of highly specific DNA probes and the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in Johne's disease. J Clin Microbiol 1990; 28: 933-937.
124. RAVEENDRAN R, PRIYA PM, KOSHY J, KRISHNAN NG, VIJAYAKUMAR K. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in asymptomatic bovines by IS900 Polymerase Chain Reaction. Veterinary World 2011; 6: 248- 24

ANEXOS

Anexo 1. Ensayo para la detección de Anticuerpos frente a *Mycobacterium paratuberculosis* IDEXX® ELISA Paratuberculosis Screening.

Preparación de los reactivos

Solución de Lavado

La solución de lavado concentrada (20x) debe de diluirse 1/20 con agua destilada antes de ser usada. Esta solución se conoce como “Solución de Lavado”

Nota: La solución de lavado concentrada (20x) debe alcanzar la temperatura ambiente antes de ser utilizada y debe agitarse suavemente para asegurar la disolución de cualquier sal precipitada. Después de diluir, la solución de lavado puede guardarse 3 días a 2-8°C

Conjugado

Diluir el conjugado anti- rumiante peroxidasa HRPO concentrado con la solución tampón de dilución 1

- Diluir 1/100 con la solución tampón de dilución 1 si las muestras se incuban con el protocolo de incubación corta

Nota: El conjugado diluido puede guardarse 8 horas a temperatura ambiente

Preparación de las muestras

Las muestras y los controles se diluyen directamente en la microplaca

Protocolo del ensayo

Los controles pueden ser dispensados en cualquier lugar de la microplaca.

Tomar las microplacas tapizadas y marcar la posición de las muestras en una hoja de trabajo.

1. Dispensar las muestras y los controles en la microplaca por predilución (100µl)
 - Controles: Diluir los controles positivo y negativo 1/20 con la solución tampón de dilución 12
 - Muestras de suero: diluir los muestras de suero 1/20 con la solución tampón de dilución 12
2. Homogenizar el contenido de los pocillos con el agitador de microplacas
3. Incubar 15 min a temperatura ambiente (18-26°C)
4. Dispensar 100 µl de cada pocillo de la microplaca por predilución en pocillos de la microplaca tapizada
5. Homogenizar el contenido de los pocillos con el agitador de microplacas
6. Cubrir la microplaca (papel de aluminio, etc.) e incubar 45 min (±5 min) a temperatura ambiente (18- 26°C).
7. Lavar cada pocillo con aproximadamente 300 µl de solución de lavado 3 veces. Aspirar los contenidos líquidos de todos los pocillos después de cada lavado. Tras la aspiración final, eliminar el líquido de lavado residual de cada microplaca golpeándola firmemente sobre material absorbente. Evitar que las microplacas se sequen entre los lavados y antes de añadir el reactivo siguiente.

8. Dispensar 100 μ l de Conjugado anti- rumiante peroxidasa HRPO diluido en cada pocillo
9. Cubrir la microplaca (papel aluminio, etc.) e incubar 30 min (\pm 3 min) a temperatura ambiente (18- 26°C)
10. Repetir el paso n°7
11. Dispensar 100 μ l de sustrato TMB 9 en cada pocillo
12. Incubar 10 min (\pm 3 min) a temperatura ambiente (18- 26°C) protegida de la luz
13. Dispensar 100 μ l de solución de frenado 3 por pocillo. Agitar suavemente para homogenizar el contenido de los pocillos. Secar la base de la micropipeta
14. Calibrar el lector
15. Leer las densidades ópticas a 450 nm (OD 450)
16. Calcular los resultados

Criterio de validación

La reacción es considerada válida si la media del control positivo ($CP\bar{x}$) tiene un valor mínimo medio de OD 450 de 0,350 y si el coeficiente entre la media del control positivo ($CP\bar{x}$) y el control negativo ($CN A_{450}$) es igual o superior a 3,00¹⁰⁸.

Anexo 2. Cuestionario para determinar la situación sanitaria relacionada con la paratuberculosis

0. Identificación del cuestionario

0.1 Ubicación GPS	Norte: _____ Oeste: _____
0.2 Fecha de entrevista	Fecha: ____/____/____ día mes año

1. Datos generales del entrevistado

1.1 Nombre del entrevistado	_____
	Apellido paterno Apellido materno Nombre
1.2 ¿Qué ocupación tiene en el establo?	1. Administrador 2. Encargado 3. Propietario 4. MVZ área clínica 5. MVZ área reproducción 6. MVZ área alimentación 7. Otro (especifique) _____
1.3 ¿Cuánto tiempo tienen trabajando en este establo?	1. Años _____ 2. Meses _____

2. Unidad pecuaria

2.1 ¿El establo es?	1. Prestado 2. Propio 3. Rentado 4. Otro _____ Especifique
2.2 ¿Con qué áreas cuenta el establo?	1. Bodega (si) (no) 2. Corrales (si) (no) 3. Sala de ordeña (si) (no) 4. Parideros (si) (no) 5. Manga de manejo (si) (no) 6. Pasillo sanitario (si) (no) 7. Área de aislamiento (si) (no) 8. Oficina (si) (no) 9. Casa habitación(propia) (si) (no) 10. Casa habitación (trabajadores) (si) (no) (no)
2.3 Área de los corrales del establo y número de animales en ellos.	Corral 1: _____ m ² , número de animales: _____ Corral 2 : _____ m ² , número de animales: _____ Corral 3 : _____ m ² , número de animales: _____ Corral 4 : _____ m ² , número de animales: _____ Corral 5 : _____ m ² , número de animales: _____ Corral 6 : _____ m ² , número de animales: _____ Becerrera 1: _____ m ² , número de animales: _____ Becerrera 2: _____ m ² , número de animales: _____ Becerrera 3: _____ m ² , número de animales: _____
2.4 ¿Cuál es la raza de las vacas en el establo?	1. Holstein–Friesian 2. Suizo

	3. Jersey 5. Holstein/Jersey 6. Holstein/ Suizo 7. Criollas 8. Otros (Especifique) _____
2.5 La población total de bovinos del establo y como se distribuyen.	1. Bovinos en el hato : _____ 2. Vacas en producción: _____ 3. Vacas secas: _____ 4. Vaquillas(1er parto >15 meses): _____ 5. Sementales: _____ 6. Becerras (<15 meses): _____
2.6 ¿Cuántos empleados tiene para atender al ganado?	Número de empleados _____
2.7 Del total de trabajadores ¿cuantos realizan las siguientes actividades?	Administrador _____ Chofer _____ Encargado _____ Jornalero _____ Médico Veterinario _____ Ordeñador _____ _____ Pasturero _____ Tractorista _____ Becerreros _____ Secretaria _____ Mantenimiento de equipo/maquinaria _____ Soldador (arreglo de camas y corrales) _____ Otro/ _____ Especifique

3. Sistema de producción

3.1 ¿Cuál es la producción de leche al día?	_____ litros
3.2 ¿Cuál es la producción de leche promedio por vaca?	_____ litros
3.3 ¿Cuántas veces al día ordeña?	1. Una 2. Dos 3. Tres
¿Cómo divide al ganado en producción?	1. Altas, medianas, bajas 2. Altas, medianas 3. Otro: _____
3.4 ¿Qué otras ventas obtiene del ganado además de la leche?	1. Becerras calostradas 2. Becerros calostrados 3. Becerros sin calostar 4. Becerros al destete 5. Becerras/Vaquillas para reemplazo 6. Sementales 7. Otras: _____
3.5 ¿Cuál es el destino principal de la leche que produce?	1. Particular leche fluida, ¿Qué empresa? 2. Particular quesos 3. Otros (Especifique): _____
3.6 ¿Existen premios (sobreprecio) o penalizaciones por la calidad de la leche?	1. Si ¿Cuánto más? _____ 2. No 99. No sabe
3.7 ¿Existen condiciones impuestas por el comprador en cuanto a la alimentación, sanidad, ordeña y almacenamiento de la leche que vende?	1. Si 2. No 99. No sabe

3.8 ¿El comprador de la leche de su establo, realiza la prueba de conteo de células somáticas a una muestra de leche del tanque?	1. Si 2. No 99. No sabe
3.9 ¿De dónde provienen las vacas o vaquillas para reponer a las vacas que se mueren o se llevan al rastro?	1. Recría fuera del establo (pase a la pregunta 3.10) 2. Recría propia (pase a la pregunta 3.11) 99. No sabe
3.10 ¿En el caso de adquirir animales fuera, cuál es el estado de origen?	Estado de origen _____ (En caso de escribir más de un estado separar con comas).
3.11 ¿Cuenta con los servicios de un Médico Veterinario Zootecnista?	1. Si, trabaja exclusivamente para este establo 2. Si, atiende varias explotaciones 3. No 99. No sabe
3.12 ¿Promedio de partos en los cuales considera que sus vacas son de desecho y las manda al rastro?	Escriba el número de partos _____
3.13 ¿Cuáles son los 3 motivos principales por los que desecha a las vacas?	1. Para obtener ingresos 2. Por baja de producción láctea 3. Por problemas reproductivos 4. Por problemas de patas 5. Por mastitis 6. Por vejez 7. Enfermedades _____ 8. Muerte 9. Por otros motivos 99. No sabe
3.14 ¿Cuál es el principal destino de los animales que desecha?	1. Rastro 2. Otro productor 3. Engorda 4. Otro: _____ 99. No sabe
3.15 ¿Aproximadamente cuántas vacas desecha al año?	Número _____
3.16 ¿Qué manejo se les da a las becerras nacidas?	1. Limpieza y Desinfección del cordón umbilical 2. Calostro 3. Aplicación de Vacunas 4. Aretado 5. Otro: _____
3.17 ¿A qué edad se destetan las becerras?	1. 45 días 2. 50 días 3. 60 días 4. Más de 60 días 5. Otro: _____
3.18 ¿Aproximadamente cuantos animales se le llegan a morir al mes?	Número de animales muertos: _____ 1. Vacas _____ 2. Becerras _____
3.19 ¿Si es dueño de más de un establo, mezcla animales entre estos establos?	1. Si 2. No 99. No sabe

4. Alimentación

4.1 ¿Se les da calostro a las becerras recién nacidas?	1. Si 2. No (pase a la pregunta 4.7)
4.2 ¿Se evalúa el calostro?	1. Si 2. No

	99. No sabe	
4.3 ¿Se le da algún manejo al calostro?	1. Se pasteuriza 2. Se hierva 3. Se congela	
4.4 ¿Qué cantidad de calostro se les da a las becerras?	1. 2 litros 2.3 litros 3. 4 litros 4. Otra _____	
4.5 ¿En qué momento se les da el calostro?	1. Al nacer 2. Antes de 1 hora 3. A las 3hr 4. A las 5hr 5. Otra 99. No sabe	
4.6 ¿El calostro es de la madre o de otras vacas?	1. Madre 2. Otras vaca 99. No sabe	
4.7 ¿En que se les da de comer a las becerras de recría?	1. Mamila 2. Cubeta 3. Sonda 4. Otro	
4.8 ¿Qué consumen las becerras de recría?	1. Sustituto de leche (fórmula) (pase a la pregunta 4.10) 2. Leche de la madre 3. Leche de sus vacas 4. Otra forma: _____ 99. No sabe	
4.9 ¿En el caso de que la alimentación sea con leche de la madre o de las vacas, esta recibe algún tratamiento térmico antes de ser proporcionada?	1. Si, ¿se hierva? 2. Si, ¿se pasteuriza? 3. No 99. No sabe	
4.10 ¿Cuántas veces al día alimenta a las becerras?	1. 1 vez 2. 2 veces 3. 3 veces 4. Otra: _____	
4.11 ¿Con qué se alimenta a la crianza de becerras?	1. Silo de maíz Concentrado o concentrado 3. Rastrojo de maíz rolado 5. Alfalfa acicalada Alfalfa fresca 7. Canola Zanahoria 9. Desperdicios de panadería Granos secos de destilería 11. Granos húmedos de destilería Galleta 13. Naranja Heno de avena 15. Salvado Aceites 17. Sales minerales vitaminas 19. Otra: _____	2. 4. Maíz 6. 8. 10. 12. 14. 16. 18.
4.12 ¿Qué ingredientes utilizan en las dietas para el ganado?	1. Silo de maíz Concentrado o concentrado 3. Rastrojo de maíz rolado	2. 4. Maíz

	5. Alfalfa acicalada 6. Alfalfa fresca 7. Canola 8. Zanahoria 9. Desperdicios de panadería 10. Granos secos de destilería 11. Granos húmedos de destilería 12. Galleta 13. Naranja 14. Heno de avena 15. Salvado 16. Aceites 17. Sales minerales 18. vitaminas 19. Otra:_____
4.13 ¿Cuántas veces al día se le da de comer al ganado?	1. Una vez al día 2. Dos veces al día 3. Tres veces al día 4. Más de 3 veces al día
4.14 ¿Como alimentan al ganado?	1. Manual, con pala y biello 2. Tatoma (Mezcladora) 3. Tractor 4. Otro:_____
4.15 ¿En qué porcentaje cambian los ingredientes para las vacas altas productoras?	1. Silo de maíz 2. Concentrado o concentrado 3. Rastrojo de maíz 4. Maíz rolado 5. Alfalfa acicalada 6. Alfalfa fresca 7. Canola 8. Zanahoria 9. Desperdicios de panadería 10. Granos secos de destilería 11. Granos húmedos de destilería 12. Galleta 13. Naranja 14. Heno de avena 15. Salvado 16. Aceites 17. Sales minerales 18. vitaminas 19. Otra:_____
4.16 ¿En qué porcentaje cambian los ingredientes vacas medianas productoras?	1. Silo de maíz 2. Concentrado o concentrado 3. Rastrojo de maíz 4. Maíz rolado 5. Alfalfa acicalada 6. Alfalfa fresca 7. Canola 8. Zanahoria 9. Desperdicios de panadería 10. Granos secos de destilería 11. Granos húmedos de destilería 12. Galleta 13. Naranja 14. Heno de avena 15. Salvado 16. Aceites 17. Sales minerales 18. vitaminas 19. Otra:_____
4.17 ¿En qué porcentaje cambian los ingredientes bajas productoras?	1. Silo de maíz 2. Concentrado o concentrado 3. Rastrojo de maíz 4. Maíz rolado

	5. Alfalfa acicalada 6. Alfalfa fresca 7. Canola 8. Zanahoria 9. Desperdicios de panadería 10. Granos secos de destilería 11. Granos húmedos de destilería 12. Galleta 13. Naranja 14. Heno de avena 15. Salvado 16. Aceites 17. Sales minerales 18. vitaminas 19. Otra: _____
4.18 Ingredientes en la alimentación de la vaca de seca	1. Silo de maíz 2. Concentrado o concentrado 3. Rastrojo de maíz 4. Maíz rolado 5. Alfalfa acicalada 6. Alfalfa fresca 7. Canola 8. Zanahoria 9. Desperdicios de panadería 10. Granos secos de destilería 11. Granos húmedos de destilería 12. Galleta 13. Naranja 14. Heno de avena 15. Salvado 16. Aceites 17. Sales minerales 18. vitaminas 19. Otra: _____
4.19 ¿Utilizan secuestrantes de micotoxinas?	1. Si ¿Cuál? _____ 2. No 99. No sabe

5. Reproducción

5.1 ¿Existe personal encargado de detectar calores?	1. Si, ¿Cuántos? ____ 2. No (pase a la pregunta 5.3)
5.2 ¿Cuántas horas al día?	1. Número de horas De qué hora a qué hora lo realizan _____.
5.3 ¿Partos promedio de las vacas en el establo?	Partos _____
5.4 ¿Realizan sincronización?	1. Si 2. No (pase a la pregunta 5.6)
5.5 ¿Con que sincronizan?	1. Ovalise 2. Sincrosio 3. Lutalise 4. Sincroplex 5. Celosin 6. Otros: _____
5.6 ¿Edad promedio al primer parto?	1. 24 meses 2. 25 meses 3. 26 meses 4. Otro _____
5.7 ¿Intervalo entre partos? (De cuando pare a cuando vuelve a parir)	1. 12 meses 2. 13 meses 3. 14 meses 4. Otro: _____

5.8 ¿Número de días abiertos? (Del parto hasta que queda gestante nuevamente)	1. 45 días 2. 60 días 3. 90 días 4. Otro: _____
5.9 ¿Qué método utiliza para gestar las vacas del establo?	1. Inseminación artificial 2. Monta natural 3. Otros: _____ Especificar
5.10 ¿Numero de servicios por vaca por concepción?	1. 1 2. 2 3. 3 4. 4 5. 5 6. 6 4.Otro: _____ hasta 12
5.11 ¿Qué porcentaje de abortos tienen al mes?	1. 1% 2. 2% 3. 3% 4.Otro: _____
5.12 ¿En qué tercio se presentan más abortos?	1. 1er tercio 2. 2do tercio 3. 3er tercio
5.13 ¿Qué porcentaje de fertilidad tienen? (Vacas gestantes de entre las que fueron servidas)	Porcentaje _____

6. Medicina preventiva

6.1 ¿Qué vacunas aplica y su periodicidad?	1. Virales+ leptospira _____ meses 2. Leptospira(refuerzo) _____ meses 3. Clostridium _____ meses 4. Brucella _____ meses 5. Bacterianas(mastitis) _____ meses
6.2 ¿De los animales que se llegan a morir y les realizan necropsia, le han mencionado si han encontrado lesiones sugestivas a paratuberculosis?	1. Si 2. No 99. No sabe
6.3 ¿Tiene perros, gatos u otros animales en el establo?	1. Perros (si) (no) 2. Gatos (si) (no) 3. Otros (si) (no), ¿Cuáles? _____ 99. No sabe
6.4 ¿Tienen acceso perros o gatos que no pertenezcan a su establo?	1. Si 2. No 99. No sabe
6.5 ¿Qué enfermedades se presentan con mayor frecuencia en el establo (mínimo 3)?	Ganado adulto: _____ _____ _____ Recría _____ _____

6.6 ¿Cuántas vacas que se le enferman a la semana?	Número de vacas_____
6.7 ¿Ha tenido problemas con fauna nociva?	1. Si ¿Cuáles? _____ 2. No 99. No sabe
6.8 ¿Realiza un control de fauna nociva (ratas, ratones, moscas)?	1. Si 2. No (pase a la pregunta 6.11) 99. No sabe
6.9 ¿En caso de realizar control de fauna nociva para ratas y ratones que utilizan?	1. Cebos 2. Trampas 3.Otro:_____
6.10 ¿En caso de realizar control de fauna nociva para moscas que utilizan?	1.Insecticidas 2. Cinta adherente 3.Otro: _____
6.11 ¿Cuándo adquiere vaquillas fuera del establo? Realizan pruebas para determinar la presencia de paratuberculosis	1. Sí, en el rancho de origen 2. Sí, al ingresar al establo 3. No 99. No sabe
6.12 ¿Qué hace cuando hay algún animal sospechoso a paratuberculosis?	1. Le realiza alguna prueba, cuál _____ 2. Lo aísla y continua su producción 3. Lo vende 4. Lo elimina hasta terminar su producción 5. Lo elimina 6. Nada 7. Otro:_____
6.13 ¿Tiene vacas positivas a Brucella?	1. Si 2. No 99. No sabe
6.14 ¿Si las vacas son positivas las separa?	1. Si 2. No 99. No sabe
6.15 ¿Tiene algún programa de limpieza y desinfección en funcionamiento?	1. Si 2. No (pasar a la pregunta 6.17) 99. No sabe
6.16 ¿Usa alguna o varias de estas sustancias en la desinfección del establo?	1. Solución de cal clorada (si) (no) 2. Cloruro de calcio (activo al 5%) (si) (no) 3. Formol del 3-5% (si) (no) 4. Fenol al 5% (si) (no) 5. Soluciones de Iodo (si) (no) 6. Glutaraldehído (si) (no) 7. Formaldehído (si) (no) 8. Hipoclorito de sodio al 1% (si) (no) 9. Criolina (si) (no) 99. No sabe
6.17 ¿En el almacén del alimento, se evita la entrada de fauna nociva? (Observar el almacén)	1. Si 2. No
6.18 ¿Existe una rutina de desinfección para los trabajadores y/o visitas previa a la entrada del establo y a la salida?	1. Si, para ambos 2. Si, solo para los trabajadores 3. Si, solo para los visitantes 2. No 99. No sabe
6.19 ¿Lleva registro de los visitantes que llegan a su establo?	1. Si 2. No 99. No sabe

<p>6.20 ¿A las visitas se les permite el libre acceso a cualquier área del establo?</p>	<p>1. Si 2. No, ¿a cuáles áreas? _____ 99. No sabe</p>
<p>6.21 ¿El establo cuenta con tapete sanitario en funcionamiento?</p>	<p>1. Si 2. No (pasar a la pregunta 6.23) 99. No sabe</p>
<p>6.22 ¿Con qué frecuencia se cambia el desinfectante del tapete sanitario?</p>	<p>1. Dos veces al día 2. Una vez al día 3. Una vez cada tercer día 4. Una vez a la semana 5. Otra _____ 99. No sabe</p>
<p>6.23 ¿El establo cuenta con un vado sanitario en funcionamiento para entrada de vehículos automotores?</p>	<p>1. Si 2. No (pasar a la pregunta 6.27)</p>
<p>6.24 ¿Con qué frecuencia se cambia el desinfectante del vado sanitario?</p>	<p>1. Dos veces al día 2. Una vez al día 3. Una vez cada tercer día 4. Una vez a la semana 5. Otra 99. No sabe</p>
<p>6.25 ¿Después del ordeño se les pone pediluvio a las vacas?</p>	<p>1. Si 1.1 Sulfato de cobre 1.2 Aguarras 1.3 Formol 1.4 Cal viva 2. No 99. No sabe _____</p>

7. Observaciones del entrevistador:

Nombre del entrevistador:

Firma: _____ Teléfono: _____

Correo electrónico: _____

Anexo 3. Operacionalización de las variables

Variable	Tipo	Definición conceptual	Escala de medición	Calificación
Resultado	Dependiente	Conclusión de cada muestra obtenida a través de prueba de ELISA	Cualitativa nominal	Negativo= 0 Positivo= 1 Sospechoso= 2
UPL	Independiente	Unidad de Producción Lechera donde se tomaron las muestras de los bovinos	Cualitativa nominal	UPL1 UPL2
Fecha	Independiente	Designación en el tiempo cuando se tomaron las muestras en las UPL's	Cuantitativa discreta	2011 2012 2013
Ocupación	Independiente	Acción o función que se desempeña el entrevistado dentro del establo	Cualitativa nominal	Administrador=1 Encargado= 2 Propietario= 3 MVZ área clínica= 4 MVZ área de reproducción= 5 MVZ área alimentación= 6 Otro= 7
Antigüedad	Independiente	Tiempo que lleva laborando en el establo	Cuantitativa continua	Años
Establo	Independiente	Pertenencia de la unidad de producción	Cualitativa nominal	Prestado= 1 Propio= 2 Rentado= 3 Otro= 4
Bodega	Independiente	Registro de que la unidad de producción cuenta con una bodega	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Corrales	Independiente	Registro de que la unidad de producción cuenta con corrales	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Sala de ordeño	Independiente	Registro de que la unidad de producción cuenta con sala de ordeño	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1

Variable	Tipo	Definición conceptual	Escala de medición	Calificación
Parideros	Independiente	Registro de que la unidad de producción cuenta con parideros	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Manga	Independiente	Registro de que la unidad de producción cuenta con manga de manejo	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
P. sanitario	Independiente	Registro de que la unidad de producción cuenta con pasillo sanitario	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Aislamiento	Independiente	Registro de que la unidad de producción cuenta con área de aislamiento	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Oficina	Independiente	Registro de que la unidad de producción cuenta con oficina	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Casa dueño	Independiente	Registro de que la unidad de producción cuenta con casa habitación para el propietario	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Casa empleados	Independiente	Registro de que la unidad de producción cuenta con casa habitación para los trabajadores	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Enfermería	Independiente	Área del corral de enfermería	Cuantitativa continua	Metros cuadrados
Número de Animales en enfermería	Independiente	Cantidad de animales que hay en el corral de enfermería	Cuantitativa discreta	Número de animales
Producción	Independiente	Área del corral de producción	Cuantitativa continua	Metros cuadrados
Número de Animales en producción	Independiente	Cantidad de animales que hay en el corral de producción	Cuantitativa discreta	Número de animales

Variable	Tipo	Definición conceptual	Escala de medición	Calificación
Secas	Independiente	Área del corral de secas	Cuantitativa continua	Metros cuadrados
Número de Animales en secas	Independiente	Cantidad de animales que hay en el corral de secas	Cuantitativa discreta	Número de animales
Jaulas	Independiente	Área del lugar designado para jaulas o becerrerías	Cuantitativa continua	Metros cuadrados
Número de Animales en jaula	Independiente	Cantidad de animales que hay en el área de jaulas	Cuantitativa discreta	Número de animales
Vaquillas	Independiente	Área del corral designado para las vaquillas	Cuantitativa continua	Metros cuadrados
Número de Animales en vaquillas	Independiente	Cantidad de animales que hay en el corral de vaquillas	Cuantitativa discreta	Número de animales
Reto	Independiente	Área del corral designado para vacas en reto, que son aquellas que se encuentran 15 días previas al parto	Cuantitativa continua	Metros cuadrados
Número de Animales en reto	Independiente	Cantidad de animales que hay en el corral de reto, que son aquellas que se encuentran 15 días previas al parto	Cuantitativa discreta	Número de animales
Gestantes	Independiente	Área del corral designado para vacas gestantes	Cuantitativa continua	Metros cuadrados
Número de Animales en gestantes	Independiente	Cantidad de animales que hay en el corral de gestantes	Cuantitativa Discreta	Número de animales
Holstein	Independiente	Raza de vaca especializada para la producción lechera	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Suizo	Independiente	Raza de vaca especializada para la producción lechera	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1

Variable	Tipo	Definición conceptual	Escala de medición	Calificación
Jersey	Independiente	Raza de vaca especializada para la producción lechera	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
H/J	Independiente	Híbrida resultante de la combinación de Holstein con Jersey	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
H/S	Independiente	Híbrida resultante de la combinación de Holstein con Jersey	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Criollas	Independiente	Ganado que no tiene raza como tal pero cuenta con características de resistencia	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Otra raza	Independiente	Raza en la unidad de producción diferente a las especializadas en leche	Cualitativa nominal	Otras razas
Hato	Independiente	Número de animales totales en la unidad de producción	Cuantitativa discreta	Número de animales
Vacas en producción	Independiente	Número de animales en ordeño en la unidad de producción	Cuantitativa discreta	Número de animales
Vacas secas	Independiente	Número de animales en período seco en la unidad de producción	Cuantitativa discreta	Número de animales
Vaquillas	Independiente	Número de vaquillas en la unidad de producción	Cuantitativa discreta	Número de animales
Becerras	Independiente	Número de becerras en la unidad de producción	Cuantitativa discreta	Número de animales
Sementales	Independiente	Número de sementales en la unidad de producción	Cuantitativa discreta	Número de animales

Variable	Tipo	Definición conceptual	Escala de medición	Calificación
Total empleados	Independiente	Cantidad de trabajadores que laboran en la unidad de producción	Cuantitativa discreta	Número de empleados
Administrador	Independiente	Persona (s) que lleva todo el control de la unidad de producción	Cuantitativa discreta	Número de administrador (es)
Encargado	Independiente	Persona (s) responsable de la unidad de producción	Cuantitativa discreta	Número de encargado (s)
Médico Veterinario	Independiente	Persona (s) responsables de la sanidad animal dentro de la unidad de producción	Cuantitativa discreta	Número de MVZ (s)
Pasturero	Independiente	Persona (s) encargada de recoger y tirar la pastura a los animales	Cuantitativa discreta	Número de pasturero (s)
Becerrero	Independiente	Persona (s) encargadas del área de crianza en la unidad de producción	Cuantitativa discreta	Número de becerrero (s)
Ordeñador	Independiente	Persona (s) encargada de la rutina de ordeño	Cuantitativa discreta	Número de ordeñador (es)
Tractorista	Independiente	Persona (s) encargada del tractor	Cuantitativa discreta	Número de tractorista (s)
Secretaria	Independiente	Persona (s) encargada de llevar los registros de la unidad de producción	Cuantitativa discreta	Número de secretaria (s)
Jornalero	Independiente	Persona (s) encargada de trabajar la tierra	Cuantitativa discreta	Número de jornalero (s)
Mantenimiento	Independiente	Persona (s) encargada de dar mantenimiento al equipo o maquinaria de la UPL	Cuantitativa discreta	Número de persona (s) encargadas del mantenimiento

Variable	Tipo	Definición conceptual	Escala de medición	Calificación
Chofer	Independiente	Persona (s) encargada de manejar maquinaria con motor	Cuantitativa discreta	Número de chofer (es)
Soldador	Independiente	Persona (s) encargada del arreglo de camas, corrales y comederos	Cuantitativa discreta	Número de soldador (es)
Otro empleo	Independiente	Otro tipo de labor dentro de la unidad de producción diferente a los mencionados	Cuantitativa discreta	Número de empleado (s)
Leche día	Independiente	Producción diaria de leche total	Cuantitativa continua	Número de litros
Leche vaca	Independiente	Producción diaria de leche por vaca	Cuantitativa continua	Número de litros
Número de Ordeños	Independiente	Cantidad de veces que son ordeñadas las vacas en la unidad de producción	Cuantitativa discreta	Una= 1 Dos= 2 Tres= 3
División de producción	Independiente	División de las vacas en producción de acuerdo a la cantidad de leche producida	Cualitativa nominal	Altas, medianas, bajas= 1 Altas, medianas= 2 Frescas, altas, medias, bajas= 3.1
Venta además leche	Independiente	Tipo de venta obtenido del ganado además de la leche	Cualitativa nominal	Becerras calostradas=1 Becerros calostrados= 2 Becerros sin calostrar= 3 Becerros al destete= 4 Becerras/ Vaquillas para reemplazo= 5 Sementales= 6 Otros=7
Destino leche	Independiente	Punto final de la leche producida en	Cualitativa nominal	Particular leche fluida= 1

		la Unidad de Producción		Particular quesos= 2 Otro= 3
Empresa particular	Independiente	Empresa a la que se vende la leche producida	Cualitativa nominal	Empresa 1=1 Empresa 2= 2
Premio o penalización	Independiente	Estímulo o castigo por parte de la empresa que compra la leche de acuerdo a la calidad obtenida en la unidad de producción	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Cuánto más premio o penalización (centavos)	Independiente	Cantidad extra o disminuida al precio de la leche de acuerdo a su calidad	Cuantitativa continua	Cantidad de premio o penalización
Condiciones comprador	Independiente	Restricciones por parte del comprador en cuanto a la unidad de producción	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Conteo células	Independiente	El comprador de la leche realiza el conteo de células somáticas de la leche de tanque	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Origen cría propia	Independiente	Animales que reemplazarán a los eliminados y que provienen de la misma unidad de producción	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Servicios MVZ	Independiente	La unidad de producción cuenta con servicios de MVZ	Cualitativa nominal	Sí, trabaja exclusivamente para este estable=1 Sí, atiende varias explotaciones= 2 No= 3
Número de partos desecho	Independiente	Promedio de partos en los que las vacas son consideradas desecho	Cuantitativa discreta	Número de partos

Variable	Tipo	Definición conceptual	Escala de medición	Calificación
Motivo desecho 1	Independiente	Motivo principal por el cual son desechadas las vacas	Cualitativa nominal	Baja producción= 1 Problemas reproductivos= 2 Problema de patas= 3
Motivo desecho 2	Independiente	Segundo motivo por el cual son desechadas las vacas	Cualitativa nominal	Baja producción= 1 Problemas reproductivos= 2 Problema de patas= 3
Motivo desecho 3	Independiente	Tercer motivo por el cual son desechadas las vacas	Cualitativa nominal	Baja producción= 1 Problemas reproductivos= 2 Problema de patas= 3
Destino desecho	Independiente	Punto final de los animales que se desechan	Cualitativa nominal	Rastro=1 Otro productor= 2 Engorda= 3
Número de desechos al año	Independiente	Porcentaje de desechos al año	Cuantitativa discreta	Porcentaje de desechos
Manejo becerras	Independiente	Prácticas que se realizan a las becerras de manera rutinaria	Cualitativa nominal	Limpieza y Desinfección del cordón umbilical= 1 Calostro= 2 Aplicación de vacunas= 3 Aretado= 4 Refractometría= 5.1
Edad destete	Independiente	Edad de las becerras a las que se les deja de administrar leche y/o sustituto	Cualitativa nominal	45 días= 1 50 días= 2 60 días= 3 Más de 60 días= 4
Total de muertes al mes	Independiente	Cantidad de animales fallecidos en toda la UPL por un mes	Cuantitativa discreta	Número de animales
Número de vacas muertas al mes	Independiente	Cantidad de animales adultos fallecidos durante el mes	Cuantitativa discreta	Número de vacas

Variable	Tipo	Definición conceptual	Escala de medición	Calificación
Número de becerras muertas al mes	Independiente	Cantidad de animales en etapa de crianza fallecidos durante el mes	Cuantitativa discreta	Número de becerras
Mezcla establos	Independiente	Combinación de animales entre un establo y otro	Cualitativa nominal	No= 0 Sí= 1 No sabe= 99
Da calostro	Independiente	Ofrecimiento de calostro a las becerras recién nacidas	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Evaluación del Calostro	Independiente	Evaluación del calostro por calostrómetro para conocer la calidad de éste	Cualitativa nominal	No= 0 Sí= 1 No sabe= 99
Manejo calostro	Independiente	Tratamiento al calostro	Cualitativa nominal	Se pasteuriza= 1 Se hierve= 2 Se congela= 3
Cantidad de calostro	Independiente	Número de litros de calostro ofrecido a las becerras	Cuantitativa discreta	2 litros= 1 3 litros= 2 4 litros= 3 Otra= 4
Momento calostro	Independiente	Tiempo en que se le administra calostro a las becerras recién nacidas	Cualitativa nominal	Al nacer= 1 Antes de 1 hora= 2 A las 3 horas= 3 A las 5 horas= 4 A partir de 1 hora= 5.1 A las 2 horas= 5.2
Procedencia calostro	Independiente	Origen del calostro ofrecido a las becerras	Cualitativa nominal	Madre= 1 Otras vacas= 2 No sabe= 99
Alimentación recría	Independiente	Medio por el cual es ofrecido el alimento a las becerras en crianza	Cualitativa nominal	Mamila= 1 Cubeta= 2 Sonda= 3 Otro= 4
Consumo recría	Independiente	Componentes de la dieta de las becerras en crianza	Cualitativa nominal	Sustituto de leche= 1 Leche de la madre= 2 Leche de sus vacas= 3 Otra forma= 4

				No sabe= 99
Tratamiento de la leche	Independiente	Procedimiento de la leche antes de ser proporcionada a las becerras	Cualitativa nominal	Se hierve= 1 Se pasteuriza= 2 Ninguno= 3 No sabe= 99
Número de alimentaciones becerro	Independiente	Cantidad de veces que se proporciona alimento a las becerras	Cuantitativa discreta	1 vez= 1 2 veces= 2 3 veces= 3 Otra= 4
Ensilado becerras	Independiente	Ingrediente existente en la dieta de las becerras	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Rastrojo maíz becerras	Independiente	Ingrediente existente en la dieta de las becerras	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Concentrado becerras	Independiente	Ingrediente existente en la dieta de las becerras	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Alfalfa achicalada becerras	Independiente	Ingrediente existente en la dieta de las becerras	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Alfalfa fresca becerras	Independiente	Ingrediente existente en la dieta de las becerras	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Canola becerras	Independiente	Ingrediente existente en la dieta de las becerras	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Desperdicio de panadería becerras	Independiente	Ingrediente existente en la dieta de las becerras	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
DDG becerras	Independiente	Ingrediente existente en la dieta de las becerras	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Naranja becerras	Independiente	Ingrediente existente en la dieta de las becerras	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Salvado becerras	Independiente	Ingrediente existente en la dieta de las becerras	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1

Variable	Tipo	Definición conceptual	Escala de medición	Calificación
Sales min becerras	Independiente	Ingrediente existente en la dieta de las becerras	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Maíz rolado becerras	Independiente	Ingrediente existente en la dieta de las becerras	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Zanahoria becerras	Independiente	Ingrediente existente en la dieta de las becerras	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Galleta becerras	Independiente	Ingrediente existente en la dieta de las becerras	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Heno avena becerras	Independiente	Ingrediente existente en la dieta de las becerras	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Otro ingrediente becerras	Independiente	Ingrediente existente en la dieta de las becerras diferente a los mencionados anteriormente	Cualitativa nominal	No= 0 Triticale= 19.1
Ensilado vacas	Independiente	Ingrediente existente en la dieta del ganado adulto	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Concentrado vacas	Independiente	Ingrediente existente en la dieta del ganado adulto	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Rastrojo vacas	Independiente	Ingrediente existente en la dieta del ganado adulto	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Maíz rolado	Independiente	Ingrediente existente en la dieta del ganado adulto	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Alfalfa achicalada	Independiente	Ingrediente existente en la dieta del ganado adulto	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Alfalfa fresca	Independiente	Ingrediente existente en la	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1

		dieta del ganado adulto		
Canola	Independiente	Ingrediente existente en la dieta del ganado adulto	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Zanahoria vacas	Independiente	Ingrediente existente en la dieta del ganado adulto	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
DDG vacas	Independiente	Ingrediente existente en la dieta del ganado adulto	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Galleta vacas	Independiente	Ingrediente existente en la dieta del ganado adulto	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Naranja vacas	Independiente	Ingrediente existente en la dieta del ganado adulto	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Heno avena vacas	Independiente	Ingrediente existente en la dieta del ganado adulto	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Salvado vacas	Independiente	Ingrediente existente en la dieta del ganado adulto	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Sales min vacas	Independiente	Ingrediente existente en la dieta del ganado adulto	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Aceites vacas	Independiente	Ingrediente existente en la dieta del ganado adulto	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Otro ingrediente vacas	Independiente	Ingrediente existente en la dieta del ganado adulto diferente a los mencionados anteriormente	Cualitativa nominal	Núcleo= 19.1 Triticale= 19.2
Número de Alimentaciones vacas	Independiente	Cantidad de veces en que se alimenta al ganado en un día	Cuantitativa ordinal	Una vez= 1 Dos veces= 2 Tres veces= 3 Más de 3= 4

Suministro alimento	Independiente	Manera de proporcionar el alimento	Cualitativa nominal	Manual, con pala y biello= 1 Tatoma (mezcladora)= 2 Tractor =3 Otro= 4
Diferencia entre dietas Altas Productoras	Independiente	Cantidad en kg. En que cambian las dietas para altas productoras	Cuantitativa continua	Cantidad en kg.
Diferencia entre dietas Medianas Productoras	Independiente	Cantidad en kg. En que cambian las dietas para medianas productoras	Cuantitativa continua	Cantidad en kg.
Diferencia entre dietas Bajas Productoras	Independiente	Cantidad en kg. En que cambian las dietas para bajas productoras	Cuantitativa continua	Cantidad en kg.
Ensilado secas	Independiente	Ingrediente existente en la dieta de las vacas en período seco	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Concentrado secas	Independiente	Ingrediente existente en la dieta de las vacas en período seco	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Rastrojo secas	Independiente	Ingrediente existente en la dieta de las vacas en período seco	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Maíz rolado secas	Independiente	Ingrediente existente en la dieta de las vacas en período seco	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Alfalfa achicalada secas	Independiente	Ingrediente existente en la dieta de las vacas en período seco	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Alfalfa fresca secas	Independiente	Ingrediente existente en la dieta de las vacas en período seco	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Canola secas	Independiente	Ingrediente existente en la dieta de las vacas en período seco	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Zanahoria secas	Independiente	Ingrediente existente en la	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1

		dieta de las vacas en período seco		
DDG secas	Independiente	Ingrediente existente en la dieta de las vacas en período seco	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Naranja secas	Independiente	Ingrediente existente en la dieta de las vacas en período seco	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Galleta secas	Independiente	Ingrediente existente en la dieta de las vacas en período seco	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Salvado secas	Independiente	Ingrediente existente en la dieta de las vacas en período seco	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Heno de avena secas	Independiente	Ingrediente existente en la dieta de las vacas en período seco	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Sales minerales secas	Independiente	Ingrediente existente en la dieta de las vacas en período seco	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Otro ingrediente secas	Independiente	Ingrediente existente en la dieta de las vacas en período seco diferente a los mencionado anteriormente	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Micotoxinas	Independiente	Utilización de un secuestrante de micotoxinas en la dieta	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Personal calores	Independiente	Existencia de personal encargado para la detección de estros en las vacas	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Número de personal calores	Independiente	Cantidad de personas encargadas de detectar calores en las UPL's	Cuantitativa discreta	Número de personas
Duración detectar calores	Independiente	Cantidad de horas dedicadas a la	Cuantitativa continua	Número de horas

		detección de calores		
Número de partos promedio	Independiente	Cantidad de partos promedio por vaca	Cuantitativa discreta	Cantidad de partos
Sincronización	Independiente	Realización de sincronización en vacas	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Producto sincronización	Independiente	Ingrediente comercial con el que sincronizan a las vacas	Cualitativa nominal	Ovalise= 1 Sincrosio= 2 Lutalise= 3 Sincroplex= 4 Celosin= 5 PG= 6.1
Edad primer parto	Independiente	Edad promedio al primer parto en meses	Cuantitativa continua	24 meses= 1 25 meses= 2 26 meses= 3 20.5 meses= 4.1
Intervalo entre partos	Independiente	Tiempo transcurrido entre un parto y otro en meses	Cuantitativa continua	12 meses= 1 13 meses= 2 14 meses= 3 14.6 meses= 4.1 14.2 meses= 4.2
Días abiertos	Independiente	Tiempo transcurrido entre el parto y que quede gestante nuevamente	Cuantitativa discreta	45 días= 1 60 días= 2 90 días= 3 155 días= 4.1 165 días= 4.2
Método gestación	Independiente	Procedimiento para gestar a las vacas	Cualitativa nominal	Inseminación artificial= 1 Monta natural= 2 Otro= 3
Servicios vaca concepción	Independiente	Cantidad de inseminaciones proporcionadas para que una vaca quede gestante	Cuantitativa discreta	1= 1 2= 2 3= 3 4= 4 5= 5 6= 6
Abortos al mes	Independiente	Porcentaje de abortos mensuales	Cuantitativa discreta	1%= 1 2%= 2 3%= 3 4%= 4.1
Tercio abortos	Independiente	Período dividido en tercios de la gestación en que se presentan la mayor cantidad de abortos	Cuantitativa discreta	1er. Tercio= 1 2do. Tercio= 2 3er. Tercio= 3
Fertilidad	Independiente	Porcentaje de fertilidad de las vacas	Cuantitativa discreta	Porcentaje de fertilidad

Variable	Tipo	Definición conceptual	Escala de medición	Calificación
Virales más leptospira	Independiente	Edad en meses a la que son aplicadas las vacunas virales y de leptospira	Cuantitativa discreta	Edad en meses
Leptospira refuerzo al año	Independiente	Cantidad de refuerzos de la vacuna de leptospira al año	Cuantitativa discreta	Cantidad de refuerzos
Clostridium al año	Independiente	Cantidad de veces al año en que se aplica la vacuna contra Clostridium	Cuantitativa discreta	Cantidad de veces
Brucella al año	Independiente	Cantidad de veces al año en que se aplica la vacuna contra Brucella	Cuantitativa discreta	Cantidad de veces
Bacterinas al año	Independiente	Cantidad de veces al año en que se aplican bacterinas	Cuantitativa discreta	Cantidad de veces
Lesiones a paratuberculosis en la necropsia	Independiente	Existencia de lesiones sugestivas a paratuberculosis en las necropsias realizadas	Cualitativa nominal	No= 0 Sí= 1 No sabe= 99
Presencia perros	Independiente	Existencia de perros en el establo	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Presencia gatos	Independiente	Existencia de gatos en el establo	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Presencia otros animales	Independiente	Existencia de otros animales diferentes a los ya mencionados en el establo	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Especie de los otros animales	Independiente	Tipo de los otros animales existentes en el establo	Cualitativa nominal	Caballos= 1 Pollo de engorda= 2 Patos= 3
Acceso otros perros y/o gatos	Independiente	Entrada libre al establo otros gatos o perros	Cualitativa nominal	No= 0 Sí= 1 No sabe= 99
Enfermedad Frecuente en Vacas 1	Independiente	Principal patología que afecta a las vacas de las UPL´s	Cualitativa nominal	Mastitis= 1 Acidosis= 2 Problemas podales= 3

				Metritis= 4 Neumonía= 5
Enfermedad Frecuente en Vacas 2	Independiente	Segunda patología que afecta a las vacas de las UPL's	Cualitativa nominal	Mastitis= 1 Acidosis= 2 Problemas podales= 3 Metritis= 4 Neumonía= 5
Enfermedad Frecuente en Vacas 3	Independiente	Tercera patología que afecta a las vacas de las UPL's	Cualitativa nominal	Mastitis= 1 Acidosis= 2 Problemas podales= 3 Metritis= 4 Neumonía= 5
Enfermedad Frecuente en Becerras 1	Independiente	Principal patología que afecta a las becerras de las UPL's	Cualitativa nominal	Neumonía= 1 Diarrea= 2 Indigestión= 3
Enfermedad Frecuente en Becerras 2	Independiente	Segunda patología que afecta a las becerras de las UPL's	Cualitativa nominal	Neumonía= 1 Diarrea= 2 Indigestión= 3
Enfermedad Frecuente en Becerras 3	Independiente	Tercera patología que afecta a las becerras de las UPL's	Cualitativa nominal	Neumonía= 1 Diarrea= 2 Indigestión= 3
Animales enfermos a la Semana	Independiente	Cantidad de animales que se enferman a la semana	Cuantitativa discreta	Cantidad de animales
Problemas fauna nociva	Independiente	Existen en el establo problemas de fauna nociva	Cualitativa nominal	No= 0 Sí= 1 No sabe= 99
Tipo probable fauna nociva	Independiente	Qué tipo de fauna nociva es con la que tiene conflicto	Cualitativa nominal	Aves= 1
Control fauna nociva	Independiente	Realización de un programa de control de fauna nociva	Cualitativa nominal	No= 0 Sí= 1 No sabe= 99
Control roedores	Independiente	Material utilizado para el control de roedores	Cualitativa nominal	Cebos= 1 Trampas= 2 Otro= 3
Control moscas	Independiente	Material utilizado para el control de moscas	Cualitativa nominal	Insecticidas= 1 Cinta adherente= 2 Otro= 3
Pruebas presencia paratuberculosis	Independiente	Realización de pruebas para determinar la	Cualitativa nominal	Sí, en el rancho de origen= 1

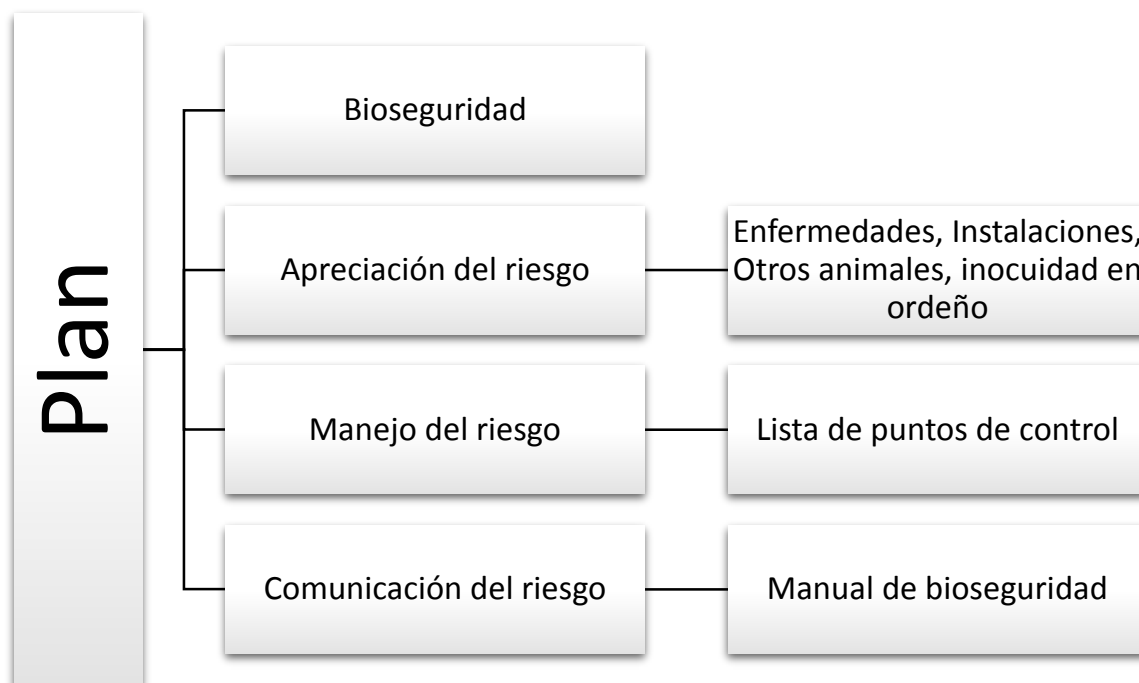
		presencia de paratuberculosis a animales de nuevo ingreso		Sí, al ingresar al establo= 2 No= 3 No sabe= 99
Actividad animal Sospechoso	Independiente	Realización de algún manejo especial cuando hay un animal sospechoso a paratuberculosis	Cualitativa dicotómica	Le realiza alguna prueba= 1 Lo aísla y continua su producción= 2 Lo vende= 3 Lo elimina hasta terminar su producción= 4 Lo elimina= 5 Nada= 6 Otro= 7
Prueba animal sospechoso	Independiente	Tipo de análisis diagnóstico utilizado para detectar MAP en las vacas de las UPL's	Cualitativa dicotómica	ELISA= 1 CF= 2 PCR= 3
Vacas Brucella	Independiente	Existencia de vacas positivas a Brucella en el establo	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Separa vacas Brucella	Independiente	Separación de vacas positivas a Brucella	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Programa limpieza y desinfección	Independiente	Existencia de algún programa de limpieza y desinfección en el establo	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Solución cal clorada	Independiente	Sustancia utilizada para la desinfección del establo	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Cloruro de calcio	Independiente	Sustancia utilizada para la desinfección del establo	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Formol	Independiente	Sustancia utilizada para la desinfección del establo	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Fenol	Independiente	Sustancia utilizada para la desinfección del establo	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1

Solución de Iodo	Independiente	Sustancia utilizada para la desinfección del establo	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Glutaraldehído	Independiente	Sustancia utilizada para la desinfección del establo	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Formaldehído	Independiente	Sustancia utilizada para la desinfección del establo	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Hipoclorito de sodio	Independiente	Sustancia utilizada para la desinfección del establo	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Creolina	Independiente	Sustancia utilizada para la desinfección del establo	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Almacén evita fauna nociva	Independiente	El almacén de alimento impide la entrada de fauna nociva	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Rutina desinfección para trabajadores y/o visitas	Independiente	Existencia en el establo de alguna rutina de desinfección para los trabajadores y/o visitas	Cualitativa nominal	Sí, para ambos= 1 Sí, sólo para los trabajadores= 2 Sí, sólo para los visitantes= 3 No= 4 No sabe= 99
Registro visitas	Independiente	Existencia de un registro de visitas en el establo	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Acceso visitas	Independiente	Visitas con libre acceso a cualquier área del establo	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Tapete sanitario	Independiente	Existencia de tapete sanitario en el establo	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Frecuencia cambio desinfectante tapete	Independiente	Frecuencia con que es cambiado el desinfectante del tapete sanitario	Cualitativa nominal	Dos veces al día= 1 Una vez al día= 2 Una vez cada tercer día= 3 Una vez a la semana= 4 Otra= 5

				No sabe= 99 No aplica=.
Vado sanitario	Independiente	Existencia de tapete sanitario en el establo	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Frecuencia cambio desinfectante Vado	Independiente	Frecuencia con que es cambiado el desinfectante del vado sanitario	Cualitativa nominal	Dos veces al día= 1 Una vez al día= 2 Una vez cada tercer día= 3 Una vez a la semana= 4 Otra= 5 No sabe= 99 No aplica=.
Pediluvio	Independiente	Existencia de pediluvio para las vacas después del ordeño en el establo	Cualitativa dicotómica	No= 0 Sí= 1
Sustancia pediluvio	Independiente	Sustancia activa presente en el pediluvio	Cualitativa nominal	Sulfato de cobre= 1.1 Aguarras= 1.2 Formol= 1.3 Cal viva= 1.4
Arete	Independiente	Sistema de identificación de cada animal	Cuantitativa discreta	Número de arete
Densidad óptica	Independiente	Cantidad de luz emitida en el pocillo a través del espectrofotómetro	Cuantitativa continua	Cantidad de densidad óptica
Cantidad Anticuerpos	Independiente	Número de anticuerpos contra paratuberculosis presentes en la muestra	Cuantitativa continua	Cantidad de anticuerpo
Porcentaje anticuerpos	Independiente	Porcentaje de anticuerpos contra paratuberculosis presentes en la muestra	Cuantitativa continua	Porcentaje de anticuerpos

Anexo 4. Programa de bioseguridad de las Unidades de Producción lechera

Se realizaron propuestas para mejorar la bioseguridad y con ello controlar de mejor manera la situación de la paratuberculosis bovina en cada Unidad de Producción.



- Para la UPL1

Área	Descripción	Punto de control
Entrada y salida	El área de entrada y salida queda abierta para todo el público y no cuenta con un vado sanitario, así como no hay control de visitas	Se recomienda instalar un vado sanitario con algún desinfectante como formol, fenol o cloro. Así como llevar un registro de visitantes y evitar que las personas sirvan como vehículo de las enfermedades
Entrada sala de ordeño	La entrada se encuentra libre y sin ningún tapete sanitario	Se recomienda ampliamente el uso de tapete sanitario para evitar problemas de mastitis y demás
Sala de ordeño	--	Se recomienda que los ordeñadores utilicen ropa y botas exclusivas para el ordeño, así como también continuar manteniendo la sala lo más limpia posible.

		Así como también el uso de un pediluvio que contenga sulfato de cobre, aguarras, formol o incluso cal viva al final del ordeño para minimizar el problema de patas
Corrales	Algunos corrales con estancamiento de aguas	Continuar con la limpieza diaria de los corrales, cambio de cama cuando lo requiera así como evitar el estancamiento de aguas en los mismos para prevenir problemas de patas y revisar continuamente los bebederos para evitar fuga de agua
Enfermería	Se encuentra muy cercana a los corrales	Evitar que los animales enfermos interactúan con los sanos para frenar la transmisión de enfermedades contagiosas y que disminuyen la producción
Almacén	Sin trampas para fauna nociva y con acceso a diferentes animales	Se recomienda el uso de alguna trampa para fauna nociva como cebos, etc. Así como también mejorar la ventilación del lugar
Perros y gatos	Libre acceso a perros y gatos	Se recomienda limitar el acceso de perros y gatos por lo menos a los corrales de parto, sala de ordeño y comederos para evitar transmisión de enfermedades y propagación de las mismas
Recría	Gran cantidad de moscas, calostro congelado, humedad	Se recomienda un control de moscas en el área, dar un tratamiento térmico al calostro y leche proporcionada por lo menos hervirla, limpieza constante del área y secado de la misma

Médicos Veterinarios	Los médicos que laboran no son exclusivos del establo	Se recomienda ampliamente que no sean vectores mecánicos, es decir limpieza de botas, limpieza de overol o ropa de trabajo entre cada establo que visite.
Laboratorio	--	Se recomienda evaluar las vacunas para saber si realmente están protegiendo a los animales, monitoreo continuo de la leche y de los animales con mastitis para combatirlas de manera efectiva y evitar resistencia a antibióticos

- Para la UPL2

Área	Descripción	Punto de control
Sala de ordeño	Introducción de animales al área de producción sin conocer su estatus sanitario previo	Se recomienda cuarentenar y enviar muestras al laboratorio de los animales de reciente introducción, para evitar el ingreso de la paratuberculosis y otras enfermedades.
Sala de ordeño	Animales enfermos en producción	Animales enfermos y que aún siguen en línea de producción, ordeñar al final para evitar la contaminación de pezoneras y la propagación de enfermedades hacia los demás animales en producción.
Enfermería	Área de enfermería cercana a los corrales de producción	Se recomienda aislar de manera más lejana a los animales enfermos para evitar la propagación de infecciones con los demás animales del establo.
Enfermería	Animales con diagnóstico positivo a paratuberculosis continúan en enfermería	Se recomienda aislarlos y eliminarlos en lo posible. Recordando que no existe un tratamiento efectivo contra la paratuberculosis y mantener a los animales con diagnóstico positivo resulta en una pérdida económica.
Alimentación	Raciones de vacas a vaquillas y becerras	Evitar dar raciones de las vacas productoras a las becerras y vaquillas, ya que si se encuentra un animal infectado de manera subclínica, el alimento se encontrará contaminado con la bacteria que adquirirán

		en el área de crianza. Cabe mencionar que esto no sólo sucede para el caso de paratuberculosis, sino también para diversas enfermedades
Corrales y bebederos	Sucios	Es altamente recomendable mejorar la higiene de los corrales y bebederos ya que la propagación de estiércol es un factor de riesgo para la presentación de diversas enfermedades.
Crianza	Calostro de madres positivas a paratuberculosis	Evitar obtener calostro de animales sospechosos, pues aunque se pasteuriza, está comprobado que la micobacteria sobrevive al proceso de pasteurización
Parideros	Sucios	Se sugiere mejorar la limpieza en el área de partos, pues es una vía de entrada fácil para la bacteria en una becerria recién nacida, así como también se evitarán más patógenos y con ello otras enfermedades

Anexo 5. Realización de PCR- RT en seis muestras de tejido y examen histopatológico.

El diagnóstico de la paratuberculosis a través de tejidos o muestra fecal se ha basado durante mucho tiempo en el examen histopatológico y el cultivo. La examinación por histopatología se basa en cortes con tinciones de hematoxilina y eosina (H-E), y después con tinción de Ziehl- Neelsen, sin embargo este método no es muy sensible y específico para dar un diagnóstico definitivo de paratuberculosis⁴³. El cultivo es un método muy específico, sin embargo con el tiempo se vuelve insensible^{119, 120}.

En los últimos años, el diagnóstico por PCR se ha basado en la detección del elemento de inserción 900 (IS900). La PCR es un método rápido y específico, sin embargo, su sensibilidad se basa en la cantidad de bacilos presentes en la muestra^{121, 122, 123}. Así mismo, la sensibilidad también depende de la eficiencia en el aislamiento del ADN en la muestra, las condiciones de amplificación y el método de detección en los productos de la PCR¹²⁴.

Se realizó la PCR en tiempo real con el diseño de iniciadores para la región IS900 de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* con juegos de reactivos y equipos comerciales automatizados de Roche® a seis animales positivos a prueba de ELISA. Adicionalmente se realizó un estudio histopatológico.

A los animales positivos se les realizó insensibilización con pistola de perno cautivo y fueron ingresando al rastro previo aturdimiento, se continuó con la sangría por degüello y desarticulación de la cabeza, corte de patas y con el corte de línea media e inicio del desollamiento de los animales, durante el ascenso de las canales se realizó la evisceración torácica y abdominal, en la sala de vísceras verdes se realizó la revisión de lesiones y la toma de muestras (Figura 6). De cada animal se tomaron aproximadamente 50 g de tejido con lesiones sugestivas, los cuales se colocaron en solución saturada de borato de sodio y en formalina amortiguada al 10% manteniéndolas en refrigeración hasta ser procesadas. Para el estudio de histología, el tejido obtenido fue enviado a un laboratorio particular para ser procesado en infiltración de parafina para su corte en secciones de 3µm y realizarles las tinciones de Hematoxilina-Eosina y Ziehl-Neelsen (BAAR). Posteriormente se realizó la evaluación histológica de los cortes para determinar el grado y tipo de lesión (Figura 7).

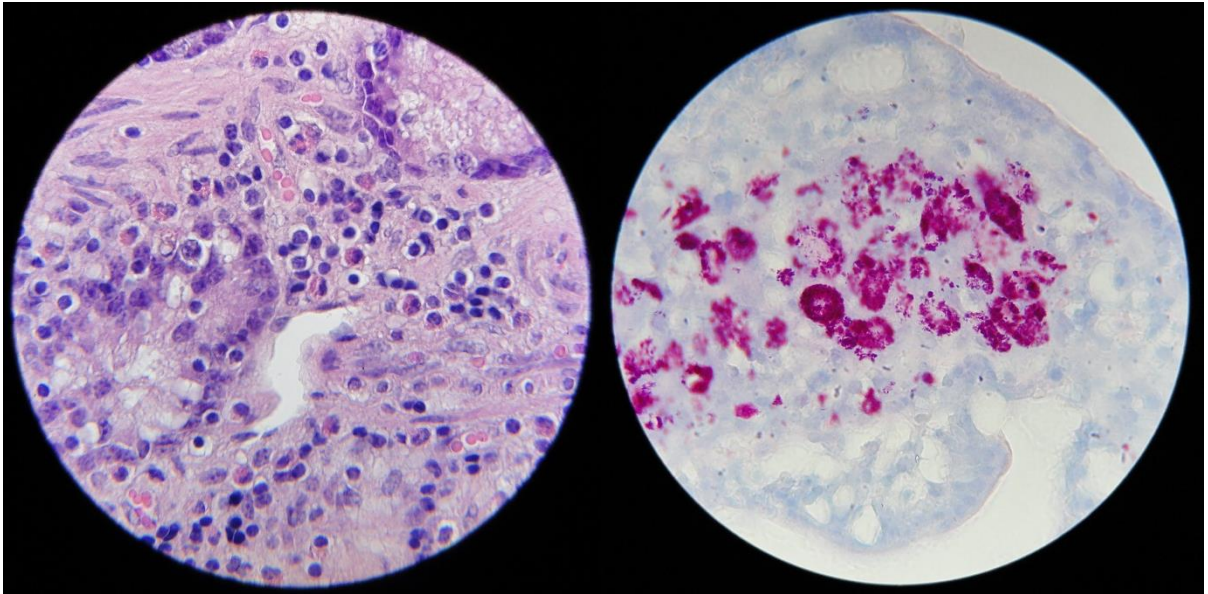
Inicialmente se revisaron diversas bases de datos para la obtención de la secuencia genómica de MAP, con programas bioinformáticos comerciales se realizó el diseño de los siguientes iniciadores Fw 5'-GAT CGC TGT GTA AGG ACA CG y Rw 5'-CCT CCG TAA CCG TCA TTG TC. La extracción de ADN se realizó por un sistema automatizado con sistema de perlas magnéticas para la purificación del ADN y juegos de reactivos para bacterias. El tejido procesado inicialmente fue macerado con PBS estéril, centrifugado a 3500 g por 10 min, para utilizar 130 µl del sobrenadante y realizar la extracción. Finalmente se obtuvieron 100 µl de ADN de los cuales se utilizaron 5 µl para la reacción final de PCR. Para el PCR en tiempo

real se utilizó un juego de reactivos comercial del cual se preparó la mezcla como lo refiere el fabricante para solo agregar de manera adicional: 5 μl del ADN, 0.4 μl de cada iniciador y sonda a una concentración de (10pM de c/uno), un volumen de 12 μl de mezcla de PCR llevando todo a un volumen final de 20 μl . Las condiciones de corrida en el termociclador fueron 95°C por 10 minutos (desnaturalización inicial), 45 ciclos de 95°C por 10 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 1 segundo marcando en ese punto la cuantificación (adquisición) y un enfriamiento final de 40°C por 30 segundos (Gráfica 1, 2,3).

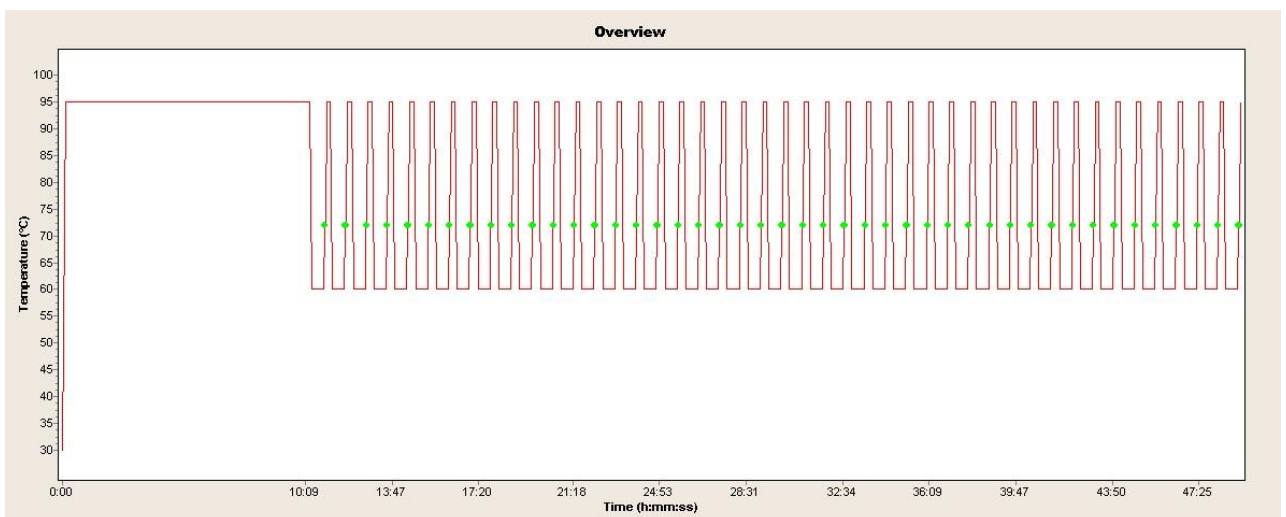
Figura 6. Colección de los tejidos utilizados para histología y extracción del ADN



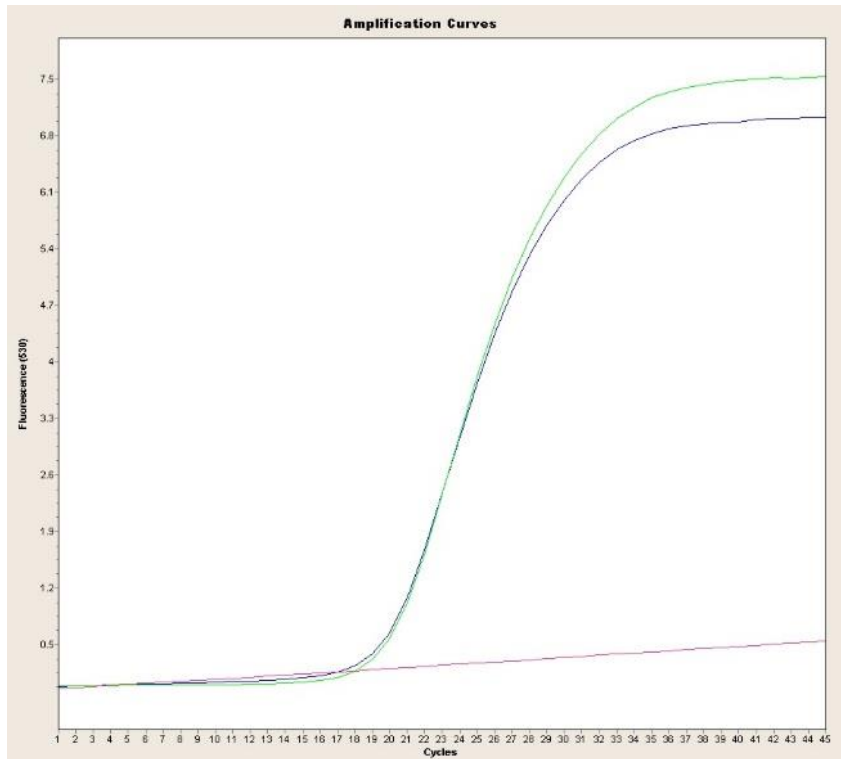
Figura 7. Revisión histológica de las lesiones y reconocimiento de las BAAR en los tejidos



Gráfica 3. Termograma de la corrida de la PCR con la adquisición durante la extensión



Gráfica 4. Amplificación durante el ciclaje del PCR en las muestras



Gráfica 5. Termograma de la corrida de la PCR con la adquisición durante la extensión

