



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

Seroprevalencia de *Mycobacterium avium* subespecie
paratuberculosis en el ganado bovino lechero del CEIEPAA.

TESIS DE LICENCIATURA.

Para obtener el título de:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA.

PRESENTA:

Nancy Guadalupe González Hernández.

ASESORES:

Dr. Gilberto Chávez Gris.
M en MVZ Iván Carrisoza Urbina.

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2019





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.

AGRADECIMIENTOS.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por todo.

Al proyecto PAPIIT IT 201118: “Evaluación de la vacuna recombinante P35 en modelo murino y en animales infectados naturalmente con *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*”, por el financiamiento económico aportado.

Al Dr. Mauricio Miguel Estrada, por el apoyo con en el análisis estadístico de este trabajo.

A la Dra. Edith Maldonado Castro, por todo el apoyo que me brindó, por la paciencia y el tiempo para enseñarme, por compartirme un poco de sus conocimientos.
¡Muchísimas gracias!

Al Dr. Iván Carrisoza Urbina, por la confianza que puso en mi para ofrecerme este proyecto, por todo el apoyo que me brindó durante la elaboración del mismo.

Al Dr. Gilberto Chávez Gris, por el apoyo otorgado en este proyecto, por brindarme sus conocimientos y su tiempo para mejorar mi trabajo.

DEDICATORIAS.

A mis papás, por sus consejos y sus regaños, por todo su esfuerzo para brindarnos lo mejor, por su paciencia y por siempre darnos ánimos para seguir. A mi mamá, por levantarse cada día a despertarme para ir a clases. A mi papá, por dar todo con tal de que nada nos falte. A Daniel y Adrián, por ser los mejores hermanos, por darme la felicidad de ser tía; así mismo, a Erick, Michelle y Tamara, porque si un día leen este trabajo, quiero que sepan que también es por y para ustedes. Porque sin todos ustedes no hubiera podido lograrlo, los amo. ♥

A mi abuelito, donde sea que esté... ¡sí se pudo, abue!, gracias por todo. A mis tíos y primos que siempre me apoyaron, gracias por confiar en mi. ♥

A Edit, por estar siempre... ¡nunca me faltes! ♥. A mis amigos CEIEPAAños: Giselle, Andrea, Itzel, Olga, Brenda, Marquito, Lalo, Mariana y Gil, por todas las risas, la compañía, los chismes y los taquitos.

A la Asociación Do Shim - Tae Kwon Do, con especial mención al profesor Ricardo Martínez Molina y al CCC, por enseñarme valores que trascendieron más allá de las artes marciales.

Nuevamente a mi asesor, el Dr. Iván Carrisoza Urbina, por poner su confianza en mi para este proyecto, por estar siempre apoyándome. Por tener toda la paciencia para transmitirme sus conocimientos, por todas las risas, el cansancio y los chismes de cada fin de semana. Por ser el mejor asesor y profesor que existe. 😊

Dra. Yesmin, Dr. Miguel, Dr. Allan e Ing. Chelis, ¡gracias por los ánimos! 😊

A Katty, Ramón, Ramiro, Marcela, Sebastián, Ruperta, Julia, Bruno, Vilma, Memo, y demás miembros cuadrúpedos de la familia, por ser mi fuente de inspiración para estudiar, por brindarnos todo su amor de manera incondicional.

A todos los animales, desde los más pequeños hasta los más grandes, que dan su vida para la formación de los Médicos Veterinarios Zootecnistas.

“Creo que el uso de animales para la alimentación es un acto ético, pero tenemos que hacerlo bien. Tenemos que dar a los animales una vida decente y tenemos que darles una muerte sin dolor. Le debemos respeto a los animales.”

- Temple Grandin.



CONTENIDO:

RESUMEN.	1
1. - Introducción.	2
1.1. - Género <i>Mycobacterium</i>	3
1.2. - <i>Mycobacterium avium</i> subespecie <i>paratuberculosis</i>	6
1.2.1. - Cepas.	7
1.2.2. – Efecto de la pasteurización sobre MAP.	7
1.2.3. - Dependencia de micobactina.	8
1.2.4. - Ácido-alcohol resistencia.	9
1.2.5. - Intermitencia en la eliminación bacteriana.	10
1.2.6. - MAP y Enfermedad de Crohn.	10
1.3. - Epidemiología de la enfermedad.	11
1.3.1. - Situación epidemiológica en México.	11
1.4. - Transmisión de la enfermedad.	12
1.5. - Tejido linfoide asociado al intestino.	13
1.5.1. – Conformación del GALT organizado.	15
1.5.2. – Conformación del GALT difuso.	17
1.6. - Patogenia y lesiones.	18
1.7. – Respuesta inmune a la enfermedad.	20
1.8. - Medidas de control.	25
1.9. - Métodos de diagnóstico.	26
1.9.1. – Anatomopatología.	27
1.9.2. – Pruebas de diagnóstico directo.	28

1.9.3. –Pruebas de diagnóstico indirecto.	29
1.10. - Importancia económica en el hato lechero.	33
2. – Justificación.....	35
3. - Objetivo general.....	36
3.1. - Objetivos específicos.....	36
4. - Hipótesis.	38
5. - Material y métodos.....	38
5.1. – Marco experimental.....	39
5.1.1. – Toma de muestra sanguínea para la obtención de plasma.	40
5.1.2. – Obtención de heces para realizar frotis fecal, cultivo bacteriano y PCR IS900.	40
5.2. - Procesamiento de muestras en el laboratorio.....	40
5.2.1. -Obtención de plasma sanguíneo para realizar ELISA P35 indirecto. ...	40
5.2.2. - Procesamiento de las muestras fecales.	42
6. – Resultados.	44
6.1. - Resultados descriptivos de ELISA P35 indirecto y frotis fecal, para la clasificación “Etapas productivas”.	45
6.2. – Resultados descriptivos de ELISA P35 indirecto y frotis fecal, para la clasificación “Edades”.	49
6.3. - Resultados descriptivos de ELISA P35 indirecto y frotis fecal, para la clasificación “Razas”.	51
6.4. – Resultados de PCR IS900 realizado a frotis fecales con presencia de BAAR.	54
6.5. – Comparación estadística de los resultados de ELISA P35 indirecto, entre estratos de las diferentes clasificaciones.....	56
6.5.1. - Comparación estadística de los resultados de ELISA P35 indirecto, para los estratos de la clasificación “Etapas productivas”.	57

6.5.2. – Comparación estadística de los resultados de ELISA P35 indirecto, para los estratos de la clasificación “Edad”.....	58
6.5.3. - Comparación estadística de los resultados de ELISA P35 indirecto, para los estratos de la clasificación “Raza”.....	61
6.6. - Propuestas para el control de PTB en el Módulo de Bovinos Lecheros del CEIEPAA.	63
6.6.1. - Estrategias para implementar la bioseguridad en el módulo.	63
6.6.2. - Estrategias para disminuir la incidencia de PTB en el hato.	64
6.6.3. - Estrategias para evaluar el avance en el control de PTB.	67
7. - Discusión.....	67
8. - Conclusiones.....	75
9. - Bibliografía.	77
10. - Anexos.	88

Índice de figuras.

Figura 1. - Conformación de la pared celular de las micobacterias.	3
Figura 2. - Representación del GALT y sus dos componentes: el GALT organizado y el GALT difuso.....	14
Figura 3. - Estructura de un linfonodo mesentérico.	16
Figura 4. - Elaboración de alícuotas de plasma sanguíneo para realizar ELISA P35 indirecto.	41
Figura 5. - Elaboración de frotis fecales utilizando una gota de la interfase de la muestra.	43
Figura 6. - Frotis fecales positivos.	53
Figura 7. – Productos de 310pb, correspondientes a la PCR IS900.	55

Índice de cuadros.

Cuadro 1. - Resultados de serología y frotis fecal por “Etapa productiva”.....	46
Cuadro 2. - Resultados de serología y frotis fecal por “Edad”.....	50
Cuadro 3. - Resultados de serología y frotis fecal por “Raza”.....	52
Cuadro 4. - Resultados obtenidos para la clasificación “Etapa productiva”.....	57
Cuadro 5. - Cuadro de comparación de los valores de p para la clasificación “Etapa productiva”.....	57
Cuadro 6. - Seroprevalencia a MAP para la clasificación “Etapa productiva”.....	58
Cuadro 7. – Resultados obtenidos para la clasificación “Edad”.....	59
Cuadro 8. - Comparación de los valores de p para los grupos de la clasificación “Edad”.....	59
Cuadro 9. - Seroprevalencia a MAP para la clasificación “Edad”.....	60
Cuadro 10. - Resultados obtenidos para la clasificación “Raza”.....	61
Cuadro 11. - Cuadro de comparación de los valores de p para los grupos que conforman la clasificación “Raza”.....	61
Cuadro 12. - Seroprevalencia a MAP para la clasificación “Raza”.....	62

Índice de gráficos.

Gráfico 1. - Representación gráfica de los resultados de serología y frotis fecal para la clasificación “Etapa productiva”.....	46
Gráfico 2. – Representación gráfica de los resultados de serología y frotis fecal para la clasificación “Edad”.....	50
Gráfico 3. - Representación gráfica de los resultados de serología y frotis fecal para la clasificación “Raza”.....	52

Índice de planos.

Plano 1. - Predios que comprenden el pastoreo del módulo de Bovinos Lecheros.	47
Plano 2. - Seropositividad a MAP en el área de pastoreo del módulo de Bovinos de Leche.....	48

Índice de anexos.

Anexo I. - ELISA P35 indirecto.	88
Anexo II. – Descontaminación de las muestras.....	92
Anexo III. – Frotis fecal.....	93
Anexo IV. - Método de tinción ZN.....	93
Anexo V. – Cultivo fecal.	95
Anexo VI. -PCR IS900.....	100
Anexo VII. – Acotaciones de los planos.	105

RESUMEN.

GONZÁLEZ HERNÁNDEZ NANCY GUADALUPE. Seroprevalencia de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* en el hato bovino lechero del CEIEPAA. Asesores: Dr. Gilberto Chávez Gris; M en MVZ. Iván Carrisoza Urbina.

La paratuberculosis es una enfermedad infectocontagiosa crónica, degenerativa e incurable que se caracteriza por la emaciación progresiva del animal y diarrea. Es causada por *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (MAP). Afecta a ruminantes domésticos y silvestres, ocasiona pérdidas económicas en hatos lecheros por reducción en la producción, aumento en casos de mastitis y de días abiertos, así como bajo peso al rastro. Se diagnostica por medio de estudios anatomopatológicos y la observación de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR), así como otras pruebas de laboratorio entre las que se incluyen: cultivo bacteriológico, PCR IS900 y ELISA. Se colectaron 170 muestras de heces y sangre completa pertenecientes a los bovinos lecheros del Centro de Enseñanza, Investigación y Producción Animal en Altiplano (CEIEPAA). Se realizó ELISA P35 indirecto al plasma, frotis fecal teñidos con ZN y PCR IS900 a las muestras de animales positivas a BAAR en heces, los resultados se analizaron por edades, etapa productiva y raza. Observándose la mayor seropositividad en bovinos de 37 a 48 meses de edad (87.5%); por etapa productiva, se obtuvo en las productoras (75%) y por raza, se obtuvo en bovinos Holstein (53.3%). Con respecto a la detección de BAAR en heces, se observó 6.9% en el grupo de 25 a 36 meses de edad y 4.3% en las novillas, correspondiendo todos estos animales a la raza Holstein. En estos mismos casos, se confirmó que los BAAR detectados correspondieron a MAP, a través de la PCR IS900.

1. - Introducción.

La paratuberculosis (PTB), también conocida como Enfermedad de Johne (JD, por sus siglas en inglés: *Johne Disease*), es una enfermedad infectocontagiosa crónica, degenerativa e incurable que se caracteriza por emaciación progresiva del animal y diarrea (OIE, n.d.; Limón *et al.*, 2011). Afecta a los rumiantes domésticos y silvestres. El agente causal también ha sido aislado de animales no rumiantes como conejos, gatos, zorros, zarigüeyas, armiños, comadrejas, osos, mapaches, armadillos, entre otros (CFSPH, 2007; Singh *et al.*, 2014). La PTB es una enfermedad de progreso lento, el periodo de incubación puede ser de al menos 2 años (Rebhun, 1995; Kahn, 2010; Fecteau, 2018).

En 1895 fue descrita por primera vez por Johne y Frothingham, los cuales demostraron la presencia de bacilos ácido-alcohol resistente (BAAR) en secciones de intestino de vaca disecado. Los BAAR, indistinguibles del bacilo tuberculoso, los hizo pensar en un caso atípico de tuberculosis (TB). En 1906 Bang retomó el caso y determinó que no era dicha enfermedad, llamándola enteritis pseudotuberculosa o JD. En 1910 Twort aisló el microorganismo, nombrándolo *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis johne*, más tarde se denominó como *Mycobacterium johnei*, posteriormente *Mycobacterium paratuberculosis* y, más recientemente, como *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (MAP) (Chiodini *et al.*, 1984; Clarke, 1997).

1.1. - Género *Mycobacterium*.

Las micobacterias son bacilos inmóviles con una pared celular que les confiere gran resistencia, pueden sobrevivir en el pasto por más de un año y en el agua por un tiempo mayor a lo que sobreviven en el suelo (Kahn, 2010); así mismo, cuando hay humedad pueden resistir por largo tiempo a temperaturas frías, en cambio el calor y la sequedad reducen esta posibilidad (Rebhun, 1995). Hernández-Reyes (2018), describe en su tesis la pared celular de la siguiente manera: péptidoglicanos rodeando la membrana celular, seguido de una capa de arabinogalactanos que están unidos de forma covalente a los ácidos micólicos (Figura 1). Además de la resistencia al medio ambiente, la pared celular que poseen les da la característica de ser ácido-alcohol resistentes (AAR), por lo que no son visibles en tinción Gram. Si los ácidos micólicos son extraídos de su membrana con etanol, pierden esa característica, quedando bacilos Gram-positivos (Madigan *et al.*, 2004).

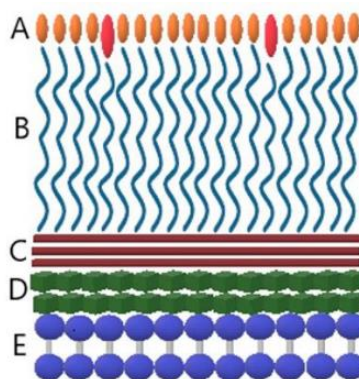


Figura 1. - Conformación de la pared celular de las micobacterias. A) Ácidos grasos B) Ácidos micólicos C) Arabinogalactanos D) Péptidoglicanos E) Membrana celular. Tomada de Hernández-Reyes, (2018).

A este género bacteriano se le han designado varias clasificaciones, Madigan *et al.*, (2004) mencionan dos: el primero, con base en su velocidad de crecimiento, lo divide en dos: micobacterias de crecimiento rápido y micobacterias de crecimiento lento, y el segundo, con base en su pigmentación, lo divide en tres: micobacterias no pigmentadas, micobacterias fotocromogénicas, que son aquellas que producen pigmentación en presencia de luz, y las micobacterias escotocromogénicas, que producen pigmento en ausencia de luz. Por otro lado, Ruiz Manzano *et al.*, (1998); Dorronsoro & Torroba, (2007) y Pfyffer, (2015), mencionan la división del género *Mycobacterium* en 2 complejos: el complejo *Mycobacterium tuberculosis* y el complejo de las micobacterias no tuberculosas. En el primero se encuentran las bacterias causantes de tuberculosis como *M. bovis* y *M. tuberculosis*, mientras que en el segundo se clasifica el Complejo *Mycobacterium avium* (MAC, por sus siglas en inglés: *Mycobacterium avium complex*), el cual está conformado por cuatro subespecies: subsp. *avium*; subsp. *silvaticum*; subsp. *hominissuis* y subsp. *paratuberculosis*.

Ruiz Manzano *et al.* (1998), mencionan que las micobacterias del complejo no tuberculoso deben de cumplir con las siguientes características:

- No ser patógenas primarias
- Hallarse distribuidas por los diversos ecosistemas
- Ser capaces de que el hospedero desarrolle enfermedad en momentos de inmunodeficiencia

En el complejo de micobacterias no tuberculosas, también se encuentran más de 150 especies de micobacterias ambientales (Pfyffer, 2015).

Debido a que las bacterias del género *Mycobacterium* se clasifican como Gram-positivas, existe otra clasificación basada en el porcentaje de las bases Guanina y Citocina (G-C) en su ácido desoxirribonucleico (ADN) ya sea por debajo o por encima del 50% mol, pudiendo incluirse en uno de dos subgrupos: bacterias con bajo contenido de G-C y bacterias con alto contenido de G-C (Madigan *et al.*, 2004). El género *Mycobacterium* posee alto contenido de G-C (62 – 70 % mol), al igual que otros géneros bacterianos como *Nocardia* (61 – 72 % mol) y *Corynebacterium* (51 – 65 % mol), por lo que los compuestos antigénicos de membrana tales como glucolípidos, glucopeptidolípidos y lipoligosacáridos pueden presentar reacción cruzada con sus homólogos presentes en la pared celular de dichos géneros bacterianos, de igual forma, con los presentes en otras micobacterias (Cummins, 1962; Vega-López & Macotela-Ruíz, 1991; Madigan *et al.*, 2004; Pfyffer, 2015), razón por la cual se pueden dar falsos positivos en las pruebas de diagnóstico, por ejemplo, en la prueba de intradermorreacción (de Ward, 2005; Álvarez *et al.*, 2008). Muchos de los antígenos presentes en el MAC también están presentes en *M. leprae* y *M. tuberculosis*, algunos de ellos son la proteína de choque térmico 18kDa, el antígeno secretado 85 B y la lipoproteína altamente antigénica 19 kDa. La proteína 35 kDa está relacionada con la inducción de respuesta inmunitaria celular y la producción de interferón-gamma (IFN- γ), fue encontrada en *M. leprae* y el MAC, se considera una de las principales proteínas de membrana (MMP-I) junto con la bacterioferritina (MMP-II); sin embargo, el gen para la proteína 35kDa no está presente en *M. tuberculosis*, ni en *M. bovis* BCG. (Triccas *et al.*, 1998; Basagoudanavar *et al.*, 2006).

Las micobacterias tienen diferentes factores de virulencia con los que logran la supervivencia intracelular, aunque en MAP estos mecanismos aún no están bien descritos, distintos estudios con micobacterias patógenas, principalmente *M. tuberculosis*, han demostrado cómo estas bacterias logran su supervivencia (Hostetter *et al.*, 2003). Uno de estos mecanismos es el lipoarabinomano (LAM), un componente altamente antigénico de la pared de las micobacterias que además está asociado con la inhibición de la unión fagolisosomal, al evitar la acidificación de la vacuola fagocítica, la inhibición de la señalización por IFN- γ y la inhibición de la apoptosis del macrófago (Briken *et al.*, 2004).

1.2. - *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*.

MAP es un bacilo intracelular facultativo, AAR, Gram-positivo, mide entre 0.5 – 1.5 μm y es de lento crecimiento en cultivo bacteriológico (Chiodini *et al.*, 1984; Clarke, 1997). La gran cantidad de ácidos micólicos presentes en su pared celular contribuyen a que esta bacteria sea resistente a muchos antibióticos (Martínez-Herrera *et al.*, 2012). Se considera que los antibióticos efectivos para esta enfermedad son los mismos utilizados en el tratamiento de TB en humanos, por lo que debido al desarrollo de resistencia no es recomendable administrarlos en animales, por lo cual se considera que no existe un tratamiento efectivo para la PTB (Martínez-Covarrubias, 2012, CFSPH, 2007; Martínez-Herrera *et al.*, 2012).

1.2.1. - Cepas.

Collins *et al.*, (1990) y Dohmann *et al.*, (2003) mencionan dos tipos principales: la cepa I o cepa S (*Sheep*) que se encuentra en ovejas, y la cepa II o cepa C (*Cattle*) en el ganado bovino. Pruebas más específicas como la técnica de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), han permitido encontrar otras cepas, Pavlik *et al.*, (1999); de Juan *et al.*, (2006) y Griffiths *et al.*, (2008) mencionan la existencia de la cepa III o I (Intermedia) hallada principalmente en pequeños rumiantes. Además, Whittington *et al.*, (2001) mencionan la cepa B, la cual aislaron de bisontes en Montana, Estados Unidos.

1.2.2. – Efecto de la pasteurización sobre MAP.

De acuerdo al Codex Alimentarius (2009), hay dos tipos de pasteurización: a 72°C por 15 segundos (operación continua o pasteurización rápida a alta temperatura) y a 63°C por 30 minutos (operación discontinua o pasteurización lenta a baja temperatura); por otro lado este código menciona que la esterilización comercial de la leche o tratamiento a temperatura ultra alta (UHT) se realiza a temperaturas que van de 135 a 150°C, sin mencionar un tiempo de retención establecida. Con base en lo anterior, diversos autores han realizado estudios para poner a prueba al MAP bajo estas temperaturas y tiempos de pasteurización, así como a temperaturas y tiempos variables: Chiodini & Hermon-Taylor (1993), sometieron leche a

pasteurización por a 63°C por 30 min. y 72°C por 15 segundos; Grant *et al.* (2002), pasteurizaron leche a 75°C por 15 y 25 segundos; Mcdonald *et al.* (2005), a 72°C, 75°C y 78°C por 15, 20 y 25 segundos, encontrándose que, aunque la concentración bacteriana se reduce, el microorganismo no desaparece por completo. Por otro lado, Hope, Tulk & Condrón, (1996), pasteurizaron 5 lotes de leche a 71°C- 75°C por 25 a 35 segundos y en ninguno se logró el aislamiento de la micobacteria, así también pasteurizaron 4 lotes a diferentes temperaturas con el mismo tiempo: 82°C, 82.5°C, 90°C y 92°C por 15 segundos, en el que se aisló MAP en el lote pasteurizado a 82°C durante 15 segundos, lo cual sugiere que tanto aumentar el tiempo como la temperatura en los procesos de pasteurización son capaces de eliminar al MAP.

Adicionalmente, Meylan *et al.* (1996), pasteurizaron calostro a 63°C por 30 min, encontrando que MAP solamente no desapareció, sino que la concentración de inmunoglobulina del isotipo G (IgG) que contenía el calostro, disminuyó un 12.3%, sin embargo, Godden, (2008), menciona que la pasteurización de calostro a 60°C por 60 min, es suficiente para la eliminación de MAP sin alterar el contenido de IgG.

1.2.3. - Dependencia de micobactina.

Una característica de MAP es la dependencia de micobactina para su crecimiento *in vitro* (Thorel *et al.*, 1990; Ramírez *et al.*, 2011). Dado que las micobacterias necesitan una fuente de hierro, éstas sintetizan la micobactina, un componente de

la membrana que actúa como sideróforo. El hierro es quelado por exoquelinas extracelulares y posteriormente intercambiado con las micobactinas, este hierro posteriormente se almacena dentro del organismo en forma de ferritina. La micobactina es sintetizada gracias a los genes *mbtA-J* de las micobacterias; sin embargo, en MAP el gen *mbtA* es más corto y la síntesis de esta proteína se realiza de forma incompleta (Chiodini *et al.*, 1984; Clarke, 1997; Valentin-Weigand & Goethe, 1999; Landero-Sánchez *et al.*, 2016). Cabe mencionar que Pfyffer (2015), señala que el crecimiento de las micobacterias es favorecido por el dióxido de carbono y por los ácidos grasos. Por lo anteriormente mencionado, el cultivo de MAP debe hacerse en medios apropiados para su crecimiento, mismos que deben estar enriquecidos con micobactina J, por ejemplo: Medio Herrold adicionado con yema de huevo, micobactina y piruvato (HEYMP) y el Medio Löwenstein-Jensen (LJ), adicionado también con micobactina (OIE, 2012).

1.2.4. - Ácido-alcohol resistencia.

Como se mencionó, MAP tiene una pared celular rica en ácidos micólicos, mismos que impiden que los colorantes de anilina penetren, por lo que las micobacterias no son visibles en la tinción Gram. Para poder observarlas son necesarios colorantes arilmetanos, como la fucsina fenicada, con el que una vez teñidas retienen el color y no se decoloran aún después de usar una mezcla de alcohol y ácido. (Dorransoro & Torroba, 2007; Pfyffer, 2015).

1.2.5. - Intermittencia en la eliminación bacteriana.

Además de que la enfermedad tiene un periodo de incubación muy variable, hay que tomar en cuenta que los animales portadores eliminan la bacteria de manera intermitente (Chávez-Gris, 2005; CFSPH, 2007; Martínez-Covarrubias, 2012). Mitchell *et al.* (2015), señalan que, en los estados terminales de la infección natural, los animales eliminan altas concentraciones de la bacteria. Por otro lado, Radostits *et al.* (2007), mencionan que los animales infectados pueden empezar a excretarla a través de las heces, de 15 a 18 meses antes de que empiecen a mostrar los signos clínicos.

1.2.6. - MAP y Enfermedad de Crohn.

Diversos autores mencionan a MAP como posible agente causal de la Enfermedad de Crohn (EC), la cual es una infección inflamatoria intestinal crónica, dolorosa y diarreica en los humanos, por lo que se asemeja a PTB (OIE, n.d.; Park *et al.*, 2015). Bull *et al.*, (2003) realizaron un estudio en el que se demostró por medio de cultivo bacteriológico, que la tasa de detección de MAP en pacientes con EC es significativamente alta, pues se logró aislar a la bacteria en 6 de 7 personas (86%), por lo cual, estos autores sugieren que este patógeno es causante de la enfermedad. Radostits *et al.*, (2007) mencionan que la infección puede adquirirse a través del contacto con el ganado, así como por la ingestión de carne y leche

contaminadas, sin embargo, Chiodini (2018) indica que la asociación entre MAP y EC es algo que aún no está bien sustentado.

1.3. - Epidemiología de la enfermedad.

La enfermedad tienen una distribución mundial (Clarke, 1997; Milián-Suazo *et al.*, 2015; Fecteau, 2018). Whitlock *et al.*, (2000) mencionan el “efecto iceberg” que presenta esta enfermedad, el cual indica que por cada animal que manifieste los signos clínicos de PTB dentro de un hato, hay de 15 a 20 que están infectados, pero menos de la mitad de éstos se detectan mediante cultivo bacteriológico a partir de heces.

1.3.1. - Situación epidemiológica en México.

En el país se han realizado diversos estudios para medir la prevalencia de PTB, no sólo en rumiantes domésticos, Hernández-Reyes (2018), determinó la presencia de MAP en ejemplares de ungulados silvestres: órix de cuernos de cimitarra (*Oryx dammah*), jirafa (*Giraffa camelopardalis*) y ñu azul (*Connochaetes taurinus*), utilizando ELISA P35 indirecto, PCR IS900, frotis y cultivo fecal.

En ganado lechero, la prevalencia de paratuberculosis es muy variable. Milián-Suazo *et al.*, (2015) señalan que el promedio de ésta en México es de 5% aunque

en un sistema familiar alcanza el 11.3%. La diferencia entre estos porcentajes podría deberse a que en un sistema intensivo hay mayor tasa de recambio animal que en un sistema familiar. Santillán *et al.* (2003), señalaron una prevalencia de 30.65% en el estado de Guanajuato, Limón *et al.* (2011), mencionan para el estado de Aguascalientes una prevalencia de 13.43% y Córdova *et al.* (2011), encontraron 31.3% de prevalencia en San Luis Potosí; sin embargo, para este mismo estado Sosa-Martínez *et al.* (2018), señalan una prevalencia promedio del 1.42% obtenida de mediciones realizadas en tres municipios. Un estudio realizado por Miranda-Bandera (2005) en la cuenca lechera de Tizayuca, Hidalgo, reveló prevalencias que van desde el 1.87% hasta el 24.07% por hato, con un promedio de 8.87% de PTB en la zona.

1.4. - Transmisión de la enfermedad.

La vía de transmisión más importante es la horizontal, por medio de la ruta fecal-oral, aunque también puede transmitirse a través del calostro y de la leche de vacas con infección clínica o subclínica (Rebhun *et al.*, 1995; CFSPH, 2007; Radostits *et al.*, 2007; Sweeney, 2011; Singh *et al.*, 2014; Milián-Suazo *et al.*, 2015; Fecteau, 2018). Los animales son más susceptibles a contraer la infección en una edad temprana (CFSPH, 2007); en especial si son menores de 30 días (Clarke, 1997). Chávez-Gris (2005), menciona que la causa de que haya mayor susceptibilidad de infección a edad temprana se debe a la contaminación de los pezones mamarios

con heces. Sweeney (2011) y Fecteau (2018) comentan que la resistencia a la infección de MAP incrementa con la edad; sin embargo, Fecteau *et al.*, (2010), mencionan que, aunque un animal tenga más de un año, puede infectarse si se encuentra en un sitio con alto nivel de contaminación.

También se habla de la transmisión vertical de la enfermedad, la cual ocurre de manera intrauterina. Whittington & Windsor (2009), realizaron una revisión bibliográfica de 1929 a 2006 relacionada con la transmisión intrauterina de MAP, adicionalmente Nielsen *et al.* (2016), realizan un estudio en donde concluyen que si una vaca resulta seropositiva 7 meses después del parto, la cría tiene mayor probabilidad de ser seropositiva .

1.5. -Tejido linfoide asociado al intestino.

Debido a que las principales lesiones ocasionadas por PTB son a nivel intestinal; y a que es el lugar principal donde inicia la respuesta inmune ocasionada por la bacteria, es importante describir la conformación celular del tejido linfoide asociado al intestino para comprender cómo se lleva a cabo la patogenia y la respuesta inmune desarrollada por el organismo.

El intestino posee diversos mecanismos de defensa ante la gran carga antigénica a la que se expone a diario, dentro de estos mecanismos se encuentran las enzimas pancreáticas, la microbiota intestinal, el epitelio intestinal *per se*; y el más importante, el tejido linfoide asociado al intestino (GALT por sus siglas en inglés:

Gut-Associated Lymphoid Tissue). El GALT se divide en dos: 1.- GALT organizado, inductor de la respuesta inmune, está conformado por las Placas de Peyer (PP) y linfonodos mesentéricos y 2.- GALT difuso, efector de la respuesta inmune, integrado por los linfocitos dispersos en el entramado epitelial (IEL por sus siglas en inglés: *intraepithelial lymphocytes* o en la lámina propia intestinal (LPL por sus siglas en inglés: *lamina propria lymphocytes*) (Figura 2) (Ramiro-Puig, 2008).

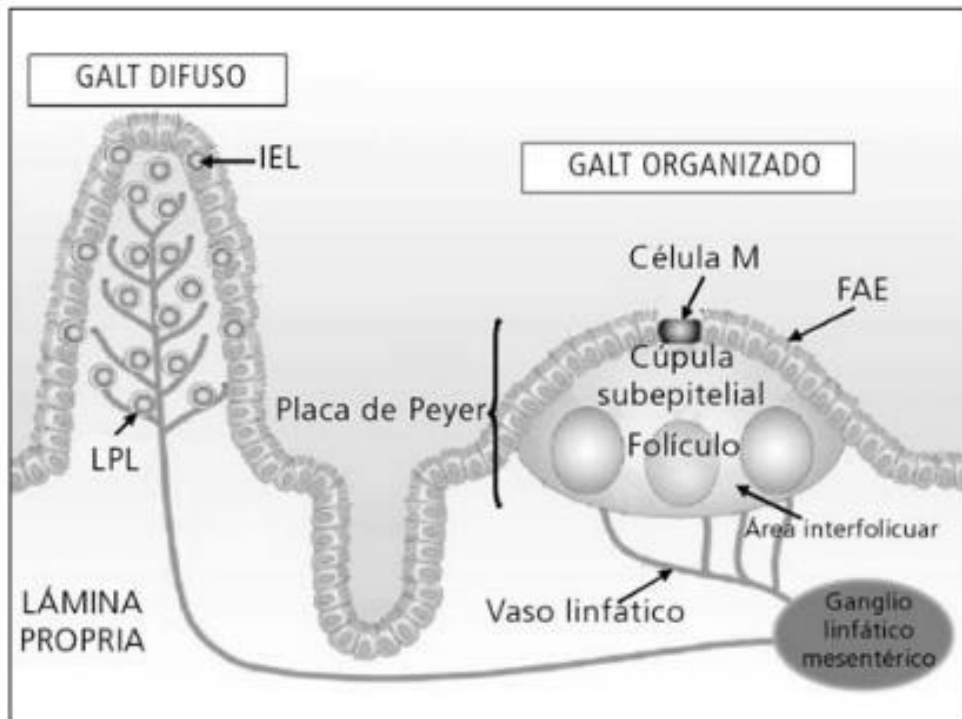


Figura 2. - Representación del GALT y sus dos componentes: el GALT organizado y el GALT difuso. Tomada de Ramiro-Puig, *et al.* (2008).

1.5.1. – Conformación del GALT organizado.

Placas de Peyer.

En los rumiantes las PP son consideradas como un órgano linfoide primario (Montaraz, 2010); debido a la forma de transmisión de la enfermedad, juegan un papel muy importante en la captación de la bacteria, de ahí la importancia de entender la anatomía y el funcionamiento de ellas. Las PP maduras están formadas por cúmulos linfoides (Linfocitos B [L_B], con algunos Linfocitos T [L_T]) que están situados en la cara anti mesentérica de la mucosa intestinal y únicamente tienen vasos linfáticos eferentes, estos folículos linfoides están separados del lumen intestinal por una capa de células denominada epitelio asociado al folículo (FAE por sus siglas en inglés: *follicle-associated epithelium*), este epitelio está compuesto por células M, células epiteliales columnares, IEL y células secretoras de moco. Las células M son enterocitos adaptados para la captación y translocación de los antígenos. Rodeando a los folículos se encuentra un área interfolicular conformada por L_T, principalmente de tipo cooperadores (L_{T_h}), células dendríticas (CD) maduras, macrófagos y vénulas para permitir la migración celular y circulación linfoide. Debajo del FAE, se encuentra un área denominada cúpula subepitelial que está formada por CD y macrófagos (Ramiro-Puig *et al*, 2008; Sánchez & Villa, 2016).

Linfonodos Mesentéricos.

Son considerados el cruce entre la circulación periférica y el mesenterio de los linfocitos. Estructuralmente se dividen en 3: corteza, con folículos primarios y secundarios, ricos en L_B y CD; paracorteza, con abundantes L_T y CD y la parte más interna que es la médula, con abundantes L_T , L_B y células plasmáticas (Figura 3) (Ramiro-Puig *et al*, 2008; Sánchez & Villa, 2016).

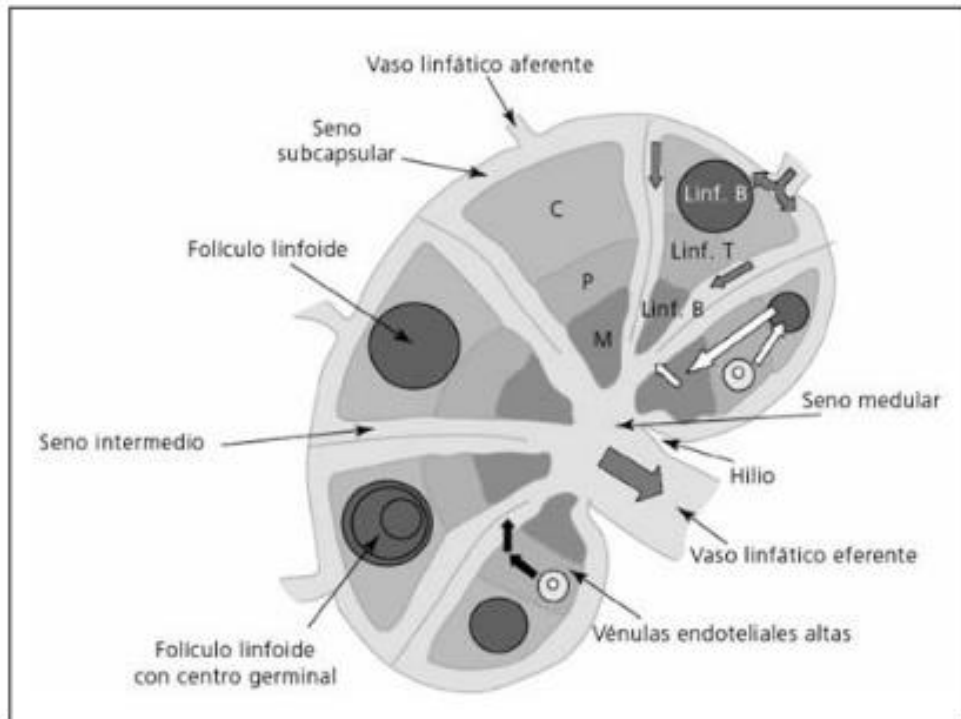


Figura 3. - Estructura de un linfonodo mesentérico. C: Corteza; P: Paracorteza; M: Médula. Tomada de Ramiro-Puig, et al. (2008).

1.5.2. – Conformación del GALT difuso.

Linfocitos dispersos en el entramado epitelial.

La población de los IEL es principalmente L_TCD3^+ que expresan el receptor $TCR\alpha\beta$, la mayoría de estos linfocitos son de tipo L_TCD8^+ , mismos que representan la fuente principal de $IFN-\gamma$ en la mucosa del intestino, también producen interleucina (IL) de tipo 2 (IL-2) (Ramiro-Puig, 2008; Sánchez & Villa, 2016).

Linfocitos dispersos en la lámina propia intestinal.

La lámina propia del intestino se encuentra infiltrada por L_T , L_B , macrófagos, CD, granulocitos y mastocitos; estas células están en un estado continuo de migración, diferenciación y renovación. Gracias a la gran cantidad de macrófagos, CD y L_T , los antígenos que atraviesen la lámina propia son presentados a los L_TCD4^+ infiltrantes (Ramiro-Puig, 2008; Sánchez & Villa, 2016).

1.6. - Patogenia y lesiones.

Cuando MAP ingresa al organismo y llega al intestino delgado es captado por las células M, de esta manera llega a la submucosa intestinal. Una vez ahí es fagocitado por los macrófagos; esta bacteria tiene la capacidad de sobrevivir dentro de ellos, ya que al parecer no permite la maduración y acidificación de la vacuola fagolisosomal, evitando así ser expuesta a enzimas lisosomales y radicales derivados de oxígeno que actúan como bactericidas. La presencia de MAP en el intestino, la submucosa y en los linfonodos mesentéricos conllevan a una respuesta inflamatoria: macrófagos y linfocitos son atraídos al área de infección, dando lugar a la formación de granulomas con células gigantes multinucleadas, células epitelioides, linfocitos y macrófagos (Clarke, 1997; Sweeney, 2011).

La respuesta inflamatoria granulomatosa altera la estructura y la función de la mucosa, especialmente en el intestino delgado y los linfonodos asociados, los cuales contienen macrófagos infectados con MAP, de esta manera el hospedero pueden vivir por mucho tiempo con el agente patógeno (Sweeney, 2011). Las bacterias pueden permanecer inactivas en los linfonodos mesentéricos durante meses o años, por lo que la manifestación de la enfermedad se da hasta la vida adulta. El estrés, mediante sus principales mediadores, catecolaminas y corticosteroides, ayuda a reactivar al patógeno en los nódulos linfáticos, ya que estos provocan una disminución en la respuesta inmune (Gómez-González & Escobar, 2006), lo que favorece a la replicación de MAP y su posterior eliminación en las heces, así como a la presentación de diarrea (Martínez-Herrera *et al.*, 2012).

A medida que la infección con MAP progresa, las lesiones en intestino y linfonodos se vuelven más severas, las lesiones focales o multifocales que causa el infiltrado granulomatoso se vuelve difuso; afectando yeyuno, íleon, ciego, así como también el colon en menor medida. La mucosa del intestino delgado; especialmente en el íleon, se engrosa por la infiltración celular masiva y las vellosidades se acortan. La linfadenitis granulomatosa conduce a la linfangiectasia (Sweeney, 2011). Estas lesiones son responsables de la disminución de la capacidad de absorción proteica y de la diarrea, lo que conduce al animal a utilizar sus reservas energéticas hasta provocar el desgaste muscular, además de la presencia de edema submandibular como consecuencia de la hipoproteïnemia (OIE, n.d.; Sweeney, 2011). El signo principal de PTB es la pérdida de peso progresiva con diarrea crónica o Intermitente; sin embargo, el animal sigue presentando un buen apetito y una temperatura corporal normal, lo que hace difícil su detección en la fase subclínica. Los signos se van agravando poco a poco, conduciendo a un estado de debilitamiento y, por último, la muerte (OIE, n.d.; Rebhun *et al.*, 1995; Andrews *et al.*, 2004; CFSPH, 2007; Ramírez *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2014).

Algunos autores mencionan 4 estados diferentes en PTB, que van de acuerdo con la severidad de los signos clínicos en cada animal (Whitlock & Buergelt, 1996; Radostits *et al.*, 2007; Ramírez *et al.*, 2011; Fecteau, 2018). Por su parte Singh *et al.* (2014) señalan únicamente las tres primeras fases de la enfermedad.

- Estado 1: Infección silenciosa. Aquí se encuentran los animales de hasta 2 años de edad que no presentan signología clínica, la infección es detectable en sus tejidos (intestino delgado y linfonodos), por cultivo bacteriológico o por histopatología.
- Estado 2: Enfermedad subclínica. Aún no hay signología de PTB; sin embargo, pueden tener niveles de anticuerpos contra MAP detectables, hay eliminación del patógeno en las heces y pueden ser detectados por cultivo
- Estado 3: Enfermedad clínica. Después de un periodo de incubación que puede abarcar desde 2 a 10 años se comienzan a presentar los signos clínicos de la enfermedad.
- Estado 4: Enfermedad clínica avanzada. Se incrementa la letargia en el animal, hay debilidad y emaciación. Se puede presentar edema submandibular; caquexia y diarrea que caracterizan a los estados terminales de PTB. La condición del animal se deteriora rápidamente.

Los mismos autores señalan que muchos animales son eliminados del hato antes de este estado debido a que bajan la producción láctea y tienen una severa pérdida de peso, en caso de que esto no suceda, la deshidratación y la caquexia conllevan a la muerte del animal.

1.7. – Respuesta inmune a la enfermedad.

Luego de que MAP ingresa al organismo, comienza una serie de eventos celulares que dan origen a la respuesta inmune adquirida frente a este microorganismo, esta

puede ser dividida en dos: respuesta inmune celular, principalmente mediada por citocinas producidas por linfocitos, y respuesta inmune humoral, caracterizada por la producción de anticuerpos específicos (Gutierrez-Pabello, 2010). Es importante mencionar que el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa es un evento coordinado, ya que la respuesta celular desencadena el desarrollo de la respuesta humoral (Esperanza-Gómez, del Mar-Blanco & Doménech, 2006).

Si bien, es difícil determinar el tiempo que se necesita para el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa en una infección natural por MAP, se ha podido establecer mediante infecciones experimentales, Waters *et al.* (2003), inocularon MAP en tonsilas de becerras, detectando IFN- γ como indicativo de respuesta inmune celular al día 105 post infección. Por otro lado Lepper *et al.*, (1989), infectaron becerros de manera oral, encontrando el IFN- γ a los 2 meses post infección. Con respecto a la respuesta inmune humoral, Waters *et al.* (2003), la encontraron al día 134 post infección, mientras que Lepper *et al.*, (1989), la detectaron entre 10 y 17 meses post infección, mediante ELISA.

Cuando las células M fagocitan e internalizan al MAP, la transportan por medio de vesículas a la membrana basolateral, donde son liberados al espacio extracelular, en dicha membrana se encuentra una invaginación conteniendo linfocitos y macrófagos, mismos que son encargados de procesar al antígeno para su posterior presentación. Las células M captan y transportan el antígeno hacia las CD, macrófagos y L_B, las cuales se consideran como células presentadoras de antígenos (APC) y están localizadas en la cúpula subepitelial de la PP (Ramiro-Puig, 2008). Las APC internalizan el antígeno y lo degradan hasta péptidos, los cuales se

unen con las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I (MHC-I) y tipo II (MHC-II) localizadas en su superficie (Silva-Campa *et al*, 2010); estas células interactúan con los L_T de las áreas interfoliculares, o bien, migran por los vasos linfáticos eferentes hacia los linfonodos mesentéricos (Ramiro-Puig, 2008).

Los L_T dan origen a 2 tipos de función efectora: de cooperación (L_TCD4^+) o citotóxica (L_TCD8^+). Los L_TCD8^+ se encargan de eliminar microorganismos intracelulares a través de la inmunidad celular citotóxica (CTL), por lo cual tienen un papel importante en una infección por MAP. Una vez que LA APC presenta el antígeno a través de su MHC-I al L_TCD8^+ , y este lo reconoce a través de su receptor TCR, comienza la CTL, con lo cual se da la producción de IFN- γ y se reorganiza el citoesqueleto y los gránulos citotóxicos del linfocito, dichos gránulos contienen granzimas (A, B y C), granulicina y perforinas, esta última sustancia se encarga de hacer poros en la superficie celular de la célula blanco, junto con la proteína C9 del complemento. Una vez que las granzimas se encuentran en el citoplasma de las células a destruir, inducen otros sustratos como las caspasas que provocan la muerte de la célula a través de la apoptosis; las granzimas A y C también son capaces de inducir la apoptosis de forma independiente a las caspasas, por otro lado, la granulicina además de inducir apoptosis por caspasas, actúa directamente sobre el microorganismo formando poros en su membrana, llevándolo a la muerte a través de la lisis (Rivas-Santiago & Peñuelas-Rivas, 2010). Los L_TCD4^+ reconocen los péptidos presentes en las MHC-II de las APC, a través de su receptor $TCR\alpha\beta CD3^+$, después comienza la producción de citocinas por ambas células; el L_TCD4^+ produce IFN- γ y Factor de Necrosis Tumoral tipo α (TNF- α) que ayudan en la

activación de las CD. Una vez que las CD están completamente activas, disminuye su capacidad fagocítica y producen citocinas como TNF- α e IL-12, además, expresan más MHC-II y moléculas de adhesión. La IL-12 favorece la diferenciación de linfocitos vírgenes a L-T_h 1, mismos que son productores de IFN- γ ; esta citocina ayuda a inhibir la diferenciación de L-T_h 2 y favorece que los linfocitos vírgenes sigan diferenciándose a L-T_h 1 (Silva-Campa, 2010).

Por otra parte, cuando el macrófago se activa y presenta el antígeno a los L T_h 1 comienza la producción de citocinas como IL-2, IFN- γ , IL-4 e IL-10, mismas que tienen acción autocrina, paracrina y endocrina, atrayendo de esta manera a otras células de respuesta inmune al sitio de infección. El IFN- γ induce la producción de moléculas del MHC, así como de receptores para esta misma citocina y para vitamina D, también induce la producción de óxido nítrico sintasa; estos elementos ayudan a aumentar la actividad microbicida del macrófago (Rivas-Santiago & Peñuelas-Rivas, 2010).

Los L_B tienen la característica de expresar en su membrana inmunoglobulina de isotipo M (IgM) o de isotipo D (IgD), mismas que conforman el receptor BCR. Los L_B se activan mediante la unión del antígeno con su anticuerpo de membrana, una vez activados presentan el antígeno a los L_T mediante las moléculas MHC-II. La unión de los L_T con los L_B provoca que se produzcan moléculas coestimuladoras, mismas que provocan que en el L_T se presente la molécula CD40 y en el L_B la molécula CD40L, la interacción entre estas dos moléculas actúa como señal para que los L_B proliferen, además de que aumenta la expresión de moléculas B7 y de receptores para citocinas en la membrana de los L_B. El aumento de la molécula B7

estimula a los L-T_h a producir las citocinas IL-2, IL-4 e IL-5, mismas que son reconocidas en los receptores expresados en los L_B. El principal efecto de estas citocinas es la diferenciación de L_B en células plasmáticas, el cambio de isotipo de anticuerpo y la maduración de la afinidad del anticuerpo por su antígeno. Al momento de comenzar la proliferación de los L_B se van produciendo células con un aumento en la afinidad por el antígeno, lo cual da como resultado L_B con diferentes grados de afinidad. Debido a que el antígeno disminuye mientras se generan los anticuerpos, sólo los linfocitos que presenten mayor afinidad por su antígeno van a poder sobrevivir, el resto se elimina por apoptosis. De esta forma, en una respuesta secundaria, se forman anticuerpos con mayor afinidad hacia el antígeno que una respuesta primaria. Los L_B con mayor afinidad hacia el antígeno experimentan un cambio en el isotipo de anticuerpo, este cambio también es originado por la interacción entre las moléculas CD40 y CD40L, junto con la señalización de citocinas específicas, las cuales son las que dirigen el cambio de isotipo. El IFN- γ producido por los L-T_h1 lo que favorece el cambio hacia IgG. Finalmente, los L_B se diferencian en dos poblaciones: células plasmáticas y células de memoria. Las células plasmáticas carecen de anticuerpos de membrana, pero son capaces de secretar gran cantidad de anticuerpos específicos, estas células sobreviven pocos días y luego mueren por apoptosis. Las células de memoria no secretan anticuerpos, pero presentan anticuerpos de membrana (IgG) con afinidad muy alta por el antígeno, estas células tienen una vida muy larga en el organismo y son activadas en exposiciones secundarias con el antígeno, de manera que producen una respuesta rápida, con mayor producción de anticuerpo el cual tienen mayor afinidad (Mosqueda-Gualito, 2010; Prieto Martín *et al.*, 2013).

1.8. - Medidas de control.

Distintos autores (OIE, n.d.; Rebhun *et al.*, 1995; CFSPH, 2007; Singh *et al.*, 2014; Fecteau, 2018) señalan que en los hatos infectados lo más importante es el control del estiércol debido a que la mayor fuente de infección son las micobacterias eliminadas por las heces. También recomiendan elevar los comederos y bebederos para evitar su contaminación. Las zonas de parto deben estar lo más limpias posibles, las crías después del parto deben separarse inmediatamente de su madre, así como administrarles calostro y leche libres de MAP de manera artificial, deben estar separadas de los adultos por lo menos el primer año de vida para disminuir el riesgo de infección. Si es posible, los animales infectados deben estar separados de los animales no infectados, y desecharse mientras sea económicamente posible; los que ya tengan signos de la enfermedad y sean eliminadores de MAP, deben descartarse lo más pronto posible; debiéndose considerarse a las crías de madres portadoras.

Fecteau (2018), recomienda adquirir reemplazos libres de MAP, aunque por el largo periodo de incubación de la bacteria la cuarentena puede ser insuficiente. CFSPH (2007) y Radostits *et al.* (2007), mencionan que debido a la transmisión cruzada que se tiene entre las cepas S y C, la cual no es frecuente, pero puede presentarse, no solamente se debe tenerse cuidado del ganado bovino, sino también del ovino. Chávez-Gris (2005) sugiere tres puntos importantes para un programa de prevención y control de la enfermedad, mismos que ayudan a resumir lo descrito anteriormente:

- Disponer de pruebas diagnósticas que ayuden a establecer la situación sanitaria del rebaño
- Prevenir la diseminación de la infección en el rebaño infectado
- Evitar la introducción de animales infectados a rebaños libres de la enfermedad

1.9. - Métodos de diagnóstico.

Para diagnosticar PTB se utiliza la anatomopatología, así como pruebas de laboratorio que incluyen: frotis y cultivo bacteriológicos de heces y tejidos, prueba de detección de interferón gamma (IFN- γ), prueba de intradermorreacción, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), fijación del complemento (FC), ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) e inmunodifusión en gel de agar (IDGA) (OIE, 2012), dichas pruebas se dividen en dos de acuerdo a los autores Tripathi *et al.*, (2006) y Fecteau, (2018):

- Pruebas de diagnóstico directo; por medio de la detección del bacilo o su ADN.
- Pruebas de diagnóstico indirecto; mediante la detección de la respuesta inmune, tanto humoral como celular, del animal.

1.9.1. – Anatomopatología.

1.9.1.1. - Necropsia.

Empleando la necropsia se pueden observar los cambios macroscópicos presentes en los tejidos afectados, tales como el engrosamiento de la mucosa intestinal, principalmente en íleon y válvula ileocecal, los vasos linfáticos en la subserosa se observan prominentes y dilatados, además los linfonodos mesentéricos se observan aumentados de tamaño, edematosos y en algunas ocasiones fusionados (Clarke, 1997).

1.9.1.2. - Histología.

A través de cortes histológicos de intestino y/o linfonodos mesentéricos, se pueden observar granulomas, mismos que pueden contener BAAR, estos pueden observarse a través de la tinción de los tejidos con la técnica Ziehl-Neelsen (ZN) (Clarke, 1997).

1.9.2. – Pruebas de diagnóstico directo.

Se realizan frotis a partir de heces y de tejidos, así como cultivo bacteriológico. Para la detección del ADN del bacilo se realiza PCR a partir de heces, leche, tejidos o leucocitos obtenidos de sangre completa.

1.9.2.1. - Frotis.

El frotis puede realizarse con materia fecal o tejidos como intestino y/o linfonodos, los cuales se tiñen de acuerdo al método ZN. Bajo microscopio se busca la presencia de bacilos agregados (OIE, 2012).

1.9.2.2. - Cultivo bacteriológico.

Se considera la prueba de diagnóstico por excelencia, tiene un 100% de especificidad. Detecta a la mayoría de los animales con la enfermedad avanzada, pero a muy pocos con infección temprana. Las muestras deben descontaminarse para evitar que otras bacterias consuman los nutrientes presentes en los medios, inhibiendo de esta manera el crecimiento de MAP. Se utilizan medios de cultivo especiales, adicionados con micobactina J, por ejemplo: los medios Löwenstein-Jensen (LJ) y Herrold yema de huevo (HEYM). Al ser una bacteria de lento

crecimiento en cultivo bacteriológico, la realización de esta prueba requiere de, al menos, 8 a 16 semanas de tiempo de espera (Alinovi *et al.*, 2009; OIE, 2012).

1.9.2.3. - Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) IS900.

La PCR se realiza para amplificar la secuencia de inserción (IS) 900 la cual es específica para MAP (Green *et al.* 1989). De esta inserción la bacteria presenta de 14 a 18 copias en su ADN (Bull *et al.*, 2000). Esta técnica puede realizarse con leucocitos obtenidos a partir de sangre completa, leche, heces y tejidos, pero depende en gran medida de la calidad de ADN obtenido después del procesamiento de la muestra (OIE, 2012).

1.9.3. –Pruebas de diagnóstico indirecto.

Se realiza usando la prueba de IFN- γ para la medición esta citocina, misma que también promueve la inflamación, por lo que también puede hacerse la prueba de intradermorreacción. Además de hacer la detección de estas respuestas, la inmunidad humoral se detecta utilizando ELISA, FC e IDGA, no existe ningún suero de referencia para realizar dichas pruebas (OIE, 2012). Es importante volver a mencionar que se requiere de tiempo para desarrollar la respuesta inmune, tanto celular como humoral, a la infección.

1.9.3.1. - Intradermorreacción.

Esta prueba *in vivo* se basa en la hipersensibilidad retardada, dada por citocinas proinflamatorias como IL-2, IL-3, IFN- γ y FNT- α , mismas que son liberadas por los linfocitos previamente estimulados con el microorganismo de campo al entrar en contacto con un antígeno semejante, se denomina como retardada debido a que se presenta de 48 a 72 h después (Bezos-Garrido, J., *et al.*, n. d.). Esta prueba se realiza en el tercio medio del cuello, tiene una sensibilidad del 72 - 78% y una especificidad del 92 - 99%, en México esta prueba no es utilizada (Jiménez L, Morales K & Riveros A, n.d.; Cicuta, *et al* 2003; OIE, 2012).

1.9.3.2. - Interferón gamma (IFN- γ).

Esta prueba *in vitro* está basada en la liberación de esta citocina a partir de linfocitos estimulados con un derivado proteico purificado (PPD) derivado del MAP, también llamado "johnina". Consta de 2 fases: en la primera, la sangre es extraída del animal y remitida al laboratorio, en donde la estimulan con el PPD y es incubada por un periodo de 18-36 h, en la segunda fase la sangre es centrifugada y se obtiene el plasma, al cual se le realiza un ELISA tipo *sándwich* para cuantificar el IFN- γ . Si el animal sospechoso tuvo contacto previo con MAP, los linfocitos van a liberar la

citocina. La especificidad mencionada para esta prueba es de 67% al 94%, mientras que la sensibilidad de del 13% al 85% (Bezós-Garrido, J., *et al.*, n. d.; Jiménez, Morales & Riveros, n. d.; OIE, 2012).

1.9.3.3. - Fijación de complemento (FC).

La prueba de FC para la detección de PTB es solicitada en algunos países para la importación de ganado (OIE, 2012), está basada en la activación del complemento por la vía clásica, dada por las inmunoglobulinas IgM e IgG (FMVZ, 2005; Tizard, 2009a, 2009b). El complemento sérico se utiliza por completo ante la presencia de un antígeno en unión con su anticuerpo; para corroborar esta reacción se utilizan glóbulos rojos de oveja sensibilizados con un anticuerpo anti-glóbulo rojo de oveja, que en presencia del complemento se hemolizarán (Guzmán-Urrego, 1999). Esta prueba presenta una sensibilidad del 38% y una especificidad del 99% (National Research Council (U.S.). Committee on Diagnosis and Control of Johne's Disease., 2003).

1.9.3.4. - Inmunodifusión en gel de agar (IDGA).

La IDGA se basa en la reacción antígeno-anticuerpo dada por la inmunoglobulina IgG (FMVZ, 2005; Tizard, 2009b), se utiliza un antígeno de *M. avium* 18 el cual se

añade en el pozo central del gel de agarosa, los sueros control y los sueros problema se añaden en los pozos de la periferia. Luego de 48 horas se revisa el gel en busca de líneas de precipitación de los sueros problema que sean iguales a la línea que presenta el control positivo. Para esta prueba se menciona una sensibilidad del 38 – 56% y una especificidad del 99-100%(OIE, 2012).

1.9.3.5. - Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA).

Para la técnica ELISA se utilizan anticuerpos marcados con una enzima de tal manera que al utilizar el sustrato de esta enzima se detecta la presencia de los anticuerpos; la técnica directa de esta prueba se utiliza para detectar al antígeno y la indirecta puede detectar a los anticuerpos, los cuales pueden ser IgM o IgG. La reacción de esta prueba se lee de manera fotolorimétrica para determinar su densidad óptica (DO), misma con la que se establece la positividad o negatividad de la prueba (Guzmán-Urrego, 1999). Se puede realizar en leche o en suero sanguíneo, sin embargo (Sevilla-Agirregomoskorta, 2007) reporta haber realizado esta prueba en plasma, usando ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como anticoagulante. Existen en el mercado varios estuches comerciales disponibles para realizar ELISA. Castrellón-Ahumada (2012), desarrolló un ELISA utilizando la proteína 35 kDa o proteína P35 recombinante, cuya sensibilidad y especificidad son 100% y 92%, respectivamente, comparada con el aislamiento bacteriológico realizado a partir de heces de ovinos.

Singh *et al.* (2014), recomiendan analizar los resultados de las pruebas de diagnóstico por separado, ya que cada uno de ellos tiene diferente sensibilidad y especificidad. Britton *et al.* (2016) hace una revisión de estudio en la que menciona diferentes sensibilidades y especificidades para la prueba de ELISA y de cultivo bacteriológico, dependiendo del estado del animal; por ejemplo, en animales con signos clínicos, ELISA presenta una sensibilidad del 50 – 87 %, 24 – 94 % para animales sin signos clínicos eliminadores de MAP y del 7 – 22 % para animales sin signos clínicos; así mismo menciona una especificidad del 40 – 100 % sin importar el estado de salud del animal. Para cultivo bacteriológico menciona una sensibilidad de 70 % para animales con signos clínicos y una especificidad de 23 – 29 % para animales subclínicos. Por otro lado, Fecteau (2018), menciona para ELISA una sensibilidad de 15 % para animales subclínicos, misma que aumenta a 90 % para animales con signos clínicos de la enfermedad; también menciona una especificidad de 98 – 100 % sin importar el estado de salud, para cultivo bacteriológico menciona una sensibilidad de 60 % y una especificidad de 99%, sin importar el estado de salud del animal.

1.10. - Importancia económica en el hato lechero.

Ott, Wells & Wagner, (1999) señalan que en establos de al menos 30 vacas con más del 10% de prevalencia de PTB, la pérdida de producción es de 748 Kg de

leche. Radostits *et al.* (2007), Milián-Suazo *et al.* (2015) y Park *et al.* (2015) señalan que las razones de tan importante pérdida económica son las siguientes:

- Disminución en la producción láctea.
- Disminución de la grasa y proteínas en la leche.
- Aumento en el intervalo entre partos.
- Bajo peso al sacrificio.
- Desecho prematuro.
- Infertilidad.
- Incremento en los casos de mastitis.
- Disminución de la eficiencia alimentaria.
- Muerte del animal.

Miranda-Bandera (2005), indica en su estudio que las pérdidas económicas debidas a la PTB son muy variables, dependiendo del rubro al que más se invierta. Los puntos que ella toma en cuenta para realizar el análisis del impacto económico son:

- Desecho prematuro.
- Disminución de la producción láctea.
- Falla reproductiva.
- Tratamiento médico.

Señala que la pérdida económica más baja fue de \$5,179.78/vaca/año en un establo con 1.82% de prevalencia, mientras que la pérdida económica más alta fue de \$28,031.98 en un establo con prevalencia del 5.45%, donde su mayor costo fue el rubro "Falla reproductiva". La pérdida económica en promedio de Tizayuca es de

\$10,345.38/vaca/año. La autora menciona que el rubro en donde se presenta mayor pérdida es “Disminución de producción láctea”, ya que su estudio mostró que las vacas seropositivas dieron, en promedio, 22.8% menos leche que las vacas seronegativas.

2. – Justificación.

Como parte del Programa de Medicina Preventiva realizado en el hato bovino lechero del Centro de Enseñanza, Investigación, Extensión y Producción Animal en Altiplano (CEIEPAA) es necesario estar inscrito en las Campañas Oficiales Mexicanas que marca la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER), en las que se encuentra la Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales y la Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*) en la cuales el Centro se encuentra como Hato Libre. Sin embargo, en el CEIEPAA se desconoce la seroprevalencia de PTB y de otras enfermedades. La detección de PTB en el CEIEPAA es importante, ya que si se confirma la presencia de la enfermedad en el hato lechero ésta representaría una causa de pérdidas económicas para el Centro, debido a la disminución en la fertilidad y en la producción lechera; además, a partir de los resultados se podrían establecer medidas para el control y, si es posible, la erradicación de la enfermedad en el lugar. Las medidas que se tomen para el control de la enfermedad en el Centro, así como los resultados que se obtengan a partir de ellas, podrían servir como modelo para

llevarse a cabo en otras producciones de bovinos lecheros. Es importante mencionar que en el CEIEPAA existen otros rumiantes domésticos tales como ovinos, caprinos y bovinos productores de carne, así como ciervo rojo, en los cuales se ha presentado clínicamente la enfermedad, además de que hay evidencia serológica, histológica y aislamientos de MAP en estos animales (López-Yurame, 2011, 2014); por lo que se sugiere la infección entre rebaños.

3. - Objetivo general.

Conocer la seroprevalencia de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* y el porcentaje de animales eliminadores de BAAR en heces, en el módulo de bovinos productores de leche del CEIEPAA.

3.1. - Objetivos específicos.

Realizar la prueba de ELISA P35 indirecto a partir de muestras de plasma sanguíneo de los bovinos lecheros del CEIEPAA, para determinar la seroprevalencia a MAP.

Realizar frotis a partir de heces obtenidas de los bovinos lecheros del CEIEPAA, y teñirlos de acuerdo al método ZN para detectar la presencia de BAAR.

Realizar PCR IS900, para confirmar la presencia de MAP en heces con presencia de BAAR.

Realizar estadística descriptiva para obtener el porcentaje de seroprevalencia de MAP, y el porcentaje de eliminación de micobacterias en heces, entre bovinos pertenecientes a diferente rango de edad, etapa productiva y raza.

Determinar diferencias estadísticas de la respuesta serológica mediante ELISA P35 indirecto, entre bovinos pertenecientes a diferente rango de edad, etapa productiva y raza.

Realizar propuestas para el control de la enfermedad en el hato de los bovinos lecheros del CEIEPAA, con base en los resultados obtenidos en este estudio y en los manejos realizados en el Centro.

4. - Hipótesis.

El hato de bovinos lecheros del CEIEPAA presentará anticuerpos contra *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* en el plasma sanguíneo, esperando encontrarlos en vacas ≥ 24 meses de edad; así mismo, el hato también presentará BAAR en muestras fecales de vacas a partir de la misma edad. La raza de los bovinos no tendrá influencia en los resultados.

5. - Material y métodos.

El presente estudio se realizó en el Módulo de Bovinos Lecheros del CEIEPAA – Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM); ubicado en la carretera Tequisquiapan – Ezequiel Montes, Km 8.5, Municipio de Tequisquiapan, Querétaro. Se obtuvieron muestras de sangre y de heces de los 170 animales que conforman el hato de bovinos lecheros del Centro, el protocolo elaborado para la obtención de muestras fue enviado al Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales (CICUA) de la FMVZ para su evaluación, siendo el protocolo #597 fue revisado y aprobado sin dudas ni recomendaciones el 18 de octubre del 2018. Los resultados de las pruebas realizadas se agruparon de 3 maneras: por edades, por etapa productiva y por raza,

esto con el fin de evaluar cuál de ellos presenta mayor porcentaje de seropositividad contra MAP.

La clasificación "Edad" está integrada por los siguientes estratos: 38 becerras de ≤ 12 meses, 13 vaquillas de 13 a 24 meses, 29 vacas de 25 a 36 meses, 16 vacas de 37 a 48, 16 vacas de 49 a 60 meses, 15 vacas de 61 a 72 meses, 18 vacas de 73 a 84 meses, 8 vacas de 85 a 96 meses, 7 vacas de 97 a 108 meses, 5 vacas de 109 a 120 meses y 5 vacas de ≥ 121 meses. La clasificación "Etapa productiva" está integrada por los siguientes estratos: 100 vacas productoras, 26 vacas secas y vaquillas, 23 novillas y 21 becerras. La clasificación "Raza" está conformada por los siguientes estratos: 76 bovinos Holstein-Friesian (HF), 38 bovinos Jersey (JY) y 56 bovinos cruza HF x JY (CZA).

5.1. – Marco experimental.

Las muestras se identificaron utilizando el arete de identificación interno de cada animal y se colocaron en hieleras con refrigerantes hasta ser transportadas al Laboratorio de Microbiología Molecular (LMM) de la Unidad de Servicios de Diagnóstico y Constatación (USEDICO), ubicada en las instalaciones del CEIEPAA.

5.1.1. – Toma de muestra sanguínea para la obtención de plasma.

Se tomó la muestra de sangre completa usando la vena coccígea, utilizando tubos con EDTA y agujas calibre 20G con sistema cerrado al vacío Vacutainer®. Los tubos fueron llenados a tres cuartas partes de su capacidad.

5.1.2. – Obtención de heces para realizar frotis fecal, cultivo bacteriano y PCR IS900.

Se utilizaron bolsas de plástico de manera individual para cada animal, se realizó el muestreo mediante toma directa obteniendo al menos 10 g de heces por animal.

5.2. - Procesamiento de muestras en el laboratorio.

5.2.1. -Obtención de plasma sanguíneo para realizar ELISA P35 indirecto.

En el LMM las muestras obtenidas fueron colocadas en refrigeración a 4°C hasta su procesamiento; se realizó la prueba de ELISA P35 indirecto en plasma

sanguíneo. Las muestras de sangre se centrifugaron en una centrífuga refrigerada marca Eppendorf® modelo 5810 R, a 4,000 rpm durante 5 minutos para separar las fases de los componentes sanguíneos; el plasma se separó en 3 viales: 2 alícuotas de 100 μ L cada una y otra de 1.5 μ L (Figura 4). Un vial conteniendo 100 μ L se mantuvo en refrigeración hasta su procesamiento en la prueba de ELISA, los 2 viales restantes se mantienen en ultracongelación a -70°C, como resguardo. Con el vial de plasma en refrigeración se realizó la prueba ELISA P35 indirecto, de acuerdo al método de Castrellón-Ahumada (2012), para detectar anticuerpos contra la proteína recombinante P35 presente en MAP. (Anexo I). Se midió la Densidad Óptica (DO) con un espectrofotómetro marca BioTek® modelo ELx800 y utilizando el programa Gen5 2.00 con una longitud de onda de 405 nm, donde el punto de corte para considerar una muestra positiva es a partir de 0.639 DO.

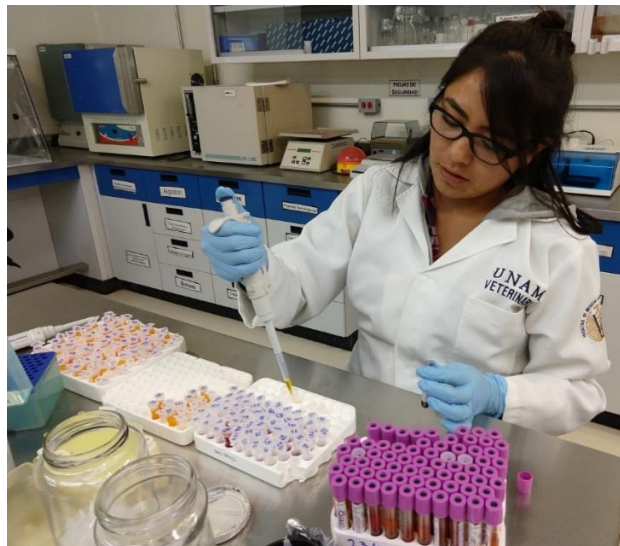


Figura 4. - Elaboración de alícuotas de plasma sanguíneo para realizar ELISA P35 indirecto.

5.2.2. - Procesamiento de las muestras fecales.

Descontaminación de las muestras.

Las muestras fueron puestas a descontaminar con hexadecilpiridinium (HPC) al 0.75%, de acuerdo al método de Whipple, Callihan & Jarnagin, (1991), (Anexo II).

Frotis fecal.

Se realizaron frotis fecales conforme al protocolo establecido en el LMM de USEDICO (Figura 5; Anexo III), posteriormente se les realizó tinción de ZN de acuerdo al método descrito en el Manual de Diagnóstico de Micobacterias de importancia en Medicina Veterinaria (2005) con modificaciones hechas en USEDICO (Anexo IV), en cada grupo de portaobjetos listos para tinción se contaba con un control positivo, a partir de heces positivas de cabra, para verificar que la tinción se haya realizado de manera correcta. Después de realizar la tinción se observaron los portaobjetos en el microscopio óptico con un aumento de 40x en busca de BAAR, al encontrar un sospechoso se cambiaba al aumento de 100x con aceite de inmersión para confirmar o descartar la presencia de los bacilos.



Figura 5. - Elaboración de frotis fecales utilizando una gota de la interfase de la muestra.

Cultivo bacteriano.

Se realizó el cultivo bacteriano utilizando 2 tubos conteniendo medio enriquecido con micobactina J y 1 tubo conteniendo medio sin micobactina J, de cada uno de los medios (Anexo V).

PCR IS900 a muestras fecales con presencia de BAAR.

El método de extracción para ADN genómico de MAP en muestras de heces se realizó con base en el protocolo de extracción mediante choque térmico descrito por Garrido *et al.* (2000). Una vez realizada la lisis, se purificó el ADN empleando el estuche comercial *QIAmp® Fast DNA stool Mini Kit* de la marca Qiagen®.

Posteriormente, se realizó la PCR IS900 con el fin de confirmar la presencia de MAP en las heces que resultaron positivas a frotis fecal teñido con ZN, empleándose los iniciadores P3N (3´ - GGG TGT GGC GTT TTC CTT CG-5´) P5N (5´ - ATT TCG CCG CCA CCG CCA CG-3´) (ANEXO VI)

6. – Resultados.

En la prueba de ELISA P35 indirecto 92 de 170 muestras resultaron positivas, las cuales representan el 54.1% de seropositividad a MAP, mientras que en 3 de las 170 muestras de heces se encontró la presencia de BAAR por medio de frotis de heces teñidas con ZN; estas confirman que el 1.8% de los animales del hato de bovinos lecheros del Centro se encontraban eliminando micobacterias, posteriormente, la PCR IS900 confirmó que los BAAR presentes en heces corresponden a MAP.

A continuación, se describen los resultados descriptivos obtenidos en este estudio conforme a las clasificaciones “Etapa productiva”, “Edad” y “Raza” de los animales, seguido del resultado de la PCR IS900. Posteriormente se describe la comparación estadística de los resultados de ELISA P35 indirecto, en el mismo orden que los resultados descriptivos. Finalmente se mencionan las propuestas para el control de la PTB en el Módulo de Bovinos Lecheros del Centro.

6.1. - Resultados descriptivos de ELISA P35 indirecto y frotis fecal, para la clasificación “Etapa productiva”.

Con la prueba de ELISA P35 indirecto se encontró que el grupo “Productoras” cuenta con un total de 75 vacas seropositivas de las 100 que lo conforman, estas vacas representan el 75% del mismo; en el grupo “secas y vaquillas” resultaron 17 vacas positivas de las 26 que lo conforman, mismas que corresponden al 65.4%. Los grupos “Becerras” y “Novillas” resultaron negativos (Cuadro 1; Gráfico 1).

Por otro lado, el grupo “Novillas” presentó un animal con presencia de BAAR en heces de las 23 que conforman el grupo, esto le confiere un 4.3% de eliminación de micobacterias; el grupo “Productoras” mostró 2 animales con presencia de BAAR en heces de las 100 vacas del grupo, confiriéndole un 2.0% de positividad a frotis fecal (Cuadro 1; Gráfico 1).

Etapa productiva	Porcentaje de seropositividad a ELISA P35 %; (+/n)	Porcentaje de eliminación de micobacterias en heces %; (+/n)
Becerras	0.0; (0/21)	0.0; (0/21)
Novillas	0.0; (0/23)	4.3; (1/23)
Productoras	75; (75/100)	2.0; (2/100)
Secas y vaquillas	65.4; (17/26)	0.0; (0/26)

Cuadro 1. - Resultados de serología y frotis fecal por “Etapa productiva”. Se muestra el porcentaje y entre paréntesis, el número de animales positivos del total de animales en cada estrato.

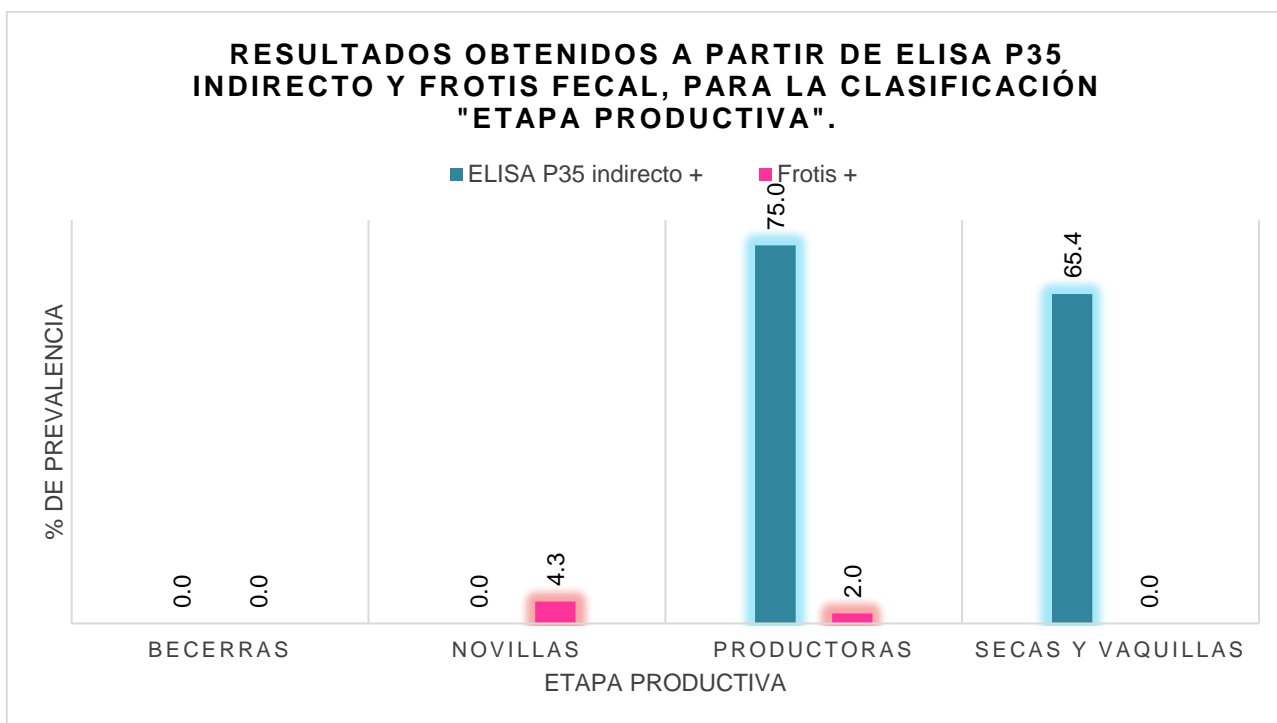
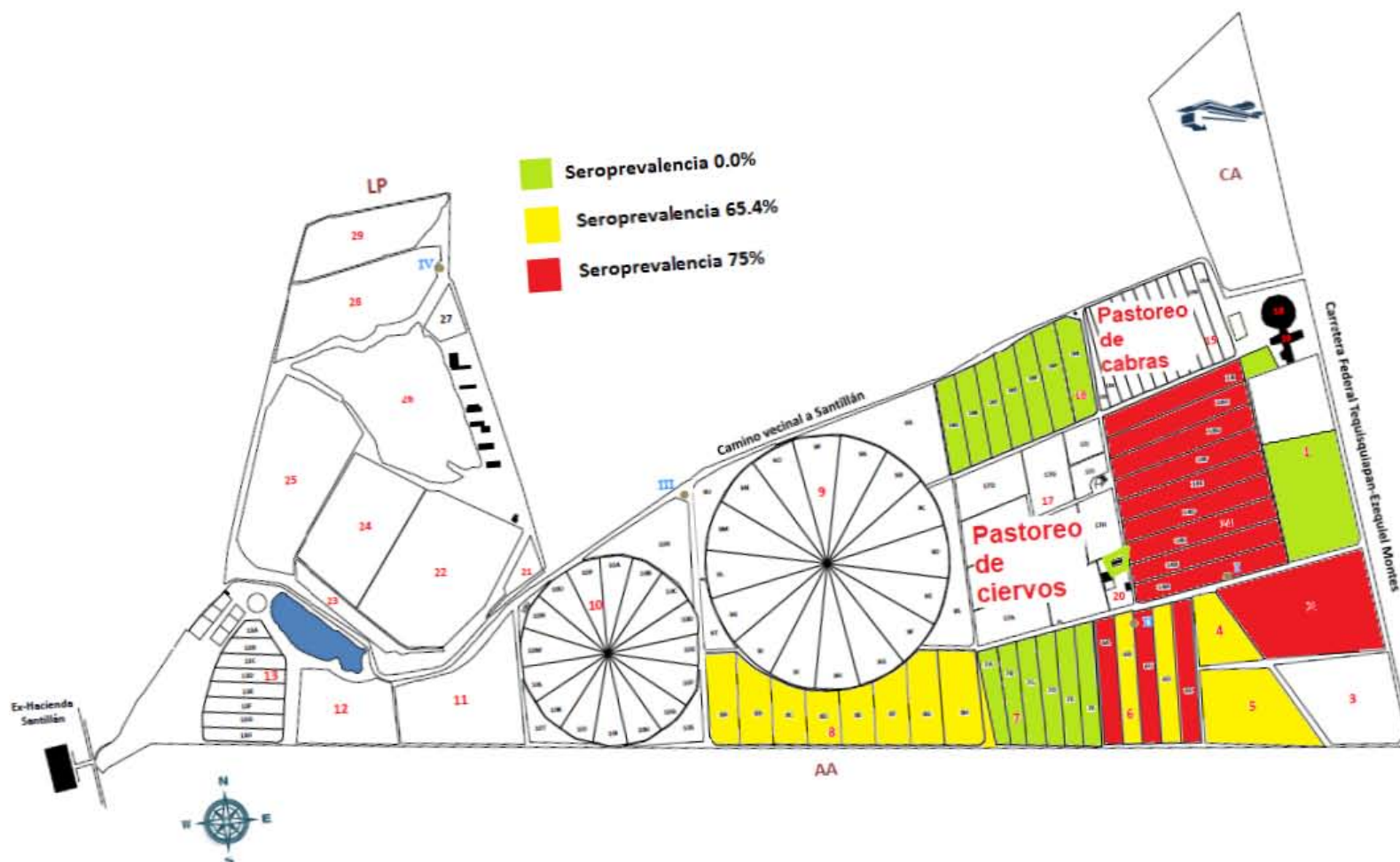


Gráfico 1. - Representación gráfica de los resultados de serología y frotis fecal para la clasificación “Etapa productiva”.

En el Plano 2, se muestra con colores la seropositividad que hay en cada una de las praderas, con base en los resultados de ELISA P35 indirecto, por etapa productiva: Productoras: 75%; Secas y vaquillas: 64.1%; Novillas y becerras: 0% (acotaciones en Anexo V).



Plano 2. - Se muestra por colores de semáforo la seropositividad a MAP en el área de pastoreo del módulo de Bovinos de Leche, detectada mediante el uso de ELISA P35 indirecto.

6.2. – Resultados descriptivos de ELISA P35 indirecto y frotis fecal, para la clasificación “Edades”.

Con base en los resultados obtenidos en el ELISA P35 indirecto, se observó que, por edades, las vacas que visiblemente cuentan con un porcentaje más alto de seropositividad son del grupo “37 a 48 meses”, con un total de 14 vacas seropositivas de 16 animales que conforman el grupo, mismas que representan el 87.5%; por el contrario, el grupo “ \leq 12 meses” tienen la menor seropositividad del hato, al resultar negativas (Cuadro 2; Gráfico 2).

Por otro lado, el grupo de vacas con mayor porcentaje de frotis positivos son las del grupo “25 a 36 meses”, con un total de 2 vacas eliminadoras de micobacterias del total de 27 animales, las cuales representan el 6.9% de su grupo; luego, se encuentra el grupo “ \leq 12 meses” que cuentan con 1 becerro positivo de las 38 que conforman el mismo, esto les confiere el 2.6% de eliminación micobacteriana en heces (Cuadro 2; Gráfico 2).

Edad (meses)	Porcentaje de seropositividad a ELISA P35 %; (+/n)	Porcentaje de eliminación de micobacterias en heces %; (+/n)
≤12	0.0; (0/38)	2.6; (1/38)
13 a 24	38.5; (5/13)	0.0; (0/13)
25 a 36	79.3; (23/29)	6.9; (2/29)
37 a 48	87.5; (14/16)	0.0; (0/16)
49 a 60	81.3; (13/16)	0.0; (0/16)
61 a 72	86.7; (13/15)	0.0; (0/16)
73 a 84	66.7; (12/18)	0.0; (0/18)
85 a 96	50.0; (4/8)	0.0; (0/8)
97 a 108	42.9; (3/7)	0.0; (0/7)
109 a 120	60.0; (3/5)	0.0; (0/5)
>120	40.0; (2/5)	0.0; (0/5)

Cuadro 2. - Resultados de serología y frotis fecal por “Edad”. Se muestra el porcentaje y, entre paréntesis, el número de animales positivos del total de animales en cada estrato.

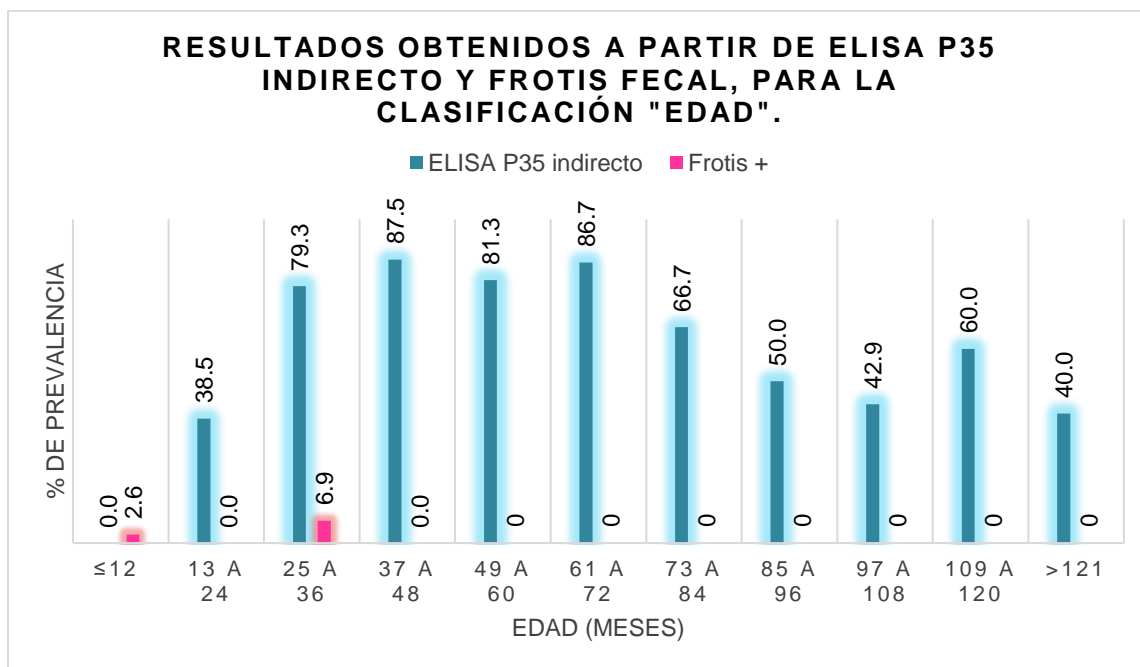


Gráfico 2. – Representación gráfica de los resultados de serología y frotis fecal para la clasificación “Edad”.

6.3. - Resultados descriptivos de ELISA P35 indirecto y frotis fecal, para la clasificación “Razas”.

Con base en los resultado de la prueba de ELISA P35 indirecto, se pudo observar que en el grupo “HF”, 49 vacas de las 76 en el hato resultaron seropositivas, lo cual les confiere el 53.3% de seropositividad; en el grupo “JY”, 23 de 38 animales fueron seropositivos, por lo que obtuvieron el 25%; en el grupo “CZA” 20 de 56 animales fueron positivos a ELISA, por lo que mostraron un 21.7% de serología positiva a MAP (Cuadro 3; Gráfico 3).

En los resultados obtenidos en los frotis fecales teñidos con ZN se observó que en el hato de bovinos lecheros es visiblemente mínima la eliminación de micobacterias (Figura 6). Todas de las muestras con presencia de BAAR provienen del grupo “HF”, donde 3 de las 76 que conforman el grupo son positivas, lo cual les confiere el 3.9% de positividad (Cuadro 3; Gráfico 3).

Raza	Porcentaje de seropositividad a ELISA P35 %; (+/n)	Porcentaje de eliminación de micobacterias en heces %; (+/n)
HF	53.3; (49/76)	3.9; (3/76)
JY	25.0; (23/38)	0.0; (0/38)
CZA	21.7; (20/56)	0.0; (0/56)

Cuadro 3. - Resultados de serología y frotis fecal por "Raza". Se muestra el porcentaje y, entre paréntesis, el número de animales positivos del total de animales en cada estrato.

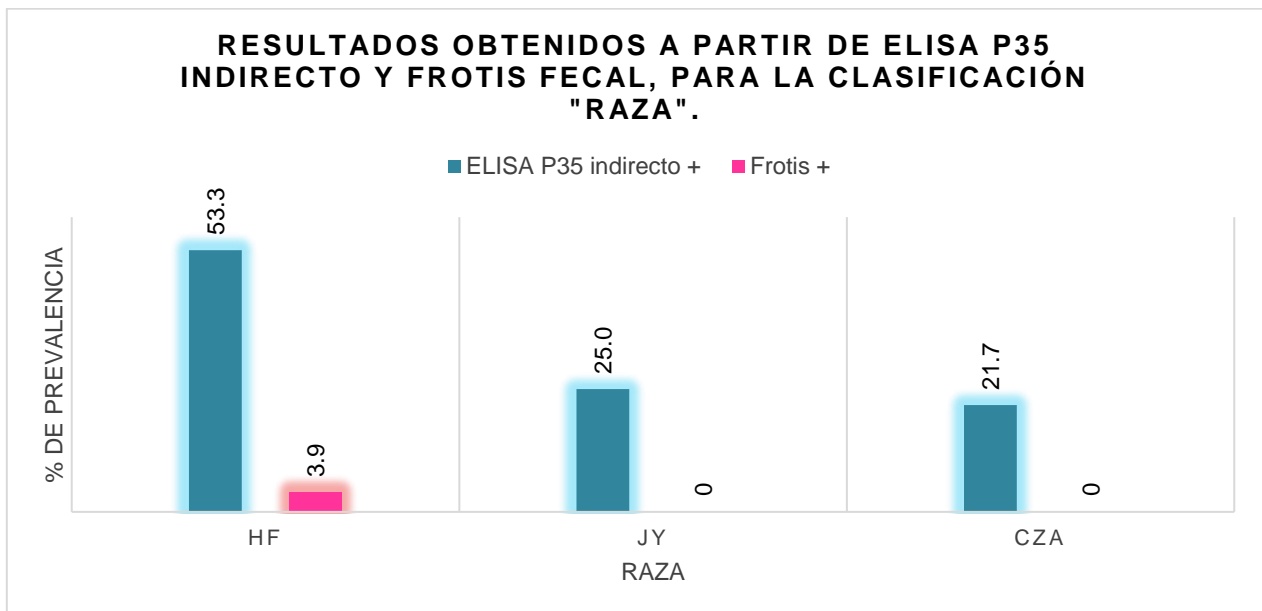


Gráfico 3. - Representación gráfica de los resultados de serología y frotis fecal para la clasificación "Raza".

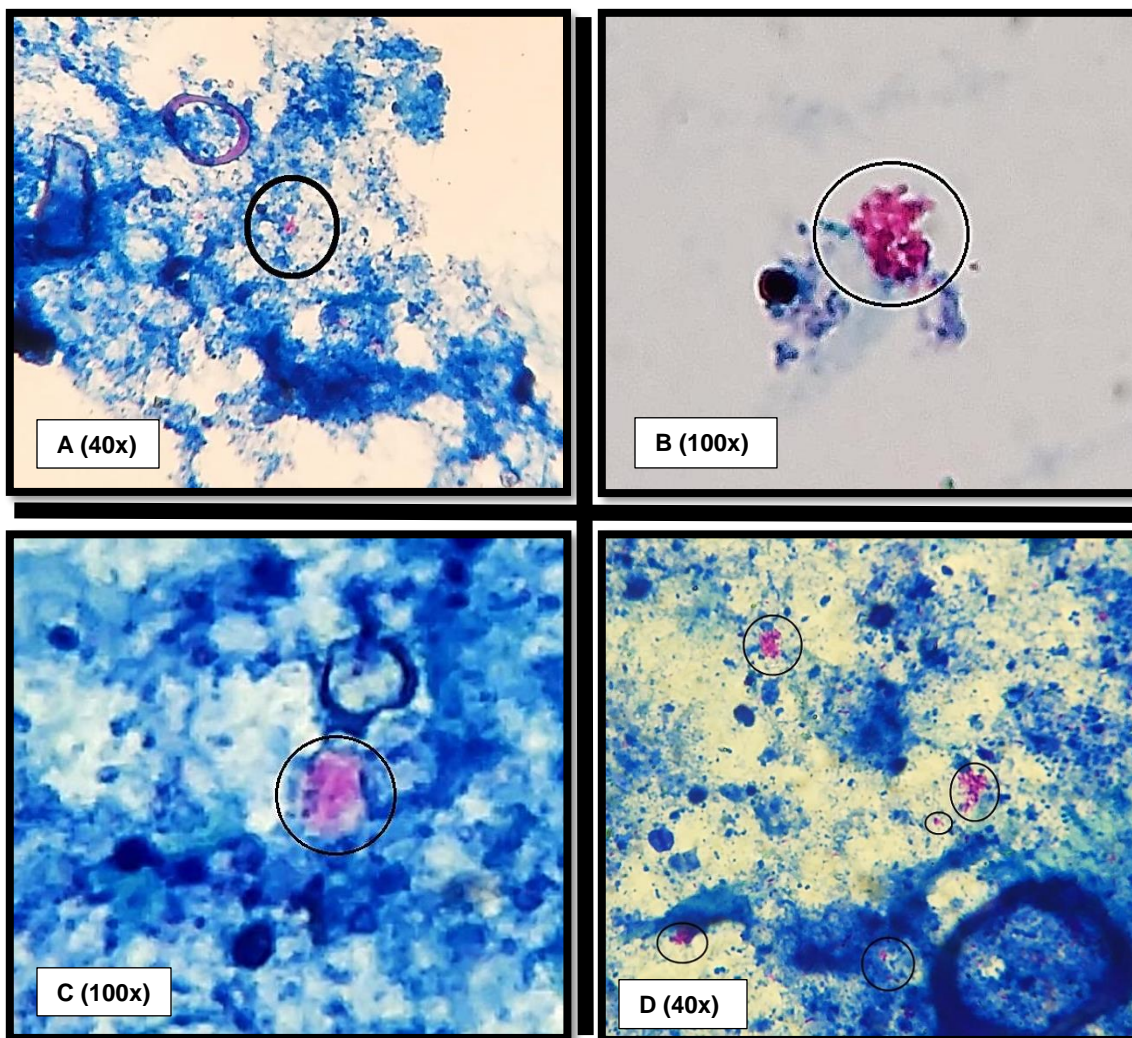


Figura 6. - Frotis fecales positivos donde se observa la presencia de BAAR (círculos).
Cuadro A: vaca 1. Cuadro B: vaca 2. Cuadro C: Novilla. Cuadro D: Control positivo.

6.4. – Resultados de PCR IS900 realizado a frotis fecales con presencia de BAAR.

Una vez obtenidos los productos de amplificación, se observaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio y, visualizado en un transiluminador de luz UV (Transiluminador UVP®, modelo M-20), donde se visualizaron 3 bandas de amplificación con un tamaño de 310pb, (Figura 7).

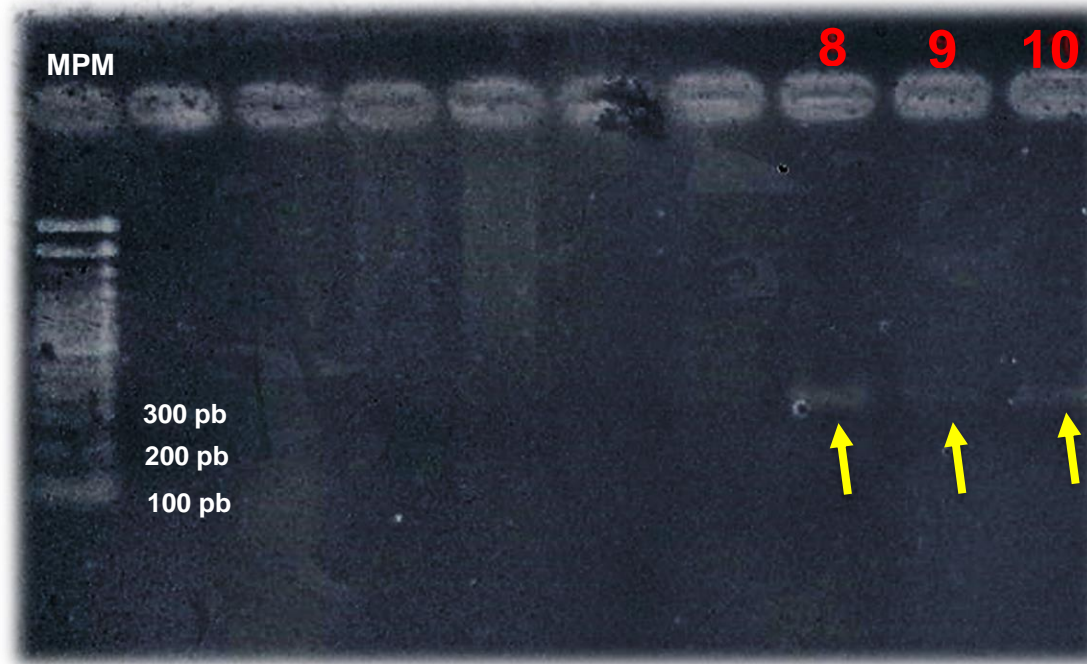


Figura 7. – Imagen de un gel de agarosa al 1.5%, donde se observan: carril 1, marcador de peso molecular (MPM) 100 pb; carril 2, control positivo (ADN de colonia de MAP); carril 7, control negativo (agua) y, carriles 8, 9 y 10: productos de 310pb, correspondientes a la PCR IS900 realizada a partir de heces con frotis fecal positivo a tinción ZN (señaladas con flechas amarillas).

6.5. – Comparación estadística de los resultados de ELISA P35 indirecto, entre estratos de las diferentes clasificaciones.

Se realizó la comparación de los resultados de ELISA P35 indirecto entre los estratos de cada una de las clasificaciones, para saber si entre ellos presentaban diferencia estadística significativa. Para este análisis se usó el procedimiento General Lineal Model (GLM) del programa estadístico Statistical Analysis System (SAS) 9.4 (SAS Institute, Inc.); cuando el modelo mostró significancia (determinando $p < 0.05$), las diferencias fueron examinadas usando la opción PDIFF, misma que presenta los valores de p de cada comparación entre estratos. Con base en la comparación realizada con dichos valores, se asignaron letras a los porcentajes de seroprevalencia de cada estrato, siendo “a” para la seroprevalencia más alta en cada comparación, “b” para la seroprevalencia subsecuente y “c” para el valor de seroprevalencia menor, de manera que los grupos que se muestren estadísticamente iguales tienen la misma letra y los grupos que muestren diferencia estadística significativa difieren en letra.

A continuación, se describen los resultados del análisis estadístico para las clasificaciones “Etapa productiva”, “Edad” y “Raza”.

6.5.1. - Comparación estadística de los resultados de ELISA P35 indirecto, para los estratos de la clasificación “Etapa productiva”.

Para la clasificación “Etapa productiva”, el procedimiento GLM presentó un valor $p < 0.0001$, por lo que mostró diferencia estadística ($p < 0.05$), (Cuadro 4).

Clasificación	GDL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor p
Etapa productiva	3	17.57715	5.85904977	39.48	<.0001

Cuadro 4. - Resultados obtenidos para la clasificación “Etapa productiva”, resultado en color morado se puede observar el valor de $p < 0.0001$.

Al usar la opción PDIFF, el programa mostró los valores de p para cada comparación entre estratos (Cuadro 5).

Productividad				
	Becerras	Novillas	Secas y vaquillas	Productoras
Becerras	-----	1.0000	<0.0001	<0.0001
Novillas	1.0000	-----	<0.0001	<0.0001
Secas y Vaquillas	<0.0001	<0.0001	-----	0.6692
Productoras	<0.0001	<0.0001	0.6692	-----

Cuadro 5. - Cuadro de comparación de los valores de p para obtener la diferencia estadística, entre los grupos de la clasificación “Etapa productiva”. Los valores en color azul presentan diferencia estadística significativa.

Con los valores obtenidos, se realizó la comparación para saber si entre grupos presentaban diferencia estadística significativa.

Los grupos “Becerras (b)” y “Novillas (b)” resultaron estadísticamente iguales, y ambos mostraron diferencia estadística significativa ante los grupos “Productoras (a)” y “Secas y vaquillas (a)”; mismos que también resultaron estadísticamente iguales (Cuadro 6).

Etapas productivas	Porcentaje de seroprevalencia a ELISA P35; (+/n)
Becerras (≤ 9 m)	0%; (0/21) ^b
Novillas (10 a 16 m)	0%; (0/23) ^b
Secas y vaquillas (≥ 18 m)	65.4% (17/26) ^a
Productoras (≥ 24 m)	75% (75/100) ^a

Cuadro 6. - Seroprevalencia a MAP para la clasificación “Etapas productivas”, entre paréntesis se muestra el número de animales positivos del total de animales en cada estrato. Valores con diferente letra en la misma columna mostraron diferencia estadística.

6.5.2. – Comparación estadística de los resultados de ELISA P35 indirecto, para los estratos de la clasificación “Edad”.

Los grupos que conforman la clasificación “Edad” fueron reagrupados para tener grupos estadísticamente representativos, quedando un total de 5 grupos; mismos que están conformados de la siguiente manera: 51 becerras de ≤ 24 meses, 45

vacas de 25 a 48 meses, 31 vacas de 49 a 72 meses, 26 vacas de 73 a 96 y 17 vacas de ≥ 97 meses; además, los valores de prevalencia fueron nuevamente elaborados, ya que al rehacer los grupos el número de integrantes totales y el número de integrantes positivos fueron diferentes.

Para la clasificación “Edad”, el procedimiento GLM presentó un valor de $p < 0.0001$, por lo que mostró diferencia estadística ($p < 0.05$), (Cuadro 7).

Clasificación	GDL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor p
Edad	4	16.54149	4.13537359	26.58	<.0001

Cuadro 7. – Resultados obtenidos para la clasificación “Edad”, resaltado en color morado se puede observar el valor de $p < 0.0001$.

Al usar la opción PDIFF, el programa mostró los valores de p para cada comparación entre estratos (Cuadro 8).

EDAD					
	≤ 24 m	25 a 48 m	49 a 72 m	73 a 96 m	≥ 97 m
≤ 24 m	-----	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0081
25 a 48 m	<0.0001	-----	0.9998	0.2129	0.0173
49 a 72 m	<0.0001	0.9998	-----	0.2128	0.0195
73 a 96 m	<0.0001	0.2129	0.2128	-----	0.7645
≥ 97 m	0.0081	0.0173	0.0195	0.7645	-----

Cuadro 8. - Comparación de los valores de p para obtener la diferencia estadística, entre los grupos de la clasificación “Edad”. Los valores en color azul presentan diferencia estadística significativa.

Con los valores obtenidos, se realizó la comparación para saber si entre grupos presentaban diferencia estadística significativa.

El grupo “≤24 meses (c)” presentó diferencia con todos los demás; los grupos “25 a 48 meses (a)” y “49 a 72 meses (a)” presentaron diferencia con los grupos “≤ 24 meses (c)” y con el grupo “≥ 97 meses (b)”; el grupo “73 a 96 meses (ab)” presentó diferencia con el grupo “≤ 24 meses (c)”; y el grupo “≥ 97 meses (b)” presentó diferencia con los grupos “≤ 24 meses (c)”, “25 a 48 meses (a)” y “49 a 72 meses (a)” (Cuadro 9).

Edad (meses)	Porcentaje de seroprevalencia a ELISA P35; (+/n)
≤ 24	9.8%; (5/51) ^c
25 a 48	82.2%; (37/45) ^a
49 a 72	83.9%; (26/31) ^a
73 a 96	61.5%; (16/26) ^{ab}
≥ 97	47.1%; (8/17) ^b

Cuadro 9. - Seroprevalencia a MAP para la clasificación “Edad”, entre paréntesis se muestra el número de animales positivos del total de animales en cada estrato. Valores con diferente letra en la misma columna mostraron diferencia estadística.

6.5.3. - Comparación estadística de los resultados de ELISA P35 indirecto, para los estratos de la clasificación “Raza”.

Para la clasificación “Raza”, el procedimiento GLM presentó un valor de $p < 0.0028$, por lo que mostró diferencia estadística ($p < 0.05$), (Cuadro 10).

Clasificación	GDL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor p
Raza	2	2.86778	1.43388987	6.09	0.0028

Cuadro 10. - Resultados obtenidos para la clasificación “Raza”, resaltado en morado se puede observar el valor de $p < 0.0028$.

Al usar la opción PDIFF, el programa mostró los valores de p para cada comparación entre estratos (Cuadro 11).

Raza			
	CZA	HF	JY
CZA	-----	0.0027	0.0423
HF	0.0027	-----	0.9118
JY	0.0423	0.9118	-----

Cuadro 11. - Cuadro de comparación de los valores de p para obtener la diferencia estadística, entre los grupos que conforman la clasificación “Raza”. Los valores en color azul presentan diferencia estadística significativa.

Con los valores obtenidos, se realizó la comparación para saber si entre grupos presentaban diferencia estadística significativa.

Los grupos “HF (a)” y “JY (a)” mostraron diferencia estadística significativa ante el grupo “CZA (b)” (Cuadro 12). Debido a que se consideraron todos los resultados de cada grupo en lugar de solamente los positivos, es importante señalar que la población de raza “HF” es lo doble que la población de raza “JY”, por lo que probablemente esta sea la razón por la cual el programa utilizado considera que entre estas dos poblaciones no hay diferencia estadística, contrario a lo que se pensó anteriormente cuando los resultados fueron analizados de manera descriptiva.

Raza	Porcentaje de seroprevalencia a ELISA P35; (+/n)
HF	64.5% (49/76) ^a
JY	60.5% (23/38) ^a
CZA	35.7% (20/56) ^b

Cuadro 12. - Seroprevalencia a MAP para la clasificación “Raza”, entre paréntesis se muestra el número de animales positivos del total de animales en cada estrato. Valores con diferente letra en la misma columna mostraron diferencia estadística.

6.6. - Propuestas para el control de PTB en el Módulo de Bovinos Lecheros del CEIEPAA.

6.6.1. - Estrategias para implementar la bioseguridad en el módulo.

a) Con base en los resultados anteriormente mostrados, se sugiere implementar medidas de bioseguridad en el Centro, que impidan que el módulo siga reinfectándose o, incluso, reinfectando a los demás módulos. Debido a que el calzado y la ropa actúan como fómites en la diseminación de MAP, así como de otras enfermedades, se recomienda: proporcionar a los trabajadores ropa y calzado específicos para cada módulo y si es posible, para cada área de los respectivos módulos, colocar vados sanitarios y lavabotas en la entrada de las diferentes áreas de los módulos, los cuales deben ser de uso obligatorio para todos. En caso de que no pueda asignarse ropa y calzado exclusivos para cada área, se recomienda tener un flujo de trabajo en el módulo, empezando por el área de crianza de becerras, seguido de las novillas, posteriormente las vaquillas, vacas secas y finalmente, las productoras; sin olvidar, el lavado de calzado antes de ingresar a cada una de las áreas.

b) Debido al uso de los mismos vehículos para la repartición de alimento en los diferentes módulos, es recomendable desinfectar periódicamente la maquinaria agrícola, así como los implementos utilizados para esta acción, esta actividad puede realizarse utilizando aldehídos (formaldehído al 5% y glutaraldehído al 2%) con un

tiempo de exposición mínima de 45 min a estas sustancias (Sánchez-Saldaña & Anduaga, 2005). El personal designado para realizar esta actividad debe usar protección adecuada: gafas, guantes, cubrebocas y ropa únicamente designada a la desinfección.

c) Es necesario capacitar a los trabajadores, así como hacer que generen conciencia sobre la importancia de la bioseguridad, a través de pláticas y de prácticas cotidianas que lleve a cabo el personal académico del Centro, con el fin de impulsarlos a seguir dichas medidas y disminuir el contagio de PTB y de otras enfermedades entre módulos. En estas actividades, deben ser incluidos los alumnos que llegan a prácticas y estancias, así también es recomendable dar indicaciones a las visitas para que lleven a cabo acciones de desinfección, tanto de su calzado, como de sus vehículos.

6.6.2. - Estrategias para disminuir la incidencia de PTB en el hato.

6.6.2.1. - En el programa reproductivo para aumentar el recambio de la población:

a) Si bien, es recomendable gestar únicamente a vacas seronegativas a MAP, en el caso de CEIEPAA no es una opción, debido al 54.1% de seroprevalencia en este hato. Sin embargo, como una medida para incrementar la velocidad en el recambio animal a partir de vacas negativas, se sugiere inseminar con semen sexado,

incrementando así la proporción de hijas de madres negativas que potencialmente se integrarían al sistema productivo. Así también, se recomienda eliminar a los bovinos que tengan un mal parámetro productivo y reproductivo, así como resultado positivo a serología de ELISA P35 indirecto.

6.6.2.2. - En el manejo de la vaca seca y periparto.

a) Debido a que actualmente comparten el mismo grupo de pastoreo las vacas secas como las vaquillas, se sugiere hacer dos lotes: uno de vacas secas y otro de vaquillas, para evitar que las vaquillas compitan por el alimento y la jerarquía con las vacas, situación que, al provocar estrés, podría ser un detonante de la enfermedad. Adicionalmente, también existe la posibilidad de que los animales estén reinfectándose entre sí.

b) Se sugiere colocar al lote de vacas próximas a parto en praderas cercanas a la sala de ordeña, con el fin de tener una mejor vigilancia y mejorar el tiempo de la separación madre-cría, la cual debe ser lo más inmediata posible, para evitar que el ternero succione de los pezones contaminados de MAP y disminuir riesgos de contagio.

6.6.2.3. - En el manejo de las becerras lactantes:

a) Higiene. Se recomienda: delimitar el área de crianza de becerras y colocar un vado sanitario en la entrada, mismo que debe ser de uso obligatorio. Las becerras deben alojarse individualmente en becerreras limpias y desinfectadas, las cubetas utilizadas para su alimentación deben ser lavadas diariamente.

b) Alimentación. Las becerras deben ser alimentadas con calostro pasteurizado bajo el protocolo mencionado por Godden (2008), el cual consiste en 60°C por 60 min. para eliminar MAP y no afectar las concentraciones de IgG, y leche pasteurizada bajo el protocolo de Hope, Tulk & Condrón (1996), que consiste en aumentar el tiempo (73°C por 35 seg) o la temperatura (> 82.5°C por 15 seg) de pasteurización para eliminar a MAP; estos alimentos preferentemente deben provenir de vacas negativas, para disminuir el riesgo de contagio con MAP.

6.6.2.4. - En el manejo del pastoreo.

a) Debido a que la principal forma de contagio de PTB es la ruta fecal-oral, así como la presencia de animales eliminadores de micobacterias en el hato, se necesita establecer praderas exclusivas por etapa productiva, evitando que vacas de diferente estado productivo, se infecten o reinfecten a otro grupo de animales, como sucede actualmente con los grupos “Secas y vaquillas” y “Productoras”.

6.6.3. - Estrategias para evaluar el avance en el control de PTB.

a) Se plantea que, para evaluar el avance del control en PTB en el hato de estudio y, una vez que se implementen las propuestas antes mencionadas, se deben realizar muestreos 2 veces al año, para realizar diferentes pruebas de laboratorio, tales como ELISA P35 indirecto, frotis fecal, cultivo bacteriano y PCR IS900. Los resultados obtenidos a partir de estas pruebas permitirán evaluar el avance que tienen las medidas de manejo y de bioseguridad implementadas. Estos resultados también pueden servir para modificar dichas medidas, o incluso, implementar otras.

7. - Discusión.

Este estudio muestra el 54.1% de seroprevalencia de PTB en el ganado bovino lechero del CEIEPAA. En 2011 López-Yurame (2011), obtuvo el 4.39% de seropositividad en este mismo módulo, mientras que en los frotis fecales teñidos con ZN no observó eliminación de BAAR. El aumento de la seroprevalencia en el módulo en los últimos años, puede ser debido a que no se han corregido prácticas como el compartir praderas para el pastoreo de grupos en diferente etapa productiva, así como que tanto trabajadores, personal académico y estudiantes, van de un módulo a otro con el mismo calzado y ropa; así mismo, se debe mencionar que la maquinaria utilizada para la alimentación de los animales, es utilizada en todas las áreas sin llevar a cabo un programa de desinfección. dichos factores no

sólo actúan como fómites para esta enfermedad, sino para muchas más. Lo anterior concuerda con el modelo de simulación de JD de Groenendaal *et al.*, (2002), quienes plantean que sin ningún control, PTB puede aumentar más del 50% en 20 años. Así mismo, se ha realizado también el diagnóstico serológico en los módulos de ovinos, caprinos, ciervo rojo y bovinos de carne del Centro, los cuales han mostrado PTB de forma clínica y subclínica (López-Yurame, 2011, 2014), recomendándose ya entonces algunas medidas que no han sido totalmente consideradas. Actualmente el módulo de bovinos lecheros cuenta con un certificado de Hato libre de TB, sin embargo, la presencia de PTB en este ganado, plantea el riesgo potencial de generar falsos positivos a la prueba de tuberculina (de Ward, 2005; Álvarez *et al.*, 2008), por ello, es necesario realizar estrategias para el control de MAP y disminuir la posibilidad de estos casos.

Con relación a la etapa productiva, Jaramillo-Moreno *et al.* (2017), obtuvieron la mayor positividad en vacas no productoras, con 18.1% de seroprevalencia, además, no encontraron asociación estadística significativa de la etapa productiva y la infección con MAP. Los resultados de este estudio difieren con los obtenidos en el presente, donde la mayor seroprevalencia se encontró en el grupo de las productoras, con 75% de positividad. Estadísticamente, en este estudio tampoco se encontró diferencia entre el grupo de las vacas productoras y el grupo de las vacas secas y las vaquillas, sin embargo, estos dos grupos sí mostraron diferencia estadística significativa con los grupos de becerras y novillas. Debido a que estas etapas no son incluidas en el estudio de Jaramillo-Moreno *et al.*, (2017), no es posible saber si estos resultados también concuerdan, así mismo, no es descartable

el hecho de que, si en su estudio hubieran incluido dichas etapas, en su análisis estadístico sí hubiesen encontrado asociación estadística de la etapa de producción con relación a la infección por MAP.

La seropositividad más alta con respecto a la edad de los animales mostrada en este estudio, concuerda con lo obtenido por Benavides Benavides *et al.*, (2016), quienes encontraron 11.6% de animales positivos de 3 años, mientras que en el presente, la seropositividad de los animales de 3 a 4 años fue de 87.5%; sin embargo, es importante mencionar que el estudio de Benavides Benavides *et al.*, (2016), es un promedio de diferentes comunidades muestreadas, es decir que aunque el mayor porcentaje salió en animales de 3 años, no se puede saber si todos los hatos muestreados presentaron el mismo resultados, así también no mencionan que existieran otras especies que pudieran ser fuente de infección de MAP, como sí ocurre en el presente estudio. Jaramillo-Moreno *et al.*, (2017), por su parte, obtuvieron un 13.9%, de seropositividad en animales menores de 4 años, Hay que hacer mención de que, a diferencia de este estudio, Jaramillo-Moreno *et al.*, (2017) categorizan a los bovinos únicamente en dos grupos: > 4 años y < 4 años, sin mencionar en cuál de las edades se presenta mayor seropositividad, sólo menciona que todos los bovinos son mayores de 2 años. Mientras que en este estudio solo se encontró diferencia estadística significativa en los animales ≤ 24 meses y ≥ 97 meses, Jaramillo-Moreno *et al.*, (2017) y Benavides Benavides *et al.*, (2016) mencionan no haber encontrado asociación estadística significativa con relación a la variable "Edad" y serología positiva a MAP. Hay que destacar que por la forma en que Jaramillo-Moreno *et al.*, (2017) categorizan esta variable, cabe la posibilidad de

que, si hubieran realizado más estratos, como en este estudio, el resultado de su análisis estadístico hubiera sido diferente.

Con respecto a la raza, en el presente estudio se encontró una mayor seropositividad en la raza HF, sin embargo, en el análisis estadístico las razas HF y JY no mostraron diferencia estadística significativa, contrario a las vacas CZA, quienes mostraron estadísticamente una menor seropositividad, la cual puede verse relacionada a la heterosis (Díaz, 1969). Benavides Benavides *et al.*, (2016) mencionan haber muestreado razas HF, JY, Normando, Pardo Suizo, Simmental y Cruzas, habiendo encontrado mayor seropositividad y asociación estadística significativa para la raza JY, categoría en la que encontraron un 50% de seroprevalencia. El haber muestreado sólo 4 bovinos de raza JY y 817 bovinos de raza HF, población en la que encontraron el 6.7% de seroprevalencia, hace pensar que son poblaciones estadísticamente no comparables, por lo que quizá esta sea la razón de haber obtenido dicha asociación. Por otro lado, Jaramillo-Moreno *et al.*, (2017), mencionan haber muestreado raza HF y no HF, encontrando mayor positividad en los bovinos HF, con un 14.7% de seroprevalencia, así mismo, también encontró asociación estadística de esta raza con la seropositividad a MAP. Similar a lo ocurrido con el estudio antes mencionado (Benavides Benavides *et al.*, 2016), Jaramillo-Moreno *et al.*, (2017) muestrearon poblaciones muy desiguales, siendo 68 animales los que conforman el grupo de HF, y 10 animales los que conforman el grupo de no HF, encontrando por ende esta asociación. No se descarta el hecho de que, si la población no HF hubiera tenido mayor cantidad de integrantes, los resultados del análisis estadístico hubiesen sido distintos. Si bien, existen estudios

que hablan sobre la susceptibilidad genética de la raza HF a la infección con MAP (Ruiz-Larrañaga *et al.*, 2010, 2012; Vázquez *et al.*, 2014), sin embargo, estos estudios se realizaron en bovinos de esta raza y no la comparan con otras para demostrar que existe una mayor susceptibilidad.

Es importante señalar que ambos estudios (Benavides Benavides *et al.*, 2016; Jaramillo-Moreno *et al.*, 2017) fueron realizados en Colombia, es decir que probablemente presenten diferente manejo sanitario, así como otro grado de infección, lo cual también influye en los resultados, así mismo, es importante tomar en cuenta el sistema de alimentación manejada, si bien en el caso de estos dos estudios no es mencionada, en el caso del CEIEPAA se lleva a cabo el pastoreo, por lo que los animales consumen pastura con alto nivel de contaminación, pudiendo ser una causa que explique el 54.1% de seroprevalencia en el hato.

Respecto a la excreción de MAP en heces, aparentemente la eliminación de BAAR en los bovinos lecheros del CEIEPAA, solamente 3 muestras de las 170 fueron positivas, lo que corresponde a 1.8% de eliminación de micobacterias en el hato; sin embargo, es necesario hacer muestreos al menos 2 veces al año para monitorear el comportamiento de la eliminación de micobacterias en heces. De las 3 vacas positivas a BAAR en frotis fecal, 2 de ellas presentan serología negativa, hecho que no descarta la presencia de la infección en estos bovinos. En un estudio realizado por Martínez-Romero, (2002) se llega a la conclusión de que la cantidad de BAAR presentes en un animal, es independiente del valor de densidad óptica que alcance en la prueba de ELISA, ya que la respuesta inmune que monta cada animal es variable; de igual forma, también podría atribuirse a las Bacterias Viabiles

No Cultivables, las cuales son bacterias que por diversos factores como los cambios de pH o de temperatura, estrés oxigénico o, incluso, tratamientos con antibióticos, entran en un estado en el que no pueden desarrollarse y formar colonias, aunque siguen estando vivas; durante este estado las bacterias pierden su virulencia, sin embargo, al salir de él vuelven a recuperarla (Paraje & Tamagnini, 2015). Es importante saber que la OIE (2012) hace mención de la imposibilidad de la diferenciación entre micobacterias ambientales y micobacterias patógenas en la tinción ZN, ya que todas son AAR. Además de la poca fiabilidad que se menciona sobre la tinción, se tiene que tomar en cuenta la ya mencionada intermitencia en la eliminación bacteriana; a pesar de esto, en el presente estudio todas las muestras que resultaron positivas a tinción ZN, también resultaron positivas a PCR IS900, confirmando de esta manera, que los BAAR en las heces de los animales son MAP. Caraballo Blanco *et al.* (2018), realizaron frotis fecal con tinción ZN en bovinos y, al igual que en este estudio, encontraron mayor eliminación de BAAR en vacas de 1 a 3 años de edad; cabe mencionar que el autor también hace mención de que la presencia de BAAR en heces sólo da un diagnóstico presuntivo de PTB en un hato. Por otro lado, Soto *et al.* (2002) realizaron un estudio en el que hacen tinción ZN y cultivo fecal, en muestras que ellos determinaron como negativas se pudo aislar MAP por cultivo bacteriológico, lo cual nos indica que la tinción ZN no es 100% confiable; si bien, se realizó cultivo bacteriológico en este estudio, hasta las 30 semanas no observó crecimiento de colonias sugerentes a MAP en los medios, a pesar de que distintos autores reportan el crecimiento de MAP desde 4 a 17 semanas post-inoculación (Whitlock *et al.*, 2000; Tripathi *et al.*, 2006; Pradenas, Kruze & van Schaik, 2008; Sonawane & Tripathi, 2013). Lo anteriormente

mencionado no es definitivo de que en el hato no haya presencia de otros animales eliminadores de micobacterias, ya que hay cepas que tardan hasta un año en crecer, especialmente las de origen ovino (Cepa S) (Correa Muñoz *et al.*, 2013). Además, aunque se menciona una especificidad del 99 al 100% para esta prueba y es considerada como la “prueba de oro” (OIE, 2012), hay que tomar en cuenta que si un animal no está eliminando la micobacteria al momento del muestreo, el cultivo bacteriano no lo va a detectar; de igual forma, un animal que elimine menos de 100 UFC/g en heces tampoco será detectado (Pradenas, Kruze & van Schaik, 2008). Se recomienda implementar otro tipo de prueba, como RT-PCR para detectar rápidamente la eliminación de micobacterias en heces, sin tener que esperar resultados por, al menos, 16 semanas (Alinovi *et al.*, 2009), esto para tener otro punto de referencia hacia dónde dirigir las medidas de manejo y de bioseguridad que se implementen en el módulo.

Es necesario darle la importancia debida a la PTB, y continuidad al diagnóstico de dicha enfermedad. Las medidas que se tomen contra esta enfermedad no pueden basarse solamente en una prueba de diagnóstico, por las características de la enfermedad, como son: el periodo de incubación y la intermitencia en la eliminación bacteriana, y por las características de las pruebas de diagnóstico, ya que ninguna es 100% sensible, ni 100% específica y puesto que cada una de las pruebas detecta diferentes elementos, por ejemplo; el ELISA P35 indirecto, trabaja en la detección de los anticuerpos, sin embargo, la respuesta inmune de los animales a MAP es variable, además de que tarda en desarrollarse la producción de anticuerpos; mientras que el frotis fecal solamente será útil si el animal es eliminador de

micobacterias, y éstas micobacterias solo son teñidas por la tinción ZN cuando tienen una pared celular madura, en caso contrario, estas bacterias no se consideran como AAR; por otra parte, el cultivo bacteriológico, además de que no detecta a los animales no eliminadores, solamente detecta a los que eliminan al menos 100 UFC/g de heces. Mientras que la PCR IS900, a pesar de ser prueba considerada con un porcentaje arriba de 90% de especificidad y sensibilidad, debe considerarse que se pueden obtener resultados negativos en muestras clínicas donde no se tenga suficiente ADN bacteriano genómico a amplificar o a factores inhibidores que interfieran con la extracción de ADN o amplificación en la PCR, además de que no discrimina entre la amplificación del genoma bacteriano de células viables y no viables. Por estas razones y debido a que una sola prueba diagnóstica no es capaz de detectar a todos los animales en una sola fase de infección, es importante hacer distintas pruebas de laboratorio antes de tomar decisiones para el control de PTB, no solamente en el módulo donde se realizó este trabajo, sino en cualquier hato que presente esta enfermedad.

8. - Conclusiones.

1. – La prueba de ELISA P35 indirecta mostró una seroprevalencia a MAP del 54.1%, en el hato de los bovinos lecheros del CEIEPAA.

2. – Por etapa productiva, la mayor seroprevalencia está en el grupo de vacas productoras, con 75%.

3. –La seroprevalencia de vacas productoras y secas y vaquillas (75% y 65.4%, respectivamente) presentó diferencia estadística significativa, en comparación con la de becerras y novillas ($p < 0.05$).

4. – Por edad, la mayor seroprevalencia se encuentra en las vacas de 37 a 48 meses, con 87.5%.

5. – Los animales ≤ 24 meses presentaron menor seroprevalencia (9.8%) en comparación con los grupos de mayor edad, siendo este valor estadísticamente significativo ($p < 0.05$).

6. – Por raza, la mayor seroprevalencia se encuentra en vacas HF con 53.3%.

7. – Los bovinos CZA presentaron menor seroprevalencia (35.7%) en comparación con las razas puras, siendo este valor estadísticamente significativo ($p < 0.05$).

8. – El 1.8% de animales del hato eliminan micobacterias en heces, correspondiendo todos ellos a la raza HF.

9. – Es necesario establecer estrategias de manejo y de bioseguridad en el hato de los bovinos lecheros del CEIEPAA.

10. – Una vez incrementadas las estrategias es necesario hacer la evaluación de las mismas, muestreando a los animales del hato al menos 2 veces al año para su diagnóstico mediante pruebas de laboratorio (ELISA P35, frotis fecal, cultivo bacteriológico, PCR IS900).

9. - Bibliografía.

- Alinovi, C. A. *et al.* (2009) 'Real-time PCR, compared to liquid and solid culture media and ELISA, for the detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*', *Veterinary Microbiology*. Elsevier, 136(1–2), pp. 177–179. doi: 10.1016/J.VETMIC.2008.10.012.
- Álvarez, J. *et al.* (2008) 'Interference of paratuberculosis with the diagnosis of tuberculosis in a goat flock with a natural mixed infection', *Veterinary Microbiology*. Elsevier, 128(1–2), pp. 72–80. doi: 10.1016/J.VETMIC.2007.08.034.
- Andrews, A. H. *et al.* (2004) 'Johne's disease (paratuberculosis)', in *Bovine Medicine Diseases and Husbandry of Cattle*. 2nd edn. UK: Blackwell Science, p. 857,858.
- Basagoudanavar, S. H., Goswami, P. P. & Tiwari, V. (2006) 'Cellular Immune Responses to 35 kDa Recombinant Antigen of *Mycobacterium avium* paratuberculosis', *Veterinary Research Communications*. Kluwer Academic Publishers, 30(4), pp. 357–367. doi: 10.1007/s11259-006-3253-0.
- Benavides Benavides, B. *et al.* (2016) 'Estudio epidemiológico de paratuberculosis bovina en hatos lecheros del Sur de Nariño, Colombia', *Rev. Med. Vet.*, (31), pp. 57–66. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rmv/n31/n31a06.pdf> (Acceso: 7 Enero 2019).
- Bezoz-Garrido, J., *et al.* (n. d.) *Fundamento inmunológico de las pruebas diagnósticas ante mortem de la tuberculosis en rumiantes domésticos*. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/vetenfin/nfondevila/pruebastbc.htm> (Acceso: 20 Mayo 2019).
- Briken, V. *et al.* (2004) 'Mycobacterial lipoarabinomannan and related lipoglycans: from biogenesis to modulation of the immune response', *Molecular Microbiology*. Wiley/Blackwell (10.1111), 53(2), pp. 391–403. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04183.x.
- Britton, L. E. *et al.* (2016) 'Potential application of emerging diagnostic techniques to the diagnosis of bovine Johne's disease (paratuberculosis)', *The Veterinary Journal*. W.B. Saunders, 209, pp. 32–39. doi: 10.1016/J.TVJL.2015.10.033.
- Bull, T. *et al.* (2000) 'Characterization of IS900 loci in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and development of multiplex PCR typing', *Microbiology*, 146(9), pp. 2185–2197. doi: 10.1099/00221287-146-9-2185.
- Bull, T. J. *et al.* (2003) 'Detection and verification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fresh ileocolonic mucosal biopsy specimens from individuals with

and without Crohn's disease.', *Journal of clinical microbiology*. American Society for Microbiology, 41(7), pp. 2915–23. doi: 10.1128/JCM.41.7.2915-2923.2003.

Caraballo Blanco, L., Castellar Martínez, A. & Pardo Pérez, E. (2018) 'Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis en heces de bovinos del municipio de Sincelejo, Sucre, Colombia', *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 29(3), p. 987. doi: 10.15381/rivep.v29i3.14111.

Castrellón-Ahumada, V. E. (2012) *Expresión de la proteína recombinante P35 de Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis y su uso en diagnóstico de Paratuberculosis en ovinos*. FMVZ, UNAM.

CFSPH (2007) 'Paratuberculosis'. Disponible en: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/paratuberculosis-es.pdf> (Acceso: 28 Abril 2018).

Chávez-Gris, G. (2005) 'Epidemiología, prevención y control de Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis en pequeños rumiantes.', in Iván, R. V. R. (ed.) *Enfermedades de importancia económica en Producción Animal*. 1st edn. México, pp. 393–404.

Chiodini, RJ Van Kruiningen, HJ & Merkal, R. (1984) 'Ruminant Paratuberculosis (Johne's Disease): The Current Status and Future Prospects', *The Cornell Veterinarian*, 74(1), pp. 218–262. Disponible en: <https://babel.hathitrust.org/cgi/pt?id=uc1.b4179410;view=1up;seq=234>.

Chiodini, R. J. & Hermon-Taylor, J. (1993) *The thermal resistance of Mycobacterium paratuberculosis in raw milk under conditions simulating pasteurization*, *J Vet Diagn Invest*. Disponible en: <http://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/104063879300500424> (Acceso: 20 Septiembre 2018).

Chiodini, R. J. (2018) 'Crohn's disease and Johne's disease: why doesn't everyone believe you?', en *14th International Colloquium on Paratuberculosis*. Riviera Maya, México, p. 155.

Cicuta, M. E. et al (2003) *Validez de la prueba tuberculínica para el diagnóstico de paratuberculosis ovina*. Argentina. Disponible en: <http://200.45.54.140/unnevieja/Web/cyt/cyt/2003/comunicaciones/04-Veterinarias/V-016.pdf>.

Clarke, C. J. (1997) 'The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species', *Journal of Comparative Pathology*. W.B. Saunders, 116(3), pp. 217–261. doi: 10.1016/S0021-9975(97)80001-1.

Codex Alimentarius (2009) *Código de prácticas de higiene para la Leche y los productos lácteos (CAC/RCP 57-2004)*.

Collins, D. M. et al (1990) *Identification of Two Groups of Mycobacterium paratuberculosis Strains by Restriction Endonuclease Analysis and DNA Hybridization*, *Journal of*

Clinical Microbiology. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC267994/pdf/jcm00055-0111.pdf> (Acceso: 22 Agosto 2018).

Córdova, L. D. *et al.* (2011) 'Paratuberculosis bovina en San Luis Potosí.', en *XLVII Reunión Nacional de Investigación Pecuaria*. Guanajuato, México., p. 38.

Correa Muñoz, M. *et al.* (2013) 'Caracterización molecular de *Mycobacterium avium* subespecie paratuberculosis en bovinos y ovinos de Mexicali, Baja California, México.', *Revista mexicana de ciencias pecuarias*. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, 4(4), pp. 489–500. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-11242013000400006&script=sci_arttext (Acceso: 12 Marzo 2019).

Cummins, C. S. (1962) 'Chemical Composition and Antigenic Structure of Cell Walls of *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Actinomyces* and *Arthrobacter*', *Journal of General Microbiology*. Microbiology Society, 28(1), pp. 35–50. doi: 10.1099/00221287-28-1-35.

Díaz, S. *et al.* (1969) 'Marcadores genéticos para resistencia y susceptibilidad a enfermedades infecciosas en animales domésticos', *Analecta Veterinaria*. Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de la Plata, 25(1), pp. 40–52. Disponible en: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/11177> (Acceso: 9 Marzo 2019).

Dohmann, K. *et al.* (2003) 'Characterization of genetic differences between *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis type I and type II isolates.', *Journal of clinical microbiology*. American Society for Microbiology, 41(11), pp. 5215–23. doi: 10.1128/JCM.41.11.5215-5223.2003.

Dorronsoró, I. & Torroba, L. (2007) *Microbiología de la tuberculosis*. *Microbiology of tuberculosis*, *An. Sist. Sanit. Navar.* Disponible en: <http://scielo.isciii.es/pdf/asisna/v30s2/original5.pdf> (Acceso: 21 Agosto 2018).

Esperanza-Gómez, L. del Mar-Blanco, M. & Doménech, A. (2006) *Manual de Inmunología Veterinaria*. Madrid: Pearson Educación, S.A.

Fecteau, M.-E. *et al.* (2010) 'Exposure of young dairy cattle to *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis (MAP) through intensive grazing of contaminated pastures in a herd positive for Johne's disease.', *The Canadian veterinary journal = La revue vétérinaire canadienne*. Canadian Veterinary Medical Association, 51(2), pp. 198–200. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20436867> (Acceso: 26 Febrero 2019).

Fecteau, M. E. (2018) 'Paratuberculosis in Cattle', *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. Elsevier, 34(1), pp. 209–222. doi: 10.1016/J.CVFA.2017.10.011.

FMVZ (2005) *Manual de prácticas del Laboratorio de Inmunología*. 2nd edn. Editado por

A. Cobos-Marín, L., Castañeda-Ramírez. México: Universidad Nacional Autónoma de México.

Garrido, J. *et al.* (2000) 'Use of a PCR method on fecal samples for diagnosis of sheep paratuberculosis', *Veterinary Microbiology*. Elsevier, 77(3–4), pp. 379–386. doi: 10.1016/S0378-1135(00)00323-0.

Godden, S. (2008) *Pasteurizing milk and colostrum*. St. Paul, MN. Disponible en: <http://www.dairyweb.ca/Resources/DCHC2008/Godden.pdf> (Acceso: 2 Julio 2019).

Gómez-González, B. & Escobar, A. (2006) *Estrés y sistema inmune*, *Rev Mex Neuroci*. Disponible en: <http://revmexneuroci.com/wp-content/uploads/2014/06/Nm061-05.pdf> (Acceso: 7 Octubre 2018).

Grant, I. R. *et al.* (2002) 'Effect of commercial-scale high-temperature, short-time pasteurization on the viability of Mycobacterium paratuberculosis in naturally infected cows' milk.', *Applied and environmental microbiology*. American Society for Microbiology, 68(2), pp. 602–7. doi: 10.1128/AEM.68.2.602-607.2002.

Green, E. P. *et al.* (1989) 'Sequence and characteristics of IS 900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of Mycobacterium paratuberculosis.', *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 17(22), pp. 9063–9073. doi: 10.1093/nar/17.22.9063.

Griffiths, T. A., Rioux, K. & De Buck, J. (2008) 'Sequence polymorphisms in a surface PPE protein distinguish types I, II, and III of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis.', *Journal of clinical microbiology*. American Society for Microbiology Journals, 46(4), pp. 1207–12. doi: 10.1128/JCM.02031-07.

Groenendaal, H. *et al.* (2002) 'A simulation of Johne's disease control', *Preventive Veterinary Medicine*. Elsevier, 54(3), pp. 225–245. doi: 10.1016/S0167-5877(02)00027-2.

Gutierrez-Pabello, J. A. (2010) *Inmunología Veterinaria*. México: Editorial El Manual Moderno.

Guzmán-Urrego, M. A. *et al.* (1999) 'Las pruebas serológicas en el diagnóstico de la enfermedad infecciosa', *Rev. Fac. Med. UN Col.*, 47(2), pp. 89–97. Disponible en: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/revfacmed/article/viewFile/19446/20420> (Acceso: 9 Noviembre 2018).

Hernández-Reyes, A. L. (2018) *Identificación de Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis mediante técnicas de diagnóstico bacteriológicas, moleculares y anatomopatológicas en ungulados silvestres en México*. FMVZ-UNAM.

Hope, AF, Tulk, PA & Condrón, R. (1996) 'Commercial pasteurization of Mycobacterium paratuberculosis in whole milk.', in *Fifth International Colloquium on Paratuberculosis*. Madison, Wisconsin, p. 35.

Hostetter, J. *et al.* (2003) 'Phagosomal maturation and intracellular survival of

Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in J774 cells', *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. Pergamon, 26(4), pp. 269–283. doi: 10.1016/S0147-9571(02)00070-X.

Jaramillo-Moreno, S. *et al.* (2017) 'Seroprevalencia de paratuberculosis (*Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis) en un hato de lechería especializada del altiplano norte de Antioquia, Colombia.', *Veterinaria y Zootecnia*, 11(2), pp. 24–33. doi: 10.17151/vetzo.2017.11.2.3.

Jiménez L, Morales K & Riveros A (n. d.) *Revisión de los métodos diagnósticos más utilizados para ganado bovino en las fases clínica y subclínica de la Enfermedad de Johne causada por el agente Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis*. Disponible en: https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/41014001/Articulo_Paratuberculosis..pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1558389951&Signature=WFuxdVJgKfp10NqxS%2FpNYLgryCg%3D&response-content-disposition=inline%3B filename%3DArticulo_Paratube (Acceso: 20 Mayo 2019).

de Juan, L. *et al.* (2006) 'Molecular epidemiology of Types I/III strains of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis isolated from goats and cattle', *Veterinary Microbiology*. Elsevier, 115(1–3), pp. 102–110. doi: 10.1016/J.VETMIC.2006.01.008.

Kahn, C. (2010) 'Paratuberculosis (Jhone's Disease)', in *The Merck Veterinary Manual*. 10th edn. N.J., U.S.A.: Merck & Co., Inc., pp. 690–693.

Landero-Sánchez, B. *et al.* (2016) 'El *Mycobacterium avium* subesp. paratuberculosis disminuye la regulación de la expresión del ARNm de la ferroportina 1 en los macrófagos inducidos con hierro', *Veterinaria México*, 3(1), p. 12. doi: 10.21753/vmoa.3.1.361.

Lepper, A. *et al.* (1989) 'Sequential bacteriological observations in relation to cell-mediated and humoral antibody responses of cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis* and maintained on normal or high iron intake', *Australian Veterinary Journal*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 66(2), pp. 50–55. doi: 10.1111/j.1751-0813.1989.tb03015.x.

Limón, G. M. M. *et al* (2011) 'Prevalencia de Paratuberculosis en bovinos lecheros de Guanajuato y Aguascalientes: resultados preliminares.', in *XLVII Reunión Nacional de Investigación Pecuaria*. Guanajuato, México, p. 35.

López-Yurame, J. (2011) *Situación de la Paratuberculosis en el área de bovinos lecheros y de ciervos en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión de Producción Animal en Altiplano (CEIEPAA)*. Propuestas de control. FMVZ-UNAM.

López-Yurame, J. (2014) *Evaluación de estrategias de control en paratuberculosis en hatos bovinos y rebaños caprinos, ovinos y ciervos afectados en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano*. FMVZ-UNAM.

- Madigan *et al.* (2004) 'Capítulo 12: La Diversidad procariótica: Bacteria', en *Brock. Biología de los microorganismos*. 10th edn. Madrid: Pearson Educación, S.A., pp. 412–415.
- Martínez-Covarrubias, A. G. (2012) *Determinación de la excreción de Mycobacterium avium paratuberculosis a partir de heces de bovino, empleando PCR en tiempo real*. FMVZ-UNAM.
- Martínez-Herrera, D. I. *et al* (2012) 'Seroepidemiology of goat Paratuberculosis in five municipalities of central Veracruz, México', *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. Universidad Autónoma de Yucatán, 15(2). Disponible en: <http://www.redalyc.org/html/939/93924626014/> (Acceso: 20 Abril 2018).
- Martínez-Romero, E. G. (2002) *Hallazgos anatomopatológicos su relación con los valores de densidad óptica de la prueba de ELISA en ovinos seropositivos a Paratuberculosis, en Martínez de la Torre, Veracruz*. UNAM.
- Mcdonald, W. L. *et al.* (2005) 'Heat Inactivation of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in Milk', *Applied and Environmental Microbiology*, 71(4), pp. 1785–1789. doi: 10.1128/AEM.71.4.1785-1789.2005.
- Meylan, M. *et al.* (1996) 'Survival of Mycobacterium paratuberculosis and preservation of immunoglobulin G in bovine colostrum under experimental conditions simulating pasteurization.', *American journal of veterinary research*, 57(11), pp. 1580–5. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8915433> (Acceso: 20 Septiembre 2018).
- Micobacterias, C. C. de (2005) *Manual de Diagnóstico de Micobacterias de importancia en Medicina Veterinaria*. Editado por: A. A. de V. de L. de Diagnóstico. Sta. Fe, Argentina.
- Milián-Suazo, F. *et al* (2015) 'Prevalence and associated risk factors for Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in dairy cattle in Mexico', *J. Vet. Med. Anim. Health*, 7(10), pp. 302–307. Disponible en: <https://doi.org/10.5897/JVMAH2015.0402>.
- Miranda-Bandera, M. V. (2005) *Evaluación del impacto económico de la paratuberculosis en ganado bovino lechero (sistema intensivo) en el complejo agropecuario industrial Tizayuca, Hidalgo, México*. FMVZ-UNAM.
- Mitchell, R. M. *et al.* (2015) 'Differences in intermittent and continuous fecal shedding patterns between natural and experimental Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis infections in cattle', *Veterinary Research*. BioMed Central, 46(1), p. 66. doi: 10.1186/s13567-015-0188-x.
- Montaraz, J. A. (2010) 'Órganos y células asociados a la respuesta inmune', en Gutierrez-Pabello, J. A. *Inmunología Veterinaria*. México: Editorial El Manual Moderno, pp. 11–19.
- Mosqueda-Gualito, J. (2010) 'Respuesta inmune humoral', en Gutierrez-Pabello, J. A. *Inmunología Veterinaria*. México: Editorial El Manual Moderno, pp. 117–128.

- National Research Council (U.S.). Committee on Diagnosis and Control of Johne's Disease. (2003) *Diagnosis and control of Johne's disease*. National Academies Press.
- Nielsen, S. S. *et al.* (2016) 'Dam's infection progress and within-herd prevalence as predictors of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis ELISA response in Danish Holstein cattle', *Preventive Veterinary Medicine*. Elsevier, 125, pp. 54–58. doi: 10.1016/J.PREVETMED.2016.01.010.
- OIE (2012) 'Paratuberculosis (enfermedad de Johne)', en OIE (ed.) *Manual Terrestre de la OIE*. 7a edn, p. 17. Disponible en: http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.01.15_Paratuberculosis.pdf (Acceso: 20 Abril 2018).
- OIE (n. d.) '¿Qué es la paratuberculosis?' Disponible en: http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Media_Center/docs/pdf/Disease_cards/PARATUBERCULOSIS-ES.pdf (Acceso: 28 Abril 2018).
- Ott, S. L., Wells, S. J. & Wagner, B. A. (1999) 'Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations', *Preventive Veterinary Medicine*. Elsevier, 40(3–4), pp. 179–192. doi: 10.1016/S0167-5877(99)00037-9.
- Paraje, M. G. & Tamagnini, L. (2015) '¿Qué son las bacterias viables no cultivables? (revisión literaria)', *Revista de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 2(2), pp. 99–102. Disponible en: <https://revistas.unc.edu.ar/index.php/FCEFYN/article/view/10745/12674> (Acceso: 21 Febrero 2019).
- Park, T. A. *et al.* (2015) 'Diagnóstico molecular de paratuberculosis y tuberculosis bovina por PCR en muestras de sangre de bovinos.', in *XXXIX Congreso Nacional e Internacional de Buiatría*. Puebla, México, pp. 79–86.
- Pavlik, I. *et al.* (1999) *Standardisation of restriction fragment length polymorphism analysis for Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*, *Journal of Methods Microbiological Journal of Microbiological Methods*. Disponible en: www.elsevier.com/locate/jmicmeth...: <http://www.vri.cz/wwwrflptext.htm>. (Acceso: 22 Septiembre 2018).
- Pfyffer, G. E. (2015) 'Mycobacterium: General Characteristics, Laboratory Detection, and Staining Procedures*', en *Manual of Clinical Microbiology, 11th Edition*. American Society of Microbiology, pp. 536–569. doi: 10.1128/9781555817381.ch30.
- Pradenas, M., Kruze, J. & van Schaik, G. (2008) 'Sensibilidad del cultivo de pool fecal para detectar infección por Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis en rebaños bovinos de leche y su relación con la prueba de ELISA', *Archivos de medicina veterinaria*. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, 40(1), pp. 31–37. doi: 10.4067/S0301-732X2008000100004.
- Prieto Martín, A. *et al.* (2013) 'Funciones de los linfocitos B', *Medicine - Programa de*

Formación Médica Continuada Acreditado. Elsevier Doyma, 11(28), pp. 1752–1759. doi: 10.1016/S0304-5412(13)70552-3.

- Radostits, O. M. *et al* (2007) 'Paratuberculosis (Johne's disease)', en *Veterinary Medicine*. 10th edn. España: Saunders Elsevier, pp. 1017–1044.
- Ramírez, V. N. *et al* (2011) *Revista MVZ Córdoba.*, *Revista MVZ Córdoba*. Universidad de Córdoba. Disponible en: <http://www.redalyc.org/html/693/69322399011/> (Acceso: 28 Abril 2018).
- Ramiro-Puig, E. *et al* (2008) 'El intestino: pieza clave del sistema inmunitario', *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 100(1), pp. 29–34. Disponible en: <http://scielo.isciii.es/pdf/diges/v100n1/punto1.pdf> (Acceso: 12 Agosto 2018).
- Rebhun, W. C. *et al* (1995) 'Enfermedad de Johne (paratuberculosis)', en *Enfermedades del Ganado vacuno lechero*. España: Acribia, pp. 270–276.
- Rivas-Santiago, B. & Peñuelas-Rivas, G. (2010) 'Respuesta inmune celular', en Gutierrez-Pabello, J. A. *Inmunología Veterinaria*. México: Editorial El Manual Moderno, pp. 99–116.
- Ruiz-Larrañaga, O. *et al.* (2010) 'Genetic association between bovine NOD2 polymorphisms and infection by Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in Holstein-Friesian cattle', *Animal Genetics*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 41(6), pp. 652–655. doi: 10.1111/j.1365-2052.2010.02055.x.
- Ruiz-Larrañaga, O. *et al.* (2012) 'Single-nucleotide polymorphisms in the bovine CD209 candidate gene for susceptibility to infection by Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis', *Animal Genetics*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 43(5), pp. 646–647. doi: 10.1111/j.1365-2052.2011.02316.x.
- Ruiz Manzano, J. *et al.* (1998) 'Nomenclatura y clasificación de las micobacterias', *Archivos de Bronconeumología*. Elsevier Doyma, 34(3), pp. 154–157. doi: 10.1016/S0300-2896(15)30472-5.
- Sánchez-Saldaña, L. & Anduaga, E. S. (2005) *Antisépticos y desinfectantes, Dermatología Peruana*. Disponible en: http://metabase.uaem.mx/bitstream/handle/123456789/1468/280_4.pdf (Acceso: 24 Junio 2019).
- Sánchez, P. C. & Villa, J. M. M. (2016) 'Sistema inmunitario de la mucosa intestinal', *REDUCA (Biología)*. Ana García Moreno, 8(2), pp. 1–15. Disponible en: <http://www.revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/1264/1885> (Acceso: 26 Octubre 2018).
- Santillán, F. M. A. *et al* (2003) 'Situación epidemiológica de la Paratuberculosis en el ganado bovino lechero en el estado de Guanajuato, México (Datos preliminares).', in *XXXIX Reunión Nacional de Investigación Pecuaria*. FMVZ-UNAM, México., p. 37.

- Sevilla-Agirregomoscorta, I. (2007) *Caracterización molecular, detección y resistencia de Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis*. Universidad del País Vasco. Disponible en: http://www.euskadi.eus/contenidos/documentacion/tesis_doctorales/es_agripes/adjuntos/tesis_doctoral59.pdf.
- Silva-Campa, E. *et al* (2010) 'Procesamiento y presentación de antígenos', en Gutierrez-Pabello, J. A. *Inmunología Veterinaria*. México: Editorial El Manual Moderno, pp. 65–75.
- Singh, S. V. *et al*. (2014). Recent Approaches in Diagnosis and Control of Mycobacterial Infections', *Infectious Diseases of Animals and Global Health)Online*, 2(1), pp. 1–12. doi: 10.14737/journal.aavs/2014/2.1s.1.12.
- Sonawane, G. G. & Tripathi, B. N. (2013) 'Comparison of a quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) with conventional PCR, bacterial culture and ELISA for detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection in sheep showing pathology of Johne's disease', *SpringerPlus*. Nature Publishing Group, 2(1), p. 45. doi: 10.1186/2193-1801-2-45.
- Sosa-Martínez, L. E. *et al* (2018) 'Seroprevalence of paratuberculosis in goat and bovine cattle of the state of San Luis Potosí, México.', en *14th International Colloquium on Paratuberculosis*. Riviera Maya, México, p. 61.
- Soto, J. P. *et al* (2002) 'Aislamiento de Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis de fecas en rebaños lecheros infectados mediante el Método de Cornell modificado', *Archivos de medicina veterinaria*. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, 34(2), pp. 275–282. doi: 10.4067/S0301-732X2002000200013.
- Sweeney, R. W. (2011) 'Pathogenesis of Paratuberculosis', *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. Elsevier, 27(3), pp. 537–546. doi: 10.1016/J.CVFA.2011.07.001.
- Thorel, M. F. *et al* (1990) 'Numerical Taxonomy of Mycobactin-Dependent Mycobacteria, Emended Description of Mycobacterium avium, and Description of Mycobacterium avium subsp. avium subsp. nov., Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis subsp. nov., and Mycobacterium avium subsp. s', *International Journal of Systematic Bacteriology*. Microbiology Society, 40(3), pp. 254–260. doi: 10.1099/00207713-40-3-254.
- Tizard, I. R. (2009a) 'El Sistema del Complemento', en *Introducción a la Inmunología Veterinaria*. 8th edn. Texas: Elsevier, pp. 57–69.
- Tizard, I. R. (2009b) 'Técnicas de inmunodiagnóstico', en *Introducción a la Inmunología Veterinaria*. 8th edn. Texas: Elsevier, pp. 509–527.
- Triccas, J. A. *et al*. (1998) *Molecular and Immunological Analyses of the Mycobacterium avium Homolog of the Immunodominant Mycobacterium leprae 35-Kilodalton Protein Downloaded from, INFECTION AND IMMUNITY*. Disponible en:

<http://iai.asm.org/> (Acceso: 25 Septiembre 2018).

- Tripathi, B. N. *et al.* (2006) 'Comparison of IS900 tissue PCR, bacterial culture, johnin and serological tests for diagnosis of naturally occurring paratuberculosis in goats', *Veterinary Microbiology*. Elsevier, 116(1–3), pp. 129–137. doi: 10.1016/J.VETMIC.2006.03.017.
- Valentin-Weigand, P. & Goethe, R. (1999) *Pathogenesis of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis infections in ruminants: still more questions than answers*. Disponible en: https://ac.els-cdn.com/S1286457999002038/1-s2.0-S1286457999002038-main.pdf?_tid=1eaece81-b257-4170-8fa6-4897352ea382&acdnat=1537254406_e90384c09d1840bd9c7689b445162cf9 (Acceso: 18 Septiembre 2018).
- Vázquez, P. *et al.* (2014) 'Genetic association analysis of paratuberculosis forms in holstein-friesian cattle.', *Veterinary medicine international*. Hindawi Limited, 2014, p. 321327. doi: 10.1155/2014/321327.
- Vega-López, F & Macotela-Ruíz, E. (1991) 'Importancia de los antígenos protéicos de Mycobacterium leprae. Uso potencial para el desarrollo de una vacuna contra la lepra', *Gaceta Médica de México*, 127(1), pp. 31–40. Disponible en: https://www.anmm.org.mx/bgmm/1864_2007/1991-127-1-31-40.pdf.
- de Ward, J. H. (2005) 'Tuberculosis Bovina', en González-Satagnaro, C. & Soto-Belloso, E. *Manual de Ganadería Doble Propósito*. Maracaibo, Venezuela: Astro Data, S.A., pp. 364–369. Disponible en: http://avpa.ula.ve/docuPDFs/libros_online/manual-ganaderia/seccion5/articulo14-s5.pdf.
- Waters, W. R. *et al.* (2003) 'Early induction of humoral and cellular immune responses during experimental Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection of calves.', *Infection and immunity*. American Society for Microbiology Journals, 71(9), pp. 5130–8. doi: 10.1128/iai.71.9.5130-5138.2003.
- Whipple, D. L., Callihan, D. R. & Jarnagin, J. L. (1991) *Cultivation of Mycobacterium paratuberculosis from bovine fecal specimens and a suggested standardized procedure*, *J Vet Diagn Invest*. Disponible en: <http://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/104063879100300424> (Acceso: 6 Noviembre 2018).
- Whitlock, R. . *et al.* (2000) 'ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method', *Veterinary Microbiology*. Elsevier, 77(3–4), pp. 387–398. doi: 10.1016/S0378-1135(00)00324-2.
- Whitlock, R. H. & Buergelt, C. (1996) 'Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology).', *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*. Elsevier, 12(2), pp. 345–56. doi: 10.1016/S0749-0720(15)30410-2.
- Whittington, R. J. *et al* (2001) 'Typing of IS 1311 polymorphisms confirms that bison (Bison

bison) with paratuberculosis in Montana are infected with a strain of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* distinct from that occurring in cattle and other domesticated livestock', *Molecular and Cellular Probes*. Academic Press, 15(3), pp. 139–145. doi: 10.1006/MCPR.2001.0346.

Whittington, R. J. & Windsor, P. A. (2009) 'In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: A critical review and meta-analysis', *The Veterinary Journal*. W.B. Saunders, 179(1), pp. 60–69. doi: 10.1016/J.TVJL.2007.08.023.

10. - Anexos.

Anexo I. - ELISA P35 indirecto.

Preparar 30 mL de antígeno (fago recombinante P35) con una concentración final de 20 µg/mL: colocar en un tubo 7.05 mL de antígeno y 22.95mL de solución tampón de carbonato con pH de 9.6.

Sensibilización de placas: colocar 100 µL de proteína P35 en cada pozo, tapar la placa y dejar reposar toda la noche a temperatura ambiente (TA). Posteriormente lavar la placa 3 veces con 200 µL/pozo de PBS-Tween 20 al 0.1%

Bloqueo de placas: agregar 150 µL de PBS-Gelatina al 1%, incubar 1.5 hrs a TA y lavar la placa 3 veces con 200 µL/pozo de PBS-Tween 20 al 0.1%. Conservar las placas a -20°C hasta su uso.

Diluir 1/1600 en PBS la muestra de plasma y de los controles positivos y negativos a PTB utilizados para el estudio, colocar 100 µL de la dilución por pozo; 2 pozos por muestra. En los pozos control agregar 100µL de PBS. Incubar 1.5 hrs a TA. Lavar la placa 3 veces con 200 µL/pozo de PBS-Tween 20 al 0.1%

Diluir el anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano (anti-IgG de cabra [1.5 mg/mL] conjugado con peroxidasa de rábano, Invitrogen) 1/1000 en PBS. Colocar 100 μ L/pozo del anticuerpo conjugado diluido, dejar reposar por 1.5 hrs. Lavar la placa 3 veces con 200 μ L/pozo de PBS-Tween 20 al 0.1%. Lavar la placa nuevamente 2 veces con 200 μ L de PBS. Entre cada lavado dejar reposar 2 minutos cada vez que se agregue el PBS-Tween 20 al 0.1% y el PBS.

Revelado: agregar 100 μ L/pozo de solución de revelado. Se realiza la lectura del valor de absorbancia en un espectrofotómetro luego de los 40 minutos de incubación.

Para la interpretación de de la prueba se debe obtener un promedio de las DO de cada muestra, serán positivas aquellas que tengan un promedio del valor de absorbancia igual o mayor a 0.639.

I.I. – Soución PBS 10x.

Para preparar 1 L.

- 80.0 g de Cloruro de sodio.
- 2 g de Cloruro de potasio.
- 14.4 g de Fosfato dibásico de sodio.

- 2.4 g de Fosfato monobásico de potasio.
- Agua destilada

Ajustar pH a 7.4 y esterilizar en autoclave (121°C por 15 min).

I.II. – Solución PBS 1x (a partir de solución PBS 10x).

Para preparar 1 L.

- 100 mL de Solución PBS 10x
- 900 mL de Agua destilada

I.III. – Solución amortiguadora de carbonato.

- 0.53 g de Bicarbonato de sódico.
- 100 mL de Agua destilada.

Ajustar pH a 9.6

I.IV. – Tween 20 al 0.1%

Para preparar 1 L.

- 100 mL de Solución PBS 10x
- 900 mL de Agua destilada
- 1 mL de Tween 20

I.V. – Gelatina al 1%

- 170 mL de Solución PBS 1x
- 1.7 g de Gelatina bacteriológica.

I.VI. – Solución de Revelado.

Solución A

- 22.97 g de Ácido cítrico
- 1000 mL de Agua destilada

Solución B

- 29.41 g de Citrato sódico
- 1000 mL de Agua destilada

Solución amortiguadora de citrato 0.05M

- 600 mL de Solución A
- 479 mL de Solución B
- Agua destilada c.b.p. 2000 mL.

Homogeneizar y ajustar el pH a 4.

Solución 1/25 de H₂O₂

- 10 µL de H₂O₂
- 120 µL de Agua destilada

En 50 mL de Solución amortiguadora de citrato 0.05M con pH de 4, agregar 5.48 mg de ABTS y 38 µL de Solución 1/25 de H₂O₂. Homogeinizar.

Anexo II. – Descontaminación de las muestras.

Cloruro de decilpiridinium (HPC) al 0.75%.

- 1,000 mL de agua destilada.
- 7.5 g de cloruro de decilpiridinium.

Disolver y esterilizar.

Colocar 2g de muestra en un tubo tipo Falcon ®, aforar a 50 mL con el HPC

Mezclar y dejar reposar por 24 h en posición vertical.

Anexo III. – Frotis fecal.

Trazar en un portaobjetos un cuadrado de 1 cm².

Con una pipeta tipo Pasteur tomar muestra de la interfase formada en el tubo tipo Falcon ®, teniendo cuidado de no tomar sedimento.

Colocar una gota de muestra, dentro del cuadrado.

Dejar secar y posteriormente fijar el frotis con calor, cortando la llama 3 veces con el portaobjetos.

Anexo IV. - Método de tinción ZN.

Método descrito en el Manual de Diagnóstico de Micobacterias de importancia en Medicina Veterinaria (2005), con modificaciones realizadas en USEDICO.

- Fucsina fenicada en solución acuosa al 1%.
- Alcohol-ácido (para 100 mL).
97 mL de alcohol al 96%.
3 mL de ácido clorhídrico.
- Azul de metileno en solución acuosa al 1%.

Colocar el portaobjetos con el frotis previamente fijado en fucsina fenicada en solución acuosa al 1% durante 1 hora. Después de este tiempo enjuagar sumergiéndolo en agua destilada hasta lograr quitar el excedente de colorante.

Colocar el portaobjetos en alcohol-ácido durante cinco minutos. Una vez finalizado el tiempo enjuagar sumergiéndolo en agua destilada hasta lograr quitar el excedente de alcohol ácido.

Meter en una sola ocasión el portaobjetos en azul de metileno en solución acuosa al 1%. Enjuagar sumergiendo el portaobjetos en agua destilada hasta lograr quitar el excedente de colorante.

Enjuagar a chorro de agua corriente hasta que ésta salga limpia. Dejar secar.

Colocar una gota de resina para montaje y poner sobre la muestra un cubreobjetos. Dejar secar.

Al observar en el microscopio se considerarán positivos aquellos en los que sean observados BAAR (0.5-1.5 μm), será un resultado dudoso cuando los bacilos se encuentren aislados (OIE, 2012).

Anexo V. – Cultivo fecal.

V.I. – Medio Herrold.

Ingredientes para preparar 1 L de medio.

- 9 g de Peptona.
- 4.5 g de Cloruro de sodio.
- 15.3 g de Agar bacteriológico.
- 2.7 g de Extracto de carne.
- 27 mL de Glicerina.
- 4 g de Piruvato de sodio.
- 600 mL de agua destilada.
- 350 mL de yemas de huevo (aproximadamente 10 yemas)
- 2 mg de micobactina J, disuelta en 4 mL de etanol puro.

- 5 mL de Verde malaquita al 2%
- 50 mg/mL de Anfotericina B.
- 100 mg/mL de Nistatina
- 50 mg/mL de Ácido nalidíxico.
- 40 mg/mL de Vancomicina.

Colocar el agua en un matraz, llevarlo a una platina caliente con agitación. Añadir la glicerina, la peptona, el cloruro de sodio, el extracto de carne, el agar bacteriológico y el piruvato de sodio. Dejar que hierva 1 min.

Dejar los huevos en etanol al 70% media hora antes de agregarlos al medio, para desinfectarlos.

Esterilizar el medio preparado en autoclave (121°C por 15 min), posteriormente dejar que la temperatura baje a 50° C.

Una vez que la temperatura del medio se encuentre a 50° C, añadir las yemas de huevo previamente mezcladas en licuadora estéril, posteriormente añadir los antibióticos y el verde de malaquita. Fraccionar el medio en dos partes, a una parte añadir la micobactina J.

Colocar de 8 a 10 mL de medio en tubos de cristal con rosca estériles, identificar los tubos que tengan medio enriquecido con micobactina J.

Dejar inclinados hasta que coagulen.

Identificar con siglas: HEYMP para tubos conteniendo medio enriquecido con micobactina J, y HEYP para tubos conteniendo medio sin micobactina J. Adicionalmente colocar la fecha de elaboración.

Conservar en refrigeración a 4° C, hasta ser utilizados.

V.II. – Medio Löwenstein - Jensen.

Ingredientes para preparar 1 L de medio:

- 37.2 g de medio base.
- 8 mL de glicerina.
- 390 mL de agua destilada.
- 600 mL de huevo (aproximadamente 12 piezas).
- 2 mg de micobactina J, disuelta en 4 mL de etanol absoluto.
- 200,000 UI de Penicilina.
- 50 mg/mL de Anfotericina B.

- 100 mg/mL de Cloranfenicol.

Colocar el agua en un matraz y llevarlo a una platica caliente con agitación, añadir la glicerina y el medio base. Dejar que hierva por 1 min.

Dejar los huevos en etanol al 70% media hora antes de agregarlos al medio, para desinfectarlos.

Esterilizar el medio preparado en autoclave (121°C por 15min), posteriormente dejar que la temperatura baje a 50° C.

Una vez que la temperatura del medio se encuentre a 50° C, añadir las yemas de huevo previamente mezcladas en licuadora estéril, posteriormente añadir los antibióticos Fraccionar la mezcla en dos partes, a una parte añadir la micobactina J.

Colocar de 8 a 10 mL de medio en tubos de cristal con rosca estériles, identificar con una marca los tubos con medio enriquecido con micobactina J.

Introducir los tubos con medio al horno seco, a 85° C por 2 horas, para que coagulen.

Identificar con siglas: LJM para tubos conteniendo medio enriquecido con micobactina J, y LJ para tubos conteniendo medio sin micobactina J. Adicionalmente también colocar la fecha de elaboración del medio.

Conservar en refrigeración a 4° C, hasta ser utilizados.

V.III. – Elaboración de cultivo fecal.

Encender el mechero en el área donde se va a trabajar, para crear un ambiente de esterilidad.

Con un pipeta tipo Pasteur, tomar muestra de la interfase formada en el tubo tipo Facon ®.

Colocar de 8 a 10 gotas de muestra en tubos con medio: 2 tubos conteniendo medio enriquecido con micobactina J, y 1 tubo conteniendo medio sin micobactina J.

Identificar los tubos y colocarlos en estufa bacteriológica a 37° C, dejar en posición inclinada con la tapa sin apretar durante 2 semanas, posteriormente cerrar perfectamente y colocar en posición vertical.

Posterior a las 4 semanas, hacer la revisión de manera semanal.

Anexo VI. -PCR IS900.

VI.I. – Extracción de ADN a partir de heces.

Protocolo de extracción para ADN genómico de MAP en muestras de heces mediante choque térmico, descrito por Garrido *et al.* (2000).

Tomar 1 ml de la interfase de las muestras de heces, centrifugar a 2,500 rpm/10 min para la formación de una pastilla. Desechar el sobrenadante.

Realizar 3 lavados con 1 mL de PBS 1X, a 2,500 rpm por 10 min.

Pasar la pastilla obtenida a un criotubo de tapa de rosca y colocar en nitrógeno líquido durante 5 min, posteriormente incubar a 100°C en horno de calor

seco por 5 min. Realizar 3 veces el procedimiento de incubación alternada en nitrógeno líquido y en el horno.

Posteriormente se empleó un estuche comercial QIAmp® Fast DNA stool Mini Kit de la marca Qiagen®, conforme indica el siguiente protocolo:

Luego de sacar la muestra del horno, centrifugar a 14,000 rpm durante 5 min.

En un vial nuevo de 1.5 mL, colocar 15 µL de proteinasa K, añadir 200 µL de la muestra centrifugada y luego agregar 200 µL de solución AL. Mezclar en homogenizador eléctrico por 15 s.

Incubar a 70 °C por 10 min.

Añadir 200 µL de etanol al 100%. Mezclar con homogenizador eléctrico.

Transferir 600 µL del vial a una columna QIAamp®, centrifugar a 14,000 rpm durante 1 min. Colocar la columna en un vial de 2 mL, nuevo. Descartar el tubo de recolección con el filtrado y colocar un tubo nuevo.

Abrir cuidadosamente la columna y añadir 500 μL de solución AW1, Centrifugar a 14,000 rpm durante 1 min. Colocar la columna en un vial de 2 mL, nuevo. Descartar el tubo de recolección.

Abrir cuidadosamente la columna y añadir 500 μL de solución AW2, Centrifugar a 14,000 rpm durante 3 min. Colocar la columna en un tubo de 2 mL nuevo. Descartar el tubo de recolección.

Centrifugar la columna a 14,000 durante 3 min. Transferir la columna a un vial de 1.5 mL nuevo, añadir 50 μL de solución ATE directamente a la membrana QIAamp®. Incubar por 1 min a TA, luego centrifugar a 14,000 rpm durante 1 minuto.

VI.II. – PCR IS900 (López-Yurame, 2014).

Colocar en un microtubo 36 μL de agua bidestilada estéril, 2 μL de solución amortiguadora 10x, 4 μL de desoxinucleótidos 200 Mm, 1 μL de iniciador P3N (5'-GGG TGT GGC GTT TTC CTT CG-3'), 1 μL del iniciador P5N (5'-ATT TCG CCG CCA CCG CCA CG-3'). 1 μL de enzima Taq polimerasa (2 unidades/ μL) y 5 μL de ADN genómico (1 μg).

Introducir el microtubo en el termociclador. Condiciones:

- 1 ciclo a 94°C 4 min.
- 30 ciclos a 94°C 40 s.
- 30 ciclos a 55°C 50 s.
- 30 ciclos a 72 °C 40 s.
- 1 ciclo a 72°C 1 min.

VI.III. - Electroforesis

Colocar en un gel de agarosa al 1.5% 15 μ L de muestra con 3 μ L de colorante y 7 μ L de Marcador de peso molecular 100pb.

Posteriormente colocar el gel en bromuro de etidio por 10 minutos, para teñirlo.

Para su observación, colocar el gel teñido en un transiluminador UV.

VI.IV. – Gel de agarosa.

Ingredientes para 100 mL:

- 100 mL de TAE 1X
- 1.5 g de gel de agarosa.

VI.V. – Bromuro de etidio.

Ingredientes para 50 mL:

- 50 mL de agua destilada
- 1 gota de bromuro de etidio (0.40 $\mu\text{L}/\text{mL}$; concentración final: 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Anexo VII. – Acotaciones de los planos.

Clave	Nombre	No. de divisiones
CA	Complejo Acadadémico	

AA	Área Agrícola	
1	Arco	SD
2	Side Roll 1	SD
3	Side roll 2	SD
4	Triángulo	SD
5	Trapecio	SD
6	Pozo	5
7	Capilla	6
8	Alfalfar ejido	8
9	Pivote grande	16
	Esquinas	4
10	Pivote chico	16
	Esquinas	4
11	Eucaliptos	SD
12	Jardin introducción	SD
13	Bordo	8
14	Chabacanos	9
15	Alfalfar camino 1	12
16	Alfalfar camino 2	7
17	Venados	10
18	Kiosko	SD
19	Ordeños-Taller de Lácteos	SD
20	Madrileña	SD

LP	La Presa	
21	La Terraza	SD
22	Alfalfar presa	SD
23	La Franja	SD
24	Pradera presa	SD
25	Cultivo estacional 1	SD
26	Agostadero de riego	SD
27	Pozo 4	SD
28	Cultivo estacional 2	SD
29	Agostadero de temporal	SD

SD: Sin divisiones

Pozos	
I	Pozo 1
II	Pozo 2
III	Pozo 3
IV	Pozo 4