Universidad Autónoma de Sinaloa

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Maestría en Ciencias Agropecuarias

IDENTIFICACIÓN DE *Mycobacterium avium sub. esp. paratuberculosis* EN OVINOS DE CULIACÁN, SINALOA"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRESENTA:

Ramón Antonio Cuén Beltrán

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. Soila Maribel Gaxiola Camacho

CO-DIRECTORA DE TESIS:

DRA. Idalia Enríquez Verdugo

ASESORES DE TESIS:

MC. Silvia del Carmen Cota Guajardo

MC. Nohemí Castro Del Campo

MC. Héctor Manuel López Perez

Febrero 2012.

DR. JAVIER ALONSO ROMO RUBIO
DIRECTOR
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SINALOA
PRESENTE.-

Los abajo firmantes, miembros del Jurado de Grado, hacemos constar que la Tesis:

"Identificación de *Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis* en ovinos de Culiacán, Sinaloa"

Presentada como requisito parcial para obtener el Grado de Maestro en Ciencias Agropecuarias por el:

C. RAMÓN ANTONIO CUÉN BELTRÁN

Ha sido revisada y considerando que cumple con los requisitos necesarios, se otorga el VOTO APROBATORIO, para ser impresa y defendida en el Examen de Grado en la fecha que la Universidad asigne para ello.

Atentamente

Culiacán, Sinaloa; a 30 de Enero de 2012

MC. Silvia del Carmen Cota Guajardo
Presidenta

MC. Nohemí Casto del Campo
Secretaria

Dra. Soila Maribel Gaxiola Camacho
Primer Vocal

Dra. Idalia Enríquez Verdugo
Segundo Vocal

DEDICATORIA

A mis padres, Luz Berthila y Ramón Antonio por darme la vida, apoyarme en todo momento, por enseñarme a luchar por lo que quiero y a trabajar para conseguirlo, gracias Mamá por estar a mi lado y darme su cariño, gracias Papá por guiarme desde el cielo y por sembrar en mi el gusto y el respeto hacia los animales.

A mi esposa Sandra Liz por darme tu amor, comprensión y apoyo en todas las decisiones de mi vida y por darme el mejor regalo del mundo nuestro hijo, te amo "chaparra".

A mi hijo Ramón Antonio por ser el motivo principal que me impulsa a seguir adelante y no cansarme jamás hasta lograr mis metas para poderte ofrecer un futuro mejor, te amo "güerejo" eres lo más hermoso que me ha pasado en la vida.

A mis hermanas Dayanara Lizbeth y Cecilt por estar a mi lado en las buenas y en las malas, las quiero.

A mi abuelita Alicia por estar siempre al tanto de mí y orar para que siempre salgan las cosas lo mejor posible, con nada le pago sus consejos y todo el amor que me ha dado.

A mi Mitzuky que fue mi inspiración para ser MVZ y por ser fiel compañera por 11 años y mi William que es mi leal guardián y por recordarme diariamente mi compromiso con los animales.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme cumplir una meta más en mi vida

A la Dra. Soila Maribel Gaxiola Camacho por su amistad, por creer en mí, por trasmitirme sus conocimientos, por su confianza, por la oportunidad que me brindó de crecer profesionalmente y por su apoyo en todas las fases de mi formación.

A la Dra. Idalia Enríquez Verdugo por trasmitirme sus conocimientos, por su paciencia, por su comprensión y ayudarme en todo momento a la elaboración de esta tesis.

Al MC. Héctor López por su amistad y su ayuda durante la realización de esta tesis, además de su paciencia y consejos durante esta etapa.

A la MC. Nohemí Castro Del Campo por sus enseñanzas, su amistad y por la ayuda a la realización de esta tesis.

Al MVZ Esp. Isabel Quintero Osuna por brindarme su amistad, las facilidades y el apoyo para la realización de este proyecto

Al Dr. Germán Contreras Pérez por ayudarme a resolver mis dudas durante la realización de este proyecto.

A CONACYT y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por darme la oportunidad y las facilidades de estudiar un posgrado.

A todos los maestros que contribuyeron a mi formación durante este posgrado.

A todo el personal del laboratorio de parasitología por estar siempre apoyándome y dándome ánimos para seguir adelante en especial a la MC. Silvia del Carmen Cota Guajardo, MVZ Claudia Leonor Barraza Tizoc y MVZ Jesús Daniel Solís Carrasco.

A todos los compañeros de maestría y estudiantes de licenciatura que me brindaron su amistad y su ayuda desinteresadamente, Vladi, Heribier, Cheche, Camacho, Cesar, Silvia, Brity, Franklyn, Xochilt, Marina, Pimpón, Alberto, Marlie, Cristian, Nayeli, Dulceana, Monique, Mar, Miguel Ángel, Brodi, Bere, Lidia, Vero, Melissa, Xitlalic y Anita.

A todo el personal administrativo de la FMVZ que estuvieron siempre para brindarme su amistad y ayuda durante todo este tiempo, especialmente a Ma. Fernanda Medina Zazueta, Daniela Gonzales Morales y Janet Gamboa Figueroa.

CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE CUADROS	Vi
ÍNDICE DE FIGURAS	Vii
RESUMEN	Viii
ABSTRACT	Ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
2.1. Definición de la Enfermedad y Signos Clínicos	2
2.2. Lesiones	2
2.3. Transmisión y Diseminación	3
2.4. Epidemiología y Distribución	3
2.5. Importancia	6
2.6. Diagnóstico	7
2.6.1. Aislamiento	7
2.6.2. Serología	7
2.6.3. Johnina	8
2.6.4. PCR	8
III. HIPÓTESIS	10
IV. OBJETIVOS	11
4.1. Objetivo general	11
4.2. Objetivos específicos	11
V. MATERIALES Y MÉTODOS	12
5.1. Ubicación	12
5.2. Muestreo	12
5.2.1. Tamaño de la muestra	12
5.2.2. Obtención de Muestras	12
5.3. Obtención de sueros sanguineos	13
5.4. Diagnóstico serológico por ELISA	13
5.5. Análisis de los datos	14
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15

VII. CONCLUSIONES..... 18
VIII. REFERENCIAS..... 19
IX. ANEXOS..... 24

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Título	Página
1	Numero de muestra positivo a *MAP*, valores de densidad óptica mostrados por cada muestra y resultados presentados en porcentaje por arriba del punto de corte.....	14
2	Ovinos positivos a Paratuberculosis por ELISA en explotaciones de Culiacán, Sinaloa.....	15
3	Seroprevalencia de Paratuberculosis por explotación muestreada.....	15
4	Porcentaje de ovinos seropositivos a Paratuberculosis sintomáticos y asintomáticos.....	16
5	Número de animales muestreados por Explotación.....	24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Figura 1. Colocación de sueros prediluidos en microplaca revestidos con antígenos de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* para prueba de ELISA.....	24
2	Adición de reactivos a microplaca para diagnóstico de Paratuberculosis ovina por ELISA.....	25
3	Reacción de sueros sanguíneos después de la adicion de reactivos en prueba de ELISA para diagnóstico de Paratuberculosis. (Pocillos A y B corresponden los controles positivos de la prueba, pocillos C y D corresponden a los controles negativos de la prueba).....	25
4	Densidades ópticas de las muestras procesadas por prueba de ELISA observadas a 450 nm en espectrofotómetro.....	26

RESUMEN

IDENTIFICACIÓN DE *Mycobacterium avium sub. esp. paratuberculosis* EN OVINOS DE CULIACÁN, SINALOA

Ramón Antonio Cuén Beltrán

Con el objetivo de detectar la presencia de *Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis* (MAP), causante de la Paratuberculosis o enfermedad de Johne en ovinos, se realizó un estudio observacional. Se diagnosticó a los animales infectados mediante inmunoensayo enzimático (ELISA), las muestras fueron obtenidas de 381 animales de explotaciones ovinas pertenecientes al municipio de Culiacán, Sinaloa. Los resultados permitieron diagnosticar la existencia de infección por *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP) existiendo un 2.6% de seropositividad. La técnica de ELISA permitió identificar la presencia de MAP, lo que demuestra su potencial como prueba primaria de diagnóstico en el establecimiento de futuros programas de control.

Palabras clave: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, enfermedad de Johne, técnica de inmunoensayo enzimático, ovinos.

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF *Mycobacterium avium sub. esp. paratuberculosis* IN OVINES FROM CULIACÁN, SINALOA.

Ramón Antonio Cuén Beltrán

With the purpose of detecting the presence of *Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis* (MAP), responsible for causing paratuberculosis or Johne disease in ovines, an observational experiment was conducted. The infected animals were diagnosed through Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), the samples were obtained from 381 ovine productions animals from the city of Culiacán, IN Sinaloa State. The results allowed to diagnose the existence of infection by *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP) with a 2.6% seropositivity. The ELISA technique allowed identifying the presence of MAP, which demostrates its potential as a primary diagnosis test in the establishment of future control programs.

Key words: *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*, Johne disease, enzyme-linked immunosorbent assay, ovines.

I. INTRODUCCIÓN

La Paratuberculosis o enfermedad de Johne, es una enfermedad infecciosa crónica, que afecta a rumiantes domésticos y salvajes, causada por el bacilo aerobio *Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis* (*Map*) (Alfaro, *et al. 2006),* la enfermedad se manifiesta como diarrea crónica y pérdida de peso después de un prolongado periodo de incubación que puede ser de 2 a 5 años (Palmer, *et al.* 2005), un amplio rango de especies animales son susceptibles a la infección (Holzmann, *et al.* 2004), *Map* ha sido vinculado en humanos con una inflamación crónica del intestino, denominada enfermedad de Crohn (Cirone, *et al.* 2007). Entre los rumiantes, las infecciones son más comunes en el ganado lechero, aproximadamente el 20-50% de los rebaños están infectados en muchos países productores de leche (OIE, 2007). Esta enfermedad se encuentra distribuida en el ámbito mundial (Chávez, *et al.*, 2004), la pérdida económica en Europa debido a muertes de ovejas por paratuberculosis va desde 24 hasta 94 euros por oveja, en los hatos de carne, las pérdidas por los animales suelen ser considerablemente más bajos (Barkema, *et al.*, 2010). En México la paratuberculosis puede ser diagnosticada mediante aislamiento, serología (Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas, ELISA por sus siglas en inglés) (Jaimes, *et al.*, 2008), aunque esta no se diagnostica en la mayoría de los casos o su diagnóstico no se realiza adecuadamente (Romo, *et al.*, 2010)[a]. Si bien la especificidad del cultivo es de 100%, la sensibilidad es menor a 50% (Jaimes, *et al.*, 2008), la prueba de ELISA tiene una especificidad del 99% y una sensibilidad del 60% (Alfaro, *et al.*, 2006). El objetivo de este trabajo fue detectar la presencia de *Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis* en ovinos de Culiacán, Sinaloa.

II. ANTECEDENTES

2.1. Definición de la Enfermedad y Signos Clínicos. *Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis* es una bacteria intracelular facultativa (Sevilla, 2007) y un patógeno obligado, porque solamente se multiplica en el huésped susceptible (Holzmann, *et al.*, 2004), actualmente se encuentra clasificado dentro del complejo *Mycobacterium avium-intracellulare, M. avium subespecie avium, M. avium subsp. silvaticum, M. avium subsp. paratuberculosis, M. intracelullare* (Jaimes, *et al.*, 2008). La bacteria es resistente a la refrigeración y a desinfectantes suaves, es de suma importancia resaltar la supervivencia del agente, ya que puede sobrevivir hasta 9 meses en charcos y es resistente a la exposición solar (Romo, *et al.*, 2010)[b]. La enfermedad se manifiesta como diarrea crónica y pérdida de peso, después de un prolongado periodo de incubación que puede ser de 2 a 5 años (Palmer, *et al.*, 2005), sin embargo se han reportado periodos que van desde 4 meses a 15 años (OIE, 2007), además los animales enfermos pueden presentar edema submandibular y desmejoramiento corporal progresivo finalizando con la vida del animal. La enfermedad se manifiesta a la edad adulta, sobre todo en las proximidades del parto; es menos frecuente a edades menores y muy raramente se presenta alrededor del año de vida, a su vez existen también portadores asintomáticos considerados como infectados subclínicamente. En los pequeños rumiantes domésticos la Paratuberculosis además también se manifiesta con debilitamiento y pérdida de peso, sin observarse diarrea hasta en la fase final de la enfermedad (Cirone, *et al.* 2007).

2.2. Lesiones. La Paratuberculosis se manifiesta en los ovinos como una enteritis granulomatosa, las lesiones que produce, son localizadas en la mucosa del ileon, válvula ileocecal, ciego, colon proximal y linfonodos mesentéricos, desarrollan hipertrofia difusa de la mucosa del yeyuno e ileon, que adquieren una apariencia rugosa, lo que ocasiona mala absorción de los nutrimentos (Jaimes, *et al.*, 2008), a la necropsia se puede apreciar falta importante de depósitos grasos que pueden mostrar atrofia de la serosa y de la masa muscular, formación de edemas, ascitis y acumulación de liquidos en otras cavidades (Sevilla, 2007). En ovinos y caprinos

una lesión frecuente y característica es la dilatación e inflamación de los vasos linfáticos intestinales, haciendo que estos sean prominentes en la serosa del intestino y en el mesenterio (Juste, *et al.*, 2000).

2.3. Transmisión y diseminación. La principal vía de transmisión de la enfermedad es la oro-fecal (Magnning y Collins, 2010). En condiciones de campo, la enfermedad se transmite por la ingestión de alimentos y agua contaminados por las heces de animales infectados, éstos son la principal fuente de infección para el rebaño (Jaimes, *et al.*, 2008), la infección es adquirida por los animales más jóvenes en los primeros días de vida al ingerir las heces fecales cargadas de micobacterias de sus madres u otros adultos que pueden manchar las ubres de las que se amamantan (Juste, *et al.*, 2000). La excreción del bacilo es de forma intermitente, así como existen animales que eliminan grandes cantidades de bacilos por heces, otros animales son excretores esporádicos (Jaimes, *et al.*, 2008), existen otras vías de transmisión como la uterina y la venérea aunque han sido demostradas ocasionalmente (Juste, *et al.*, 2000).

La entrada de *Map* en el organismo está mediada por las células epiteliales de la mucosa, que recubren las cúpulas de las placas de Peyer del íleon y yeyuno, al parecer también los enterocitos del yeyuno no asociados a placas de Peyer son vía de entrada para los bacilos, al menos en cabras. Una vez dentro del organismo el patógeno traspasa las barreras de la mucosa por endocitosis, los fagocitos infectados, diseminan las micobacterias por otras partes del cuerpo al ser transportados en los vasos sanguíneos y linfáticos (Sevilla, 2007); durante el transcurso de esta patología, *Map* puede parasitar las células inmunorreguladoras en el intestino de pacientes con susceptibilidad adquirida o heredada, lo que resultaría en una inmunodepresión del revestimiento de la mucosa del intestino y la aparición de signos (Cirone, *et al.*, 2007).

2.4. Epidemiología y distribución. Existe un amplio rango de especies animales que son susceptibles a la infección, entre los rumiantes, la paratuberculosis es la enfermedad más común del ganado lechero y está relacionada con las medidas

de manejo aplicadas en esa clase de explotación. La existencia e importancia de los reservorios silvestres aún no han sido determinadas, aunque se han registrado infecciones naturales en animales no rumiantes: caballos, cerdos, conejos, zorros, armiños, comadrejas, aves carroñeras, roedores, primates, y en el hombre (Holzmann, *et al.*, 2004).

La epidemiologia de la enfermedad está ligada a las características biológicas del microorganismo, siendo de lento desarrollo, parasitismo obligado, alta resistencia ambiental, posibilidad de infección congénita y transmisión a través de la leche (Cirone, *et al.*, 2007). El intento por controlar la enfermedad de Johne mediante la vacunación, la quimioprofilaxis y el diagnóstico ha demostrado ser extremadamente difícil, sobre todo debido al largo periodo de incubación y que los animales muestran signos cuando la enfermedad es crónica, aunque la infección no siempre acaba manifestándose clinicamente (Juste, *et al.*, 2000), aun así se han establecido programas de control en países como Australia, Noruega, Islandia, Japón, Países Bajos y Estados Unidos (OIE, 2007).

Existen evidencias clínicas y experimentales que relacionan a *Map* con la enfermedad de Crohn en el humano la cual provoca una inflamación crónica del intestino, su presencia se ha confirmado mediante PCR y por aislamiento en cultivo a partir de biopsias de órganos, de leche materna y de sangre de pacientes afectados. La leche y sus subproductos serían posibles fuentes de infección y se ha sugerido que esta bacteria resiste las condiciones de pasteurización. Diversos trabajos de investigación demostraron que esta micobacteria podria estar presente en leches comercializadas en diversos paises, como Reino Unido, Estados Unidos, República Checa y en Argentina (Cirone, *et al.* 2007).

No existen muchos datos aún sobre tasas de prevalencia de esta enfermedad en los distintos países del mundo (Cirone, *et al.*, 2007), la incidencia de la Paratuberculosis en todo el mundo parece estar aumentando. Entre los rumiantes aproximadamente del 20 al 50% de los rebaños están infectados en muchos países productores de leche (OIE, 2007), sin embargo su ocurrencia es mundial con tasas de prevalencia que oscilan entre un 7% y un 55% en Europa (Sánchez-Villalobos, *et al.*, 2009 y Castrellón, *et al.*, 2010), Noruega y Suecia informan que

su ganado está libre de la infección por *Map*, aun así los casos positivos se han notificado en ambos países (Barkema, et al., 2010), en Estados Unidos, la tasa de infección del hato para ganado lechero ha sido encontrado como un 24.2% en el medio oeste, el 23.5% en el oeste, el 17.2% en el suroeste y el 16.1% en el noroeste, la prevalencia en ese mismo País parece ser menor en el ganado vacuno productor de carne; 8% presentaron la infección, de esta forma, la tasa de positividad guarda una estrecha correlación con el tamaño del rebaño (OIE, 2007); en Australia, las tasas de infección declarada fluctúan entre un 9 y un 22%, Latinoamérica no escapa a la problemática, aunque no dispone de caracterización epidemiológica, cifras oficiales, ni programas de control (Sánchez-Villalobos, *et al.*, 2009 y Alfaro *et al.*, 2006). En Argentina, la seroprevalencia en rodeos de cría de la Cuenca del Salado (provincia de Buenos Aires) se ubica entre 7,2% y 19,6%, mientras que en Sampacho (suroeste de la provincia de Córdoba), se halla en 0,3% en animales y 5,3% en establecimientos (Gilardoni y Mundo, 2008). En el centro de México existen evidencias serológica y bacteriológica de infección por *Map* en diferentes especies de rumiantes, en caprinos de los alrededores de la ciudad de México se reveló una seroprevalencia del 6.73% (Chávez, *et al.*, 2004). Santillán y colaboradores en el 2007, identificaron un 4.33% (60/1385) de seropositividad en ovinos por medio de inmunodifusión en agar. Romo y colaboradores (2010)[b] realizaron un análisis de 394 ovinos de la región centro norte de México de los años 2007, 2008, 2009 y parte del 2010, mediante la prueba de ELISA, en el cual se encontró que el 12.8% de los animales presentaron seropositividad y que de las unidades de producción analizadas, el 42.63% de los hatos de ganado lechero resultaron positivos, el 34.48% de los hatos de engorda, el 58.82% de ganado de lidia y el 79.16% de rebaños ovinos. Es importante mencionar que aunque la enfermedad se encuentra difundida a nivel mundial, en México, esta no se diagnostica en la mayoría de los casos o su diagnóstico no se realiza adecuadamente. Por lo tanto la presencia de la enfermedad es relativa con respecto al número de casos detectados, subestimándose en muchas ocasiones (Romo et al., 2010)[b], otros estudios epidemiológicos en el País, indican que en Querétaro existe una prevalencia de

8.03% (74/921 animales positivos) (Guzmán y Santillán, 2008). Estos resultados, son similares a los obtenidos en la frontera de Tijuana, en donde se determinó una prevalencia de 8.6% (Hori-Oshima., 2008).

2.5. Importancia de la Paratuberculosis. La enfermedad se encuentra distribuida en el ámbito mundial y es responsable de generar pérdidas económicas importantes, debido a que solo en algunas ocasiones existen manifestaciones clínicas, su importancia real ha sido subvalorada (Chávez, *et al.*, 2004); por la prevalencia que existe las estimaciones de los verdaderos efectos económicos son inciertas, ya que la mayoría de los animales infectados son pacientes subclínicos (Barkema, *et al.*, 2010). Sin embargo se sabe que la enfermedad está causando pérdidas de producción en forma asintomática en los animales infectados, se calcula que los portadores producen el 15 -16% menos leche, con pérdidas de 1,300-2,800 libras de leche por lactancia (OIE, 2007), se estima que aproximadamente el 22% del total ganado vacuno lechero y el 8% de todos los hatos de carne en los Estados Unidos han presentado la enfermedad de Johne, causando una pérdida anual de más de 200 millones de dólares solamente a la industria láctea (Eda, *et al.* 2006 y Barkema, *et al.*, 2010), mientras que las pérdidas anuales estandarizadas por animal oscila entre 20 y 27 dólares en ganado lechero británico las pérdidas anuales por animal se estiman en 26 euros por animal, en los hatos de carne, las pérdidas por los animales suelen ser considerablemente más bajos (Barkema, et al., 2010). El impacto económico de la Paratuberculosis en México, es incierto, dado que que no se tienen estudios del impacto económico de la enfermedad (Miranda, *et al.*, 2005). En México la producción ovina va en aumento (Cuéllar, 2010), se cuenta con un inventario de 6.4 millones de animales (Martínez *et al.*, 2010) y cada vez es más frecuente el flujo de capital financiero, dando origen a una producción pecuaria empresarial muy promisoria. La distribución geográfica del ganado ovino abarca la mayoría de los Estados de la República Mexicana, siendo los que mayores inventarios poseen el Estado de México (1, 018,158) e Hidalgo (832,184l) (Cuéllar, 2010), Sinaloa contaba con un inventario ovino hasta el 2010 de 211,764 cabezas (SIAP, 2012) y

ocupa el 7° lugar en producción ovina nacional (produciendo 2200 toneladas de carne anuales) (SAGARPA, 2009) aportando el municipio de Culiacán 343 toneladas de carne en canal sacrificando 19,647 animales anualmente (SIAP, 2012). Desde hace 10 años la producción ovina en México ha mostrado un gran avance, donde es posible considerar la existencia de cuencas ovinas, definidas éstas como áreas grandes con alta concentración de ganado ovino con la clara intención de obtener un beneficio económico a través de la inversión de capital (Cuéllar, 2010).

2.6. Diagnóstico. El diagnóstico puede ser realizado en base a la historia clínica y por diferentes pruebas de laboratorio como aislamiento de la bacteria, ELISA, pruebas de campo como la Johnina y PCR (Jaimes, *et al.*, 2008).

2.6.1. Aislamiento. La detección directa de *Map* mediante cultivo microbiológico de heces, leche o tejidos es la técnica de referencia o prueba de oro. Demanda de 8 a 16 semanas y requiere la descontaminación de la muestra, lo que puede afectar la viabilidad de las bacterias. Los medios de cultivo tradicionales son el Herrold con yema de huevo, 7H9 7H10, etc., todos suplementados con micobactina y piruvato. Existen otros métodos como los sistemas automáticos de cultivo líquido y el análisis inmunohistoquímico, pero costosos y con reacciones cruzadas con otras micobacterias (Gilardoni y Mundo, 2008). El cultivo fecal, es el método más utilizado para el diagnóstico de paratuberculosis en caprinos (Kruze, et al., 2007), además de que *Map* es un microorganismo que necesita medios de cultivo enriquecidos (extracto de carne, peptonas, micobactina) para su crecimiento pero presenta una desventaja que consiste en que si bien la especificidad del cultivo es de 100%, la sensibilidad es menor a 50% (Jaimes, *et al.*, 2008).

2.6.2. Serología. ELISA es un elemento diagnóstico de rutina de gran utilidad para identificar rodeos infectados y animales subclínicamente enfermos o con la manifestación clínica de la enfermedad (Cirone, *et al.*, 2007).

La prueba de ELISA para detectar anticuerpos tiene la certeza diagnóstica dependiendo el estadio en el que el animal presenta signos de diarrea y edema submandibular, período donde la eliminación de *Map* por materia fecal y/o leche es cuantitativamente importante. Puede aplicarse tanto en suero como en leche, aunque la correlación entre ellas es moderada. La concentración de anticuerpos varía según el periodo de lactación, existiendo concentraciones altas al principio y al final de la lactación (Gilardoni y Mundo, 2008), la prueba presenta una especificidad del 99% y una sensibilidad del 60%, ya que detecta anticuerpos en animales clínicamente enfermos o subclínicamente infectados, actualmente es la prueba serológica más utilizada para detectar anticuerpos en sangre de animales infectados y se recomienda en conjunto con otros métodos diagnósticos (Alfaro, *et al.*, 2006). La seroconversión se observa con esta técnica entre los 6 a 9 meses de la eliminación de los bacilos detectables por cultivo. La especificidad del ELISA se puede incrementar mediante la absorción de los sueros con polvo de *Mycobacterium phlei* ó con el uso de antígenos de *Map* más específicos (SENASA, 2000). El diagnóstico serológico de Paratuberculosis en ovinos se realiza con la prueba Inmunodifusión en Agar (IDAG por sus siglas en inglés), con sensibilidad que puede variar de 70% a 80% y especificidad de 100%. La IDAG tiene la ventaja de ser sencilla y rápida para probar rebaños completos (Jaimes, *et al.*, 2008).

2.6.3. Johnina. Esta es utilizada como técnica de campo, es el equivalente a la tuberculina en la detección de la respuesta inmune celular (Romo, *et al.*, 2010)[b]. Es una prueba de valor limitado para diagnóstico individual debido a su baja especificidad, pero detecta reactores en los primeros estadios de la enfermedad, cuando hay abundantes bacilos en el intestino, por lo que se recomienda para tener una visión general de la situación de la enfermedad en una explotación (Alfaro *et al*, 2006).

2.6.4. PCR. En 1989, fue descubierto el inserto atípico específico de IS*900* en el genoma de *Map* por Green, desde entonces los investigadores proponen la

utilización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que permite confirmar la presencia de *Map* con cantidades mínimas de DNA bacteriano. La principal ventaja que confiere la PCR sobre el coprocultivo, es la reducción de tiempo en la obtención de resultados y la capacidad de detectar la presencia de bacterias viables y no viables. Las muestras que suelen analizarse por la técnica de PCR son heces, tejidos y leche. Debido a que la excreción de la micobacteria es intermitente y cuantitativamente no homogénea, se presenta el inconveniente de su concentración en las muestras a analizar. Esta concentración puede realizarse por sedimentación, centrifugación o separación inmunomagnética (Gilardoni y Mundo, 2008). Respecto al diagnóstico de paratuberculosis por PCR, los iniciadores que más se han estudiado son los diseñados a partir de la secuencia nucleotídica llamada secuencia de inserción 900 (IS900), específica de *Map*, además los resultados con la PCR-anidada se pueden obtener en tres o cuatro días, lo que representa ventaja de tiempo en comparación con el aislamiento bacteriológico (Jaimes, *et al.*, 2008 y Santillán, et al., 2007). Se ha descrito que cuando se utiliza una prueba de PCR con ADN obtenido de cepas bacterianas puras, la sensibilidad es de 100%, pero al utilizar ADN de muestras biológicas como en el caso de obtener el ADN heces, la sensibilidad puede verse reducida por la presencia de inhibidores, como las células epiteliales, la sangre, las sales biliares, componentes de vegetales y los carbohidratos complejos, cuya remoción aún representa el mayor reto para mejorar la sensibilidad, un punto que se considera importante para el diagnóstico por la PCR a partir de heces, es obtener ADN libre de inhibidores de la reacción, por lo que se han evaluado diversas técnicas de extracción con enzimas que si bien presentan ventajas para obtener ADN de buena calidad, aumentan el costo por muestra (Jaimes, *et al.*, 2008).

III. HIPÓTESIS

Los ovinos de Culiacán, Sinaloa, están infectados por *Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis,* agente causal de la Paratuberculosis.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general.

Detectar la presencia de *Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis* en ovinos de Culiacán, Sinaloa.

4.2. Objetivos específicos

1. Detectar *Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis* en ovinos por ELISA.

2. Establecer la prevalencia de *Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis* en las explotaciones de ovinos muestreadas.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Ubicación. El presente trabajo se realizó en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Sinaloa (FMVZ-UAS), en el municipio de Culiacán, Sinaloa, que se localiza a 24° 48´ latitud norte y 107° 23´ longitud oeste, con una altitud de 60 m sobre el nivel del mar. El clima es de tipo BS1 (h´) que corresponde al clima, semiseco muy cálido y cálido con una temperatura anual promedio de 25.4° C y una precipitación pluvial media de 670.9 mm (INEGI, 2011).

5.2. Muestreo. Se tomaron muestras sanguíneas al azar provenientes de ovinos de más de un año de edad de explotaciones de Culiacán, Sinaloa

5.2.1. Tamaño de la muestra. El tamaño de la muestra se determinó por medio de la fórmula para estimación de las proporciones propuesta por Daniels (2009).

$$n = Z^2 pq / d^2$$

En donde:

- n = tamaño de muestra.
- z = valor distribución normal estándar
- d = coeficiente de confiabilidad.
- p = proporción
- q = 1 - p

5.2.2. Obtención de muestras. Se tomaron 381 muestras de sangre de ovinos mayores de un año de edad de 5 explotaciones de Culiacán, Sinaloa, la sangre se obtuvo de la vena yugular. Se recolectaron con tubos Vacutainer® estériles sin anticoagulante, estas fueron trasladadas al laboratorio de Parasitología de la FMVZ-UAS para su procesamiento en el área de biología molecular y se conservaron en refrigeración hasta su procesamiento.

5.3. Obtención de sueros sanguíneos. Todos los sueros sanguíneos fueron obtenidos por centrifugación, se colocaron en microtubos y se congelaron a -70C° hasta su diagnostico por ELISA.

5.4. Diagnóstico serológico por ELISA. Se realizó la prueba de ELISA a todos los sueros obtenidos, para este propósito se utilizo el kit comercial (Institut Pourquier, POURQUIER® Elisa Paratuberculosis Antibody Screening, Francia) del laboratorio **IDEXX®**, las muestras se procesaron diluyéndolas a una concentración de 1:20 para controles y las muestras de sueros e incubándolas a 21°C por 15 min. Luego se transfirieron a las microplacas de poliestireno de 96 pocillos revestidos del antígeno del *M. paratuberculosis,* a razón de 100 µL de controles y sueros prediluidos en los pocillos correspondientes. Seguidamente fueron incubadas por 45 min. a 21°C y se lavaron tres veces con solución PBS. Posteriormente, se agregó 100 µL de conjugado (diluido 1:100) por pozo, se incubaron por 30 minutos y lavaron, tal como se describió anteriormente y se adicionó 100 µL de solución revelado. Transcurridos 10 minutos, se detuvo la reacción agregando 100 µL de solución de frenado. La lectura se realizó a 450 nm en un espectrofotómetro EliRead RT-2100C (KONTROLab ®).

Los valores de densidad óptica de los controles y las muestras fueron promediados. La prueba se consideró válida cuando el valor promedio de densidad óptica (CPx) del control de referencia positivo fue mayor de 0,35 y se acompañó de un cociente del (CPx) control positivo entre el (CN A450) control negativo mayor o igual a 3. El resultado de las muestras fue expresado como porcentaje M/P.

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

Donde *x* = valor promedio; *A450* = densidad óptica; *M* = muestra; *CP* = control positivo y *CN*= control negativo.

Los puntos de corte se establecieron según lo recomendado por el fabricante: suero sanguíneo: muestras negativas <45% M/P, superior a 45% e inferior a 55% M/P sospechosos y positivos ≥55% M/P.

De acuerdo con la recomendación de la empresa productora del kit, se consideró "infectado" a todo animal que resulte con un porcentaje (M/P) por encima del punto de corte. Ello se basa en la capacidad del ensayo de detectar inmunidad humoral, (anticuerpos circulantes contra *MAP)* con una sensibilidad absoluta entre 40.8 a 66% y una especificidad de 99 a 99,8% en comparación con el cultivo de materia fecal.

Cuadro 1. Número de muestra positivo a *MAP*, valores de densidad óptica mostrada por cada muestra y resultados presentados en porcentaje por arriba del punto de corte.

Identificación	Densidad óptica a 450nm	%
97	2.559	96.86
105	2.485	93.88
181	2.408	97.12
200	1.948	76.17
204	1.986	77.90
211	1.872	72.71
290	1.849	98.50
346	1.800	76.09
364	2.513	100.00
373	2.331	97.56

5.5. Análisis de los datos. Los datos obtenidos fueron procesados mediante un análisis de frecuencias.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los 381 animales muestreados en explotaciones de Culiacán, Sinaloa se encontraron 10 ovinos positivos a Paratuberculosis mediante ELISA, lo cual corresponde al 2.6 % del total de las muestras y 12 sospechosos lo que representa el 3.15 % del muestreo.

Cuadro 2. Ovinos positivos a Paratuberculosis por ELISA en explotaciones de Culiacán, Sinaloa.

Animales muestreados	Positivos	Negativos	Sospechosos
381	10	371	12
%	2.6	94.25	3.15

Cuadro 3. Seroprevalencia de Paratuberculosis por explotación muestreada.

Explotación	Positivos	Seroprevalencia
1	2	2%
2	4	3.74%
3	1	1.2%
4	0	0%
5	3	5%

Cuadro 4. Porcentaje de ovinos seropositivos a Paratuberculosis sintomáticos y asintomáticos.

No. animales positivos	Sintomáticos	Asintomáticos
10	2	8
100%	20%	%80

En diferentes estudios realizados en México se han encontrado porcentajes de seropositividad que van desde 4.3% (Santillán, *et al.*, 2007) a 27.6% (Romo, *et al.*, 2010)[b]., los resultados del presente trabajo indican una seropositividad de 2.6% en ovinos de Culiacán, Sinaloa, lo cual es una cifra baja comparándola con los resultados de otros estudios en el País, sin embargo existe un 3.2% de sospechosos y de confirmarse su positividad el porcentaje de animales infectados (5.8%) sería similar a otras ciudades donde la prevalencia oscila entre 4-8%, como Querétaro 8.03% (Guzmán y Santillán, 2008). , Distrito Federal 4.3% (Santillán, *et al.*, 2007) y Tijuana 8.6% (Hori-Oshima., 2008). La prueba inmunodifusión en agar (IDGA) utilizada por Santillán y colaboradores (2007), es una técnica que su sensibilidad y especificidad en ovinos es comparable al aislamiento bacteriológico, y es útil para establecer una infección de tipo subclínico. Esta prueba relaciona directamente la positividad con la presencia de elevados números de bacilos en las lesiones, además de detectar a la mayoria de los enfermos, sospechosos y subclínicos, por ser una prueba cualitativa esta incluye como positivos a los animales sospechosos haciéndola menos especifica. La prueba de ELISA utilizada en el presente estudio tiene la capacidad de discernir entre animales infectados y sospechosos, es probable que esto resulte en la diferencia de resultados encontrados en el trabajo realizado por los autores antes descritos, lo anterior se basa en la capacidad del ensayo de detectar inmunidad humoral (anticuerpos circulantes contra *MAP),* con una sensibilidad absoluta entre 40,8 a 66% y una

especificidad de 99 a 99,8% en comparación con el cultivo de materia fecal y la prueba de inmunodifusión en agar..

Romo y colaboradores (2010)[b] realizaron un análisis de 394 ovinos de la región centro norte de México de los años 2007, 2008, 2009 y parte del 2010, mediante la prueba de ELISA, en el cual se encontró que el 12.8% de los animales presentaron seropositividad cifra alta comparándola con los resultados obtenidos en el presente estudio, dicha diferencia podría deberse a que los autores antes mencionados realizaron la investigación considerando animales de diferentes ciudades del País, aunado a esto el estudio fue realizado en un periodo de más de 3 años de esta manera se estaría considerando la prevalencia y la incidencia de la enfermedad.

La infección asintomática de *Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis* es del 80% de los casos positivos de este trabajo, siendo menos representativa la forma sintomática (20%), esto pudiera ser debido a que la enfermedad se manifiesta después de un prolongado período de incubación que puede ser de 2 a 5 años (Palmer, *et al.*, 2005), aunado a esto hay reportes de periodos más prolongados de incubación de hasta 15 años (OIE, 2007), además en los pequeños rumiantes domésticos la Paratuberculosis puede estar presente sin observarse signos hasta en la fase final de la enfermedad (Cirone, *et al.* 2007).

VII. CONCLUSION

Los ovinos de explotaciones de Culiacán, Sinaloa son portadores de *Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis,* encontrándose una seroprevalencia de paratuberculosis en las explotaciones muestreadas de 2.6% pudiendo ser la prevalencia de la enfermedad más alta en el municipio. Así mismo se detecto que la infección de *Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis* en forma asintomática (80%) es mayor que la forma de presentación sintomática (20%).

VIII. REFERENCIAS.

Alfaro, C., Rolo, M., Clavijo, A. y Valle, A. (2006). Caracterización de la paratuberculosis bovina en ganado doble propósito de los llanos de Monagas, Venezuela. Rev. Zootecnia Trop. 24 (3): 321-332.

Barkema, H.W., Hesselink, J. W., McKenna, L.B., Benedictus, G. y Groenendaal, H. (2010). Epidemiology of Paratuberculosis. Paratuberculosis, Organism, Disease, Control. CABI. (3) 22 – 26 Cambridge, USA.

Catrellón, V. E., Ahumada, Gris, G.C., Verdugo, A., López, D. V., Manoutcharian, K., Maldonado. E. C. y Munguia M. E. Z. (2010). Semblanza de la Paratuberculosis en México. Memorias del VII congreso universitario de ciencias veterinarias. Pto. Vallarta, Jalisco

Chávez, G.G., Trigo, F.J., Svastova P. y Pavlik, I. (2004). Identificación del polimorfismo genético de aislamientos de *Mycobacteryum avium subespecie paratuberculosis* de caprinos del centro de México. Rev. Vet. Mex. 35 (1): 1-7.

Cirone, K., Morsella, C., Romano, M. y Paolicchi., F. (2007). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: presencia en los alimentos y su relación con la enfermedad de Crohn. Rev. Argentina de Microbiología. 39: 57-68.

Cuéllar, A. (2010). **Perspectivas de la producción ovina en México para el año 2010. Revista del borrego. 47 (4) http://www.borrego.com.mx/archivo/n47/p47perspectivas.php consultado el 30 de septiembre de 2010.**

Daniels, W. W. (2009). Bioestadistica bases para el análisis de las ciencias de la salud. Edit. Limuza. México D.F.

Eda, S., Bannantine, J.P., Waters, W.R., Mori, Y., Whitlock, R.H.,Scott,M.C. and Speer, C.A. (2006). A Highly Sensitive and Subspecies-Specific Surface Antigen Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Johne's Disease. Rev. Clin. Vacc. Immun.13 (8): 837–844.

Gilardoni, M.V. y Mundo, S.L. (2008). Paratuberculosis bovina. Rev. Infovet. 13(102): 1 – 4.

Guzmán R.C.C. y Santillán, F.M.A. (2008). Seroprevalencia de Paratuberculosis Bovina en 18 Municipios del Estado de Guanajuato. XLIV Reunión Nacional de Investigación Pecuaria Yucatán. Diagnóstico, Control y Epidemiologia p. 41-53.

Holzmann, C.B., Jorge M.C., Traversa M.J., Schettino D.M., Medina L y Bernardelli A. (2004). Estudio del comportamiento epidemiológico de la paratuberculosis bovina mediante series cronológicas en Tandil, provincia de Buenos Aires, Argentina. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 23 (3): 791-799.

Hori-Oshima S. Campos-Barba L.A., (2008). Editors. Seroprevalence of bovine paratuberculosis in dairy cattle herds in the Mexico-U.S. border area in Baja California, Mexico2008; Tsukuba, Japan: Proceedings of the 9th International Colloquium on Paratuberculosis.

INEGI. (2011). http://www.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/default.aspx?ent=25 consultado el 10 de febrero de 2011.

Jaimes, N.G., Santillan M.A., Hernandez O.A., Cordova D., Guzman, C.C., Arellano B., Diaz E., Tenorio V.R. y Cuellar A. (2008). Detección de *Mycobacterium*

avium subespecie paratuberculosis, por medio de PCR-anidada a partir de muestras de heces de ovinos. Rev. Vet. Méx., 39: (4). 377- 386.

Juste, R.A., Garrido, J.M. y Anduriz G. (2000). Un siglo de controversia sobre la paratuberculosis: I. la situación actual del conocimiento de la infección. Rev. Med Vet. 17: (5) 88 – 101.

Kruze, J., Salgado, M. y Collins, M.T. (2007). Paratuberculosis en rebaños caprinos chilenos. Rev. Arch. Med. Vet. 39(2): 147 – 152.

Magnning, E.J. y Collins, M.T. (2010). Epidemiology of Paratuberculosis. Paratuberculosis, Organism, Disease, Control. CABI (3) 22 – 26 Cambridge, USA.

Miranda B.M.V. (2005). Evaluación del impacto económico de la Paratuberculosis en ganado bovino lechero (sistema intensivo), en el Complejo Agropecuario Industrial Tizayuca, Hidalgo, México. (Tesis de Maestría), México D.F. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Citado por Ávila, J.G., Blando, E.G. y Cruz, E.H. (sin año). Paratuberculosis clínica de bovinos I. Universidad Nacional Autónoma de México.

OIE, (2007). Paratuberculosis jhone´s disease. http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/paratuberculosis.pdf. Consultado el 20 de septiembre de 2010.

Palmer, M.V., Stoffregen, W.C., Carpenter, J. G., and Stabel J.R. (2005). Isolation of *Mycobacterium avium subsp par tuberculosis* (Map) from Feral Cats on a Dairy Farm with Map-infected Cattle. *Journal of Wildlife Diseases,* 41(3): 629–635.

Romo, M.F., Lozano, B.J. Ramirez M.S. y Avila F.D. (2010)[a]. Caso clínico de paratuberculosis en ovinos de los altos de jalisco. memorias del VII congreso universitario de ciencias veterinarias. pto. vallarta, Jalisco

Romo, M.F., Martinez R.O.C., Guardiola T.D.K. y Avila F.D. (2010)[b]. Presencia de seropositividad a paratuberculosis en la región centro occidente de Mexico. Memorias del VII congreso universitario de ciencias veterinarias. Pto. Vallarta, Jalisco.

SAGARPA. (2009). Monitor agroeconómico 2009 del Estado de Sinaloa. http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Estadisticas/Documents/SINALOA.pdf consultado el 13 de octubre de 2010.

Sánchez-Villalobos, A., Arráiz-Rodríguez, N.,Becerra-Ramírez, L., Faria, N. Montero-Urdaneta, M., Oviedo-Bustos, A., Zambrano-Nava, S. A., Boscán-Ocando, J., Molero-Saras, G. y Pino-Ramírez, D. (2009). INFECCIÓN POR *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* EN UN REBAÑO CRIOLLO LIMONERO Rev. Científica Universidad del Zulia. 19 (6): 555 – 565.

Santillán F. M., Córdova L.D., Guzmán R.C., Jaimes M.N. y Hernández C.O. (2007). Características generales de la paratuberculosis ovina en grupos GGAVATT del estado de Guanajuato. XLIII Reunión Nacional de Investigación Pecuaria Sinaloa 2007: 58.

SENASA. (2000). Manual de procedimiento técnico diagnóstico de paratuberculosis. Laboratorio de referencia de la Office International des Epizooties (OIE) en paratuberculosis para América central, América del sur, México y el Caribe. http://www.aavld.org.ar/paratub.pdf cosultado el 10 de septiembre de 2010.

Sevilla, A. I. (2007). Caracterización Molecular, Detección y Resistencia de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*. Memoria del trabajo realizado en Neiker-Tecnalia presentado por Iker Sevilla Agirregomoskorta para optar al grado de Doctor en Biología por la Universidad del País Vasco.

SIAP. (2012). Ovino producción, precio, valor y peso de ganado en pie y carne en canal 2010. http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=21&Itemid=330. Consultado el 15 de enero de 2012.

IX. ANEXOS.

Anexo 1. Cuadro 5. Número de animales muestreados por Explotación.

Explotación	Animales muestreados
1	100
2	107
3	84
4	30
5	60
TOTAL	**381**

Anexo 2.

Figura 1. Colocación de sueros prediluidos en microplaca revestidos con antigenos de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* para prueba de ELISA.

Anexo 3.

Figura 2. Adición de reactivos a microplaca para diagnóstico de Paratuberculosis ovina.

Anexo 4.

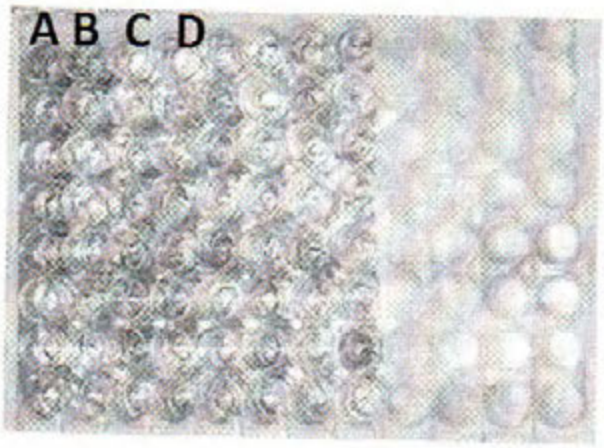

Figura 3. Reacción de sueros sanguíneos después de la adicion de reactivos en prueba de ELISA para diagnóstico de Paratuberculosis. (Pocillos A y B corresponden los controles positivos de la prueba, pocillos C y D corresponden a los controles negativos de la prueba).

Anexo 5.

	1	2	3	4	5	6
A	[illegible]	002 [illegible]	003 [illegible]	004 [illegible]	005 [illegible]	006 [illegible]
B	012 [illegible]	014 [illegible]	015 [illegible]	016 [illegible]	017 [illegible]	018 [illegible]
C	025 1.874	026 1.037	027 1.016	028 0.410	029 0.547	030 [illegible]
D	037 1.899	038 0.596	039 0.296	040 0.341	041 0.323	042 0.300
E	049 0.329	050 0.344	051 0.341	052 0.301	053 0.359	054 0.344
F	061 2.513	062 0.475	063 0.469	064 0.285	065 0.259	066 0.540
G	073 2.331	074 0.287	075 0.376	076 0.503	077 0.374	078 0.314
H	085 0.044	086 0.053	087 0.045	088 0.036	089 0.033	090 0.038

Figura 4. Densidades ópticas de las muestras procesadas por prueba de ELISA observadas a 450 nm en espectrofotómetro. (Fila A columnas 1 y 2 muestran valores de controles positivos, fila A columnas 3 y 4 valores controles negativos).