

Situación epidemiológica de la paratuberculosis en las principales regiones caprinas del estado de Puebla, México

Epidemiological situation of paratuberculosis in mainly goat regions of Puebla, Mexico

ÉRIKA PATRICIA GALLAGA MALDONADO ¹, BEATRIZ ARELLANO REYNOSO ¹, MARCO ANTONIO SANTILLÁN FLORES ²,
LUCÍA DEL CARMEN FAVILA HUMARA ², DIONICIO CÓRDOVA LÓPEZ ², RENÉ J. MORALES ³ Y EFRÉN DÍAZ APARICIO ^{2*}.

¹ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, CU.
Av. Universidad 3000, Del. Coyoacán, D.F., CP 04510.

² Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias-Microbiología, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias,
carretera México-Toluca, Km 15.5, CP 05110, Col. Palo Alto, México D.F.

³ Comité de Fomento y Salud Animal del estado de Puebla., A. C.,
Prolongación Av. Hidalgo 212, Colonia Centro San Pedro Cholula, Puebla, CP 72760.

*Correo electrónico: efredia@yahoo.com

RESUMEN

La paratuberculosis (PTB) es una enfermedad ocasionada por *Mycobacterium avium paratuberculosis* (MAP) que causa enteritis crónica, generando importantes pérdidas económicas debido a la emaciación progresiva que desarrollan los animales clínicamente infectados. Es necesario contar con herramientas diagnósticas adecuadas para detectar a los animales infectados y establecer medidas de control. El objetivo del estudio fue determinar la prevalencia y los factores de riesgo asociados a PTB en las principales regiones caprinas (Mixteca y Libres) del Estado de Puebla. Se trabajó con un tamaño de muestra de 865 animales, se colectaron muestras de heces y sangre de cabras en 86 rebaños, con la técnica de laboratorio ELISA indirecto, se determinó la presencia de anticuerpos contra PTB en el 100% (19/19) de los municipios muestreados, obteniéndose seroprevalencias aparentes del 76.74% para rebaños y 28.06% por caprino; se realizó el estudio bacteriológico y PCR anidado de las heces, obteniéndose 62 animales positivos a PCR y 22 aislamientos de MAP. Se aplicó un cuestionario epidemiológico por rebaño y por cada caprino incluido en el estudio, y mediante análisis bivariado, (calculando el OR o prueba de Fisher) se encontró que las variables incluidas, no afectan la prevalencia de la enfermedad bajo las condiciones de este estudio. Se concluye que la paratuberculosis caprina está ampliamente diseminada en las principales regiones caprinas (Mixteca y Libres) del Estado de Puebla ya que se encontraron seropositivos en todos los municipios muestreados y la prevalencia verdadera a nivel de rebaño fue 96.29% con IC de 95% (92.29-100%).

Palabras clave: Caprinos, *Mycobacterium avium paratuberculosis*, Odds ratio, Puebla

INTRODUCCIÓN

En México tradicionalmente los pequeños rumiantes han estado en manos de productores marginados, de bajos recursos económicos y alejados de los beneficios de la asistencia técnica y de la tecnología. En la actualidad la caprinocultura nacional sigue sin satisfacer la cada vez más grande demanda, en cantidad y calidad, de los productos de esta especie. La actividad pecuaria se desarrolla en función de una producción de autoconsumo principalmente, en la que se aprovecha la leche y la carne de los animales jóvenes, que es consumida como cabrito;

ABSTRACT

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

Key words: *Mycobacterium avium paratuberculosis*, goats, odds ratio, Puebla

o bien la de los adultos con la que se prepara birria. Aunque por otro lado existen actualmente gran número de sistemas de producción caprina que funcionan en forma redituable (Cuellar, Tórtora, Trejo y Román, 2012).

En nuestro país la población de ganado caprino según los censos ganaderos de SAGARPA en el año del 2014 fue de 8,664,613 cabezas, y se puede decir que es el rebaño más grande del continente americano. Se estima que para ese año existen 494,000 rebaños caprinos y aproximadamente 1.5 millones de mexicanos se relacionan con esta actividad productiva ya sea en forma primaria o secundaria; con una producción de 39,656 mil toneladas de carne (Cuellar et al. 2012; SIAP, 2014).

La mayoría de los rebaños se conforman de pequeños rebaños manejados directamente por un pastor o una familia, la cual realiza todas las actividades de manejo. En términos generales, estas son marginadas, escasas en infraestructura y sus niveles de productividad son muy bajos (Cuellar et al. 2012).

La producción caprina en el estado de Puebla se considera principalmente de tipo familiar, agrupándose dentro del sistema de economía campesina, teniendo como base biológica el caprino criollo y la introducción de razas especializadas. Así como el hecho de que los caprinos pastorean la mayor parte del año y en ocasiones durante la época seca reciben suplementación (Hernández et al. 2001). El sistema de producción predominante en las regiones caprinas de Libres y la Mixteca es el sistema extensivo que se basa en alimentación sobre agostaderos con suplementación estacional y de poca variabilidad de sus ingredientes, con finalidad predominantemente productora de animales para el abasto de carne y principalmente de tipo criollo. La reproducción característica de la especie es estacional; sin embargo, se hacen apareamientos continuos. Son incidentes los problemas respiratorios y las parasitosis, así como la mortalidad de cabritos durante la estación seca. No se favorece la asociación de los productores por lo que los canales de comercialización son limitados y se afectan negativamente los precios del producto (Hernández et al. 2001).

A pesar de que la paratb es una enfermedad endémica en México, en el estado de Puebla existe un desconocimiento de su distribución a nivel regional, municipal y de rebaños, solo existe un reporte preliminar de frecuencia de PTB (Favila et al., 2009) previo al presente estudio y no existen reportes de prevalencia de la enfermedad en ninguna especie doméstica ni silvestre, sin embargo, se sabe de la presencia de la enfermedad en bovinos de los estados de Veracruz y Oaxaca (Estévez, Hernández, Trujillo y Chávez, 2006), así como en caprinos de Oaxaca, entidades que limitan con las zona de Libres y la Mixteca (Favila et al. 2009). El hecho de conocer la distribución temporal y espacial de la paratb es una herramienta para establecer programas de control de la enfermedad.

El objetivo de este estudio fue estimar la frecuencia de rebaños seropositivos y la prevalencia a nivel de caprinos de infecciones por paratuberculosis, así como la determinación de factores de riesgo asociados, en las regiones de Libres y la Mixteca en el estado de Puebla, México.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el estado de Puebla, comprendiendo nueve municipios de la zona de Libres y diez de la Mixteca Poblana.

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

El método de muestreo utilizado fue no probabilístico por conveniencia; con base en datos de los productores de la zona, se hizo una invitación a participar en el estudio, y finalmente, en cada unidad de producción la selección de los animales se realizó al azar y siguiendo los criterios de inclusión, es decir, animales de un año o mayores y aparentemente sanos. El tamaño de muestra de la población se calculó mediante la fórmula de proporciones de Levy (Hernández, 2009), con base en la información referida por el Comité de Fomento y Salud Animal del estado de Puebla de N=53,335 caprinos en las zonas de Libres y la Mixteca poblana en el año 2008, una prevalencia esperada del 10%, intervalo de confianza del 95% y un error de 0.02 %; con lo cual se obtuvo un tamaño mínimo de muestra de 865 caprinos.

El tamaño de la muestra en cada UP se estableció al momento de la visita con base a la población que existía en la misma en ese momento (Cannon y Roe, 1982).

Por cada animal incluido en la muestra, se colectaron muestras de suero y heces. De las heces se colectaron 5 g de materia fecal directamente del recto para realizar cultivo bacteriológico y extracción de ADN para la PCR anidada. Las muestras de suero y heces se transportaron dentro de hieleras de unicel con refrigerantes en un periodo menor de 48 h, al laboratorio de Tuberculosis del CENID Microbiología INIFAP donde se congelaron a -20 °C hasta ser procesadas.

Se realizó una encuesta por cada propietario de los rebaños muestreados, para obtener información de las variables independientes como: tipo de producción, población de caprinos, manejo de las cabras, introducción y procedencia de animales al rebaño, épocas de parición manejo de los sementales, presencia de abortos y cabritos, mortinatos o nacidos débiles, presencia de cabras repetidoras del celo, ordeño de las cabras, uso y manejo de la leche, tipos de las vacunas y frecuencia de la vacunación, convivencia con otras especies animales, manejo de las placentas y restos de abortos, manejo de las excretas, causas de morbilidad y mortalidad en el rebaño; necesarias para establecer los factores de riesgo de PTB a nivel de rebaños. Se elaboró un registro de información por caprino muestreado para obtener información de las variables independientes, tales como: municipio, rancho, raza, peso, edad, sexo, tipo de animal, estado corporal, procedencia, vacunaciones, producción, antecedentes de problemas reproductivos; necesarias para buscar establecer los factores de riesgo de PTB en caprinos.

Se realizó un ELISA indirecto, utilizando el antígeno protoplasmático de la cepa de MAP 3065 (elaborado en el INIFAP), que tiene sensibilidad de 86% y una especificidad de 90% (Martínez et al. 2012). Los controles, positivo y negativo procedieron del banco de sueros del INIFAP y cada una de las muestras se realizaron por duplicado en placas de SARSTED de 96 pozos. Con la finalidad de incrementar la especificidad de la prueba, los sueros problema y los controles se pre-adsorbieron con una solución de *Mycobacterium phlei* al 2%, 30 minutos antes de ser colocados en la placa de ELISA (Yokomizo, Yugi, Merkal, 1985). Las placas se leyeron usando el filtro de 650 nm con un espectrofotómetro de 8 canales (Biotek). El punto de corte que se utilizó fue de ELISA ($OD \geq 0.227$) con intervalos de confianza de 95% y dos desviaciones estándar (Hernández, 1992). Mientras que a nivel de rebaño el punto de corte que definió a un rebaño como positivo fue la presencia de uno o más caprinos seropositivos dentro de un mismo rebaño.

La extracción de ADN de *Mycobacterias*, se realizó a partir de heces, mediante la metodo-

logía convencional, precipitando y purificando el ADN con cloroformo-álcohol isoamílico e isopropanol.

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

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

Para la segunda amplificación se usaron 2 μ l producto de la primera amplificación que fueron transferidos a microtubos de PCR, que contenían la misma cantidad y concentración de los reactivos descritos anteriormente, excepto que los iniciadores usados fueron ptb 2 y ptb 3. Se utilizó el mismo programa del termociclador. Se incluyó como testigo positivo el ADN obtenido de un caso clínico de paratuberculosis en ovino.

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

Para el cultivo bacteriológico, a partir de muestras de heces, se realizó la siembra de cada muestra por duplicado en medio de Herrold, adicionado con yema de huevo y micobactina mediante la metodología de Payuer (Payuer, Jarnagin, Marquardt, Schaper, Martin, 1993). Se disolvieron 2 g de heces en 50 ml de cloruro de hexadecil piridinio al 75% y se tomaron 10 ml del sobrenadante y de la fase intermedia, se centrifugaron a 2,000 xg durante 10 min, se tiró el sobrenadante y al pelet obtenido se le colocaron 3 ml de zephiran al 3%, dejándolo en reposo por 30 min, posteriormente se centrifugaron por 2,000 xg durante 10 min. Se tiró el sobrenadante conservando aproximadamente 1 ml, en el cual se deshizo el pelet y con esta solución se realizó la siembra por duplicado en medio de Herrold adicionado con yema de huevo y 2 mg/l de micobactina, dejando incubar los tubos de cultivo en posición horizontal a 37°C durante ocho semanas (Merkal y Curran, 1974).

A los cultivos que presentaron crecimiento de colonias con morfología características de MAP, se les realizó la tinción de Zielh Neelsen.

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

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

Para definir posibles factores de riesgo por animal, el resultado del ELISA constituyó dentro del análisis estadístico, la variable dependiente, mientras que las variables de los registros individuales (sexo, tipo de animal, peso, edad, estado de carnes, animal nacido en el rancho, animales comprados y lugar en donde fue comprado, presta al semental) y de las encuestas de los rebaños, conforman las variables independientes (limpieza de corrales,

frecuencia de la limpieza, destino de las excretas, densidad de población en los rebaños, convivencia de los rebaños caprinos con otras especies de animales domésticos, origen de los caprinos, manejo del rebaño, zona geográfica, tipo de producción y presta o pide prestado el semental) que se utilizaron para establecer los posibles factores de riesgo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La mayor cantidad de animales muestreados fue obtenida del municipio de Tehuizingo en la zona de la Mixteca poblana y el menor número de animales muestreados fue obtenido de los municipios de La Fragua y Cuyoaco de la zona de Libres. De un total de 898 muestras, las frecuencias más altas de seropositivos se registraron en Totoltepec con 48.1% y en Ocoatepec con 45.4%.

Se obtuvieron muestreas de 50 rebaños de la zona de la Mixteca Poblana y 36 rebaños de la zona de Libres; el mayor número de animales muestreados en ambas zonas se ubicó dentro del rango de edad de los 26-51 meses.

En la muestra de 86 rebaños caprinos localizados en 19 municipios del estado de Puebla, se determinó que 66 rebaños presentaron al menos un animal seropositivo a paratuberculosis, por lo que la frecuencia por rebaños fue de 76.7% con un IC 95% (67.8-85.6%) (Cuadro 1).

La media del número de animales dentro de los rebaños fue de 67 individuos con rebaños conformados de 6 hasta 290 caprinos. En la frecuencia para cada municipio a nivel de rebaños, los municipios de Acatlán, Cuyoaco, Guadalupe Victoria, La Fragua, Ocoatepec, Oriental, San Jerónimo, San Miguel y Totoltepec, presentaron el 100% de los rebaños muestreados con al menos un animal seropositivo.

En la zona de Libres se obtuvo una frecuencia de 72% (26/36) y en la Mixteca 80% (40/50). En la proporción de rebaños muestreados por zona 41.86% en la zona de Libres y el 58.13% en la zona de la Mixteca poblana. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre las dos zonas ($P < 0.05$).

Las Razones de momios (RM) de las variables estudiadas a nivel de rebaño se muestran en el Cuadro 2. Al analizar las variables de ma-

Cuadro 1. Distribución por municipio de los rebaños y de los animales muestreados seroprevalencia por municipio y a nivel individual, en las regiones de Libres y la Mixteca poblana.

Municipio	Rebaños muestreados	Animales muestreados	Animales positivos	Seroprevalencia expresada en porcentaje
Acatlán	8	73	23	31.51
Chinantla	3	34	4	11.76
Cuyoaco	3	28	11	39.29
Guadalupe	2	19	5	26.32
La fragua	1	11	1	9.09
Libres	4	37	8	25.53
Ocoatepec	4	44	20	45.45
Oriental	3	34	11	29.17
Piactla	8	86	29	33.72
San Jerónimo	1	13	2	15.38
San Miguel	3	39	8	20.51
San Nicolás	3	28	4	14.29
San Pablo	6	61	16	26.23
San Pedro	3	40	11	27.50
San Salvador	8	81	4	4.94
Tecomatlán	3	39	8	20.51
Tehuitzingo	8	88	24	27.27
Tepeyahualco	8	64	25	39.06
Totaltepec	8	79	38	48.10
Total	86	898	252	28.06

nejo del rebaño se observó que existe un menor riesgo de presentar la enfermedad cuando la limpieza de los corrales se realiza diario o cada 2 semanas en adelante ($P < 0.05$).

Los resultados del análisis de factores de riesgo que involucran la convivencia de los caprinos dentro de un mismo predio con otras especies de animales domésticos, se presentan en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Seroprevalencia de paratuberculosis de acuerdo al contacto de otras especies animales con los rebaños caprinos de las zonas de Libres y la Mixteca poblana.

Variable	Proporción por categoría (Frecuencia %)	Proporción de seropositivos (Seroprevalencia %)
Vacas, bueyes, becerros		
Si	21/86 (24.41)	15/21 (71.42)
No	59/86 (68.60)	47/59 (79.66)
A veces	6/86 (6.97)	4/6 (66.66)
Borregos		
Si	26/86 (30.23)	19/26 (73.07)
No	55/86 (63.95)	43/55 (78.18)
A veces	5/86 (5.81)	4/5 (80.00)
Puercos		
Si	12/86 (13.95)	10/12 (83.33)
No	69/86 (80.23)	52/69 (75.36)
A veces	5/86 (5.81)	4/5 (80.00)
Aves		
Si	41/86 (47.67)	32/41 (48.04)
No	40/86 (46.51)	30/40 (75.00)
A veces	5/86 (5.81)	4/5 (80.00)

Se muestrearon un total de 58 machos y 840 hembras, que presentaron 28.0% y 27.5% de seropositivos respectivamente. Los animales con pesos entre 29 y 34 kg presentan la mayor frecuencia de positivos con un 42.55%, cabe destacar que son caprinos que de acuerdo a su edad les corresponderían mayores rangos de peso.

La muestra se integró del 86% (775/898) de los animales nacidos en los municipios estudiados y el 14% restante es comprado.

Un total de 252 de 898 caprinos se determinaron serológicamente positivos a MAP. La prevalencia aparente individual en la po-

Cuadro 2. Análisis bivariado de los factores de riesgo en rebaños caprinos de las regiones de Libres y la Mixteca poblana, utilizando OR (Odds ratio) o prueba de Fisher ($P < 0.05$)

Variable	2x2	Prueba de Fisher	OR	IC 95%	Valor de P
Zona geográfica	Libres vs Mixteca	----	0.6500	0.238 – 1.778	0.4013
Tipo de producción	Engorda vs. Producción de cabrito	0.07	3.23	0.9719 – 10.78	0.05
Origen de los caprinos	Solo nacidas en el rancho vs. Nacidas en el rancho y compradas	----	1.4385	0.5307 – 3.8987	0.4748
Épocas de parición	Dos épocas de parición vs. Una época de parición	----	1.35	0.4686 – 3.9227	0.57
Acostumbra ordenar a sus cabras	Si ordeña vs. no ordeña	----	1.0938	0.2826 – 4.233	0.8967
Perros de vecinos conviviendo	Con perros de vecinos conviviendo vs. Sin perros de vecinos conviviendo	----	1.8947	0.6097 – 5.888	0.2693

blación caprina fue de 28.06% con un IC 95% (26.57-29.55). De toda la muestra y utilizando el estimador de Rogan-Galden, la prevalencia verdadera fue de 23.76% con un IC 95% (20.98-26.54) (Rogan y Gladen, 1978). Las frecuencias de caprinos seropositivos categorizadas por edad en las dos zonas de estudio no mostraron diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$).

La PCR se realizó a 367 muestras, de las cuales el 56.13% (206/367) fueron de animales seropositivos y el 43.86% (161/367) fueron mezclas de 4 muestras cada una y que pertenecían a animales seronegativos. Al utilizar los iniciadores específicos de la secuencia IS900, la prueba de PCR anidado y visualizar los productos de amplificación en geles de agarosa al 2% se identificó el genoma de MAP en 62/367 (16.89%) de las cuales 52/206 muestras, fueron seropositivas a paratuberculosis y 12/161 de cabras seronegativas (Figura 1).

Se realizó el estudio bacteriológico de 240 muestras de heces de cabras, de las cuales, 195 muestras presentaron crecimiento y solo se obtuvieron 23/195 aislamientos de MAP (11.7%). Se observó el crecimiento de colonias bacterianas a partir de la octava semana de incubación; en medios adicionados con micobactina y con la tinción de ZN se observaron bacilos ácido alcohol resistentes que fueron consideradas como MAP.

El hecho de que el 100% (19/19) de los municipios trabajados se encontrara por lo menos un rebaño positivo, demuestra que la PTB caprina es un problema endémico en el estado; estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores quienes reportaron no haber encontrado rebaños libres de PTB en municipios de los estados de Guanajuato, Puebla y Oaxaca (Favila et al. 2009), lo anterior pone en evidencia la alta diseminación de la enfermedad en los distintos rebaños y permite inferir la situación actual de la enfermedad en el estado de Puebla.

El uso del estimador de Rogan-Gladen tiene la ventaja de obtener la prevalencia verdadera cuando se conoce la precisión de las pruebas diagnósticas (Nielsen y Toft, 2009). En la prevalencia verdadera al tomar en cuenta la sensibilidad y especificidad de la prueba diagnóstica, el IC muestra una mayor precisión del estimador comparado con el cálculo de prevalencia aparente que se obtiene solo con los resultados de la prueba (Rogan y Gladen, 1978).

En México los datos de prevalencia de PTB en otras regiones caprinas son menores a las encontrada en el estado de Puebla, en un estudio con rebaños caprinos de la Comarca Lagunera reportaron una seroprevalencia aparente de 14.82% a nivel de caprinos; y una frecuencia de 88.37% a nivel de rebaños (To-

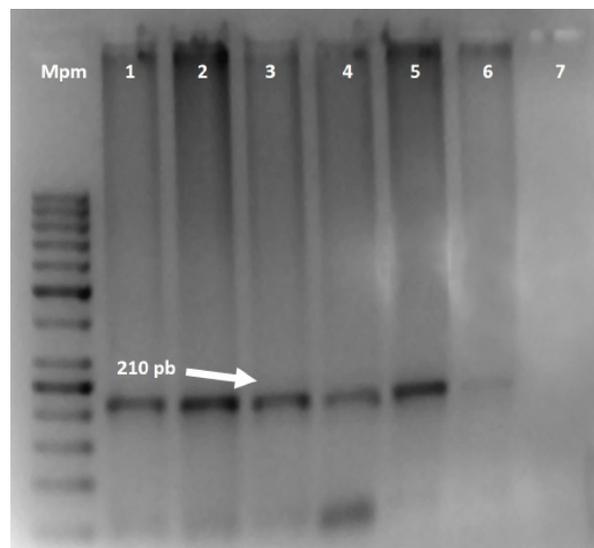


Figura 1. Producto de amplificación del PCR anidado a partir de extracción de ADN de heces de caprinos seropositivos. Gel de agarosa al 2.5% teñido con bromuro de etidio, en el que se observa en el primer carril el marcador de peso molecular 50 pb, carriles identificados del 1 al 7 producto de amplificación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

ledo et al. 2010). En un estudio epidemiológico de paratuberculosis caprina en los estados de Guanajuato, Puebla y Oaxaca, reportan frecuencias a nivel de rebaño de hasta 70.78% (Favila et al. 2009). En el estado de Guerrero, se reportó 27% de frecuencia en rebaños y 3% (41/122) en caprinos, cifras bajas en comparación con las del presente estudio debido a que los municipios muestreados de Guerrero en la Costa Chica tienen vías terrestres de difícil acceso debido a las condiciones geográficas del lugar y el comercio de los animales es muy local (Villalobos, 2010), mientras que en los municipios estudiados en el estado de Puebla hay introducción de animales de reemplazo procedentes de estados como son Veracruz, Tlaxcala e Hidalgo para la Zona de la Libres y del estado de Oaxaca, con una seroprevalencia aparente a nivel de rebaño de 53.27% (Favila et al. 2012) para la zona de la Mixteca poblana, todas estas evidencias demuestran que la paratuberculosis es una enfermedad endémica en México ya que se encuentra presente en los principales estados productores de caprinos.

En el presente estudio la especificidad (90%) no se encuentra dentro del rango óptimo recomendado (Nielsen y Toft, 2009), sin embargo, se considera que es una buena especificidad y tiene la ventaja de ser un ELISA de manufactura mexicana por lo que se evitan trámites de importación y se disminuyen los costos (Mercier, Baudry, Beaudeau, Seegers, Malher, 2010).

La prevalencia por animal encontrada en este estudio fue, a nivel individual de 28.0% (252/898), mientras que en un trabajo realizado en rebaños caprinos del estado de Guanajuato, reportaron una prevalencia de 9.87% (81/821) las condiciones de ambos estudios fueron diferentes ya que en este estudio se trabajó con rebaños caprinos intensivos cuyo fin zootécnico son producción de leche y pie de cría, la prueba diagnóstica que utilizó fue inmunodifusión en gel de agar (IDGA) que tiene la característica de presentar una baja sensibilidad ya que se presentan una mayor cantidad de animales falsos negativos (Saxegaard and Fodstad, 1985) en comparación con la técnica de ELISA que tiene mayor sensibilidad

(86%) y especificidad (90%) (Martínez, Santillán, Guzmán, Favila et al, 2012)

Otra posible explicación de la diferencia entre las prevalencias es que en Puebla se trabajó con rebaños caprinos de tipo extensivo, los resultados contrastan con datos publicados que indican que la prevalencia de paratuberculosis es mayor en rebaños de producción intensiva debido a factores como son: la cercanía y la convivencia entre las cabras, lo que favorece que cuando las cabras infectadas defecan eliminen el MAP contaminando el agua y el alimento, considerándose esto como la principal fuente de infección entre los animales.

El tamaño de muestra para este estudio se calculó a partir de datos de la población caprina en el estado de Puebla en 2008 del SIACON y del Comité de Fomento del estado de Puebla, debido a que no existe un censo caprino regional ni municipal, por lo que el determinar si la densidad de población caprina por municipio o región es un factor de riesgo, no fue posible; pero el conocimiento del valor de la densidad de población como un factor de riesgo de la PTB, se determinó con base en los tamaños poblacionales de los rebaños muestreados y su relación con la prevalencia de la enfermedad, sin encontrar diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$).

De acuerdo a los resultados obtenidos mediante la técnica de ELISA, la frecuencia por rebaño encontrada en los 17/19 municipios fluctuó entre 62.5 y 100 % y en los dos municipios restantes Chinantla y San Salvador fue de 33.3% y 25% respectivamente, si consideramos que la paratuberculosis presenta el efecto iceberg es decir de 15-25 animales infectados por cada animal que detecta como positivo la prueba diagnóstica, podemos concluir que el problema de la PTB caprina en Puebla está ampliamente diseminado. La investigación a nivel mundial sobre la paratuberculosis bovina es muy abundante, a diferencia de la situación que se presenta en los caprinos, donde los reportes en la literatura a nivel mundial y en México eran hasta hace poco tiempo casi inexistentes. El desconocimiento de la prevalencia y el impacto económico de esta enfermedad en la producción caprina nacional, puede agravar

o minimizar las consecuencias en los rebaños nacionales, situación que es muy similar en otros países. En Noruega se realizó en caprinos un estudio de frecuencia de la enfermedad en rastro durante un periodo de 15 años, donde se detectaron 50% de rebaños infectados y una tasa de infección individual de entre 4.7% y 9% (Saxegaard y Fodstad, 1985). Mientras que en los Estados Unidos se evaluaron 6 rebaños de California con un total de 238 caprinos, encontrándose 33.3% de rebaños infectados utilizando la técnica bacteriológica de cultivo a partir de heces y una prevalencia individual promedio de 3% con un rango de 6-10%, siendo los animales más viejos los infectados con mayor frecuencia (West et al. 1979).

Las pruebas basadas en inmunoensayos han tenido problemas con la sensibilidad y especificidad, debido a las similitudes que se presentan en la estructura molecular entre *M. paratuberculosis* y *M. avium* y otras *Mycobacterias* medioambientales, razón por la cual en este estudio se utilizó la pre-adsorción de los sueros con *M. phlei* para aumentar la sensibilidad de la prueba. En un estudio realizado para determinar la concordancia de las pruebas de PPD aviar, ELISA y PCR como diagnóstico de paratuberculosis caprina en un rebaño lechero de baja prevalencia (3.8%) determinada con IDGA encontraron que utilizando ELISA como prueba diagnóstica con el antígeno 3065 en el mismo rebaño, la prevalencia de PTB fue de 8% (24/298), resultados que reflejan que el ELISA nos ayuda a detectar una mayor cantidad de verdaderos positivos (Guzmán, Santillán, Morales, Jorge, et al, 2010).

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

mento del muestreo. Se detectó la presencia de MAP por medio de PCR en solo el 11.79% de las muestras (23/195) muestras de heces, similar a los resultados obtenidos por otros autores quienes obtuvieron 15.55% de positivos a PCR (7/45) (Dimareli-Malli, Stevenson, Sarris, Sossidou, 2009).

Es conocida la existencia de factores que afectan la capacidad de detección de la infección por medio de cultivo fecal, como son la excreción a través de las heces de forma intermitente y en escaso número de las bacterias, la contaminación de los cultivos por otros agentes, especialmente hongos, por lo que es altamente probable que los niveles de infección en los rebaños examinados por bacteriología sea mayor a la reportada en este estudio (Munjál, Boehmer, Beyerbach, Strutzberg-Minder, Homuth, 2004; Eamens, Walker, Porter, Fell, 2007). La especificidad del cultivo a partir de heces, leche o tejido es considerada de 100% (Timms, Gehringer, Mitchell, Daskalopoulos, Neilan, 2011).

En cultivos realizados a partir de heces de caprinos se reporta una sensibilidad de entre 25 (Dimareli-Malli and Sarris, 2001) y 0.38% (De Juan et al. 2006) y una especificidad del 0.91. Para explicar los resultados obtenidos en este estudio hay que considerar que en casos subclínicos se reporta baja sensibilidad de los métodos de ZN, cultivo y PCR y la PTB tiende a presentarse en su mayoría bajo condición subclínica. En cuanto a los factores de riesgo existe un estudio realizado en rebaños caprinos de Chile (Kruze, Salgado, Collins, 2007) en el que encontraron asociación entre el sistema de manejo de los rebaños y el estado de infección de los animales. Ya que todos los rebaños infectados se caracterizaban por sistema de manejo intensivo y de alta producción, sin medidas de control ni estrategias de diagnóstico. Las condiciones de los rebaños de Puebla difieren de las de los rebaños chilenos, en cuanto al tipo de sistema de producción, pero coincidían en lo referente a que no existen programas sanitarios y no se tienen medidas de control ni estrategias de diagnóstico para la paratuberculosis, sin embargo, los resultados obtenidos muestran 3.2 veces más

riesgo (RM=3.2) de ser seropositivos a PTB en producciones de engorda comparado con rebaños dedicados a la producción de cabrito. En terneros se menciona que al existir una alta prevalencia, es posible la transmisión vertical de madre a feto vía intrauterina y a través del calostro en las crías (Kruze et al. 2007). En el tipo de explotaciones estudiadas, no se puede determinar la probabilidad de infección en las crías de madres seropositivas debido a la cronicidad de la enfermedad y a que no se dio un seguimiento a los animales.

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

Existen antecedentes de que el principal factor de riesgo que favorece la presencia de PTB en caprinos, es la introducción de animales de reemplazo, sin embargo, esto está documentado en otros países y son referidos a rebaños intensivos dedicados a la producción lechera. Existen referencias que mencionan puntualmente que en los rebaños con un sistema de producción extensivo la importancia de este factor de riesgo disminuye, a pesar de que en Puebla, los reemplazos de los rebaños son del mismo hato o adquiridos de hatos vecinos que cohabitan diariamente en los pastizales y aguajes, al evaluar este factor de riesgo no fue significativo en este estudio. Si bien no es significativo, se debe tener en cuenta. En la evaluación de los factores de riesgo a nivel de rebaño se encontraron algunas variables que a pesar de no haberse podido demostrar una diferencia estadísticamente significativa muestran una tendencia a afectar la presentación de la enfermedad como: el origen de los caprinos (RM=1.43), la visita de perros de los vecinos a la explotación (RM=1.89) y hem-

bras de rebaños con dos épocas de parición (RM=1.35). Mientras que factores como el no ordeñar a las cabras (RM=0.60) muestran tendencia a ser un factor protector.

En el estudio de los factores de riesgo que favorecen la presencia de PTB en caprinos, lo más relevante fue encontrar una diferencia significativa mediante la prueba de Fisher (F=0.000426) entre animales con un mal estado de carnes los cuales son más propensos a presentar en comparación con los animales con un buen estado de carnes. El análisis también puso en evidencia que no hay diferencia entre sí los animales son hembras o machos para ser más susceptibles a la enfermedad, ya que el valor de RM=0.97 fue muy cercano al valor de nulidad. La epidemiología de la PTB dificulta la adopción de programas de control debido a que estos son a largo plazo, complicados de realizar, y de elevado costo. A todo esto se debe aunar el desconocimiento del estatus de la enfermedad en México y la inexperiencia que tienen los productores y los clínicos de campo sobre cómo controlar esta enfermedad. Los programas de control en otros países se basan en la implementación de medidas de prevención de la transmisión de los animales adultos a los jóvenes y en llevar a cabo pruebas de diagnóstico en todos los animales adultos del rebaño con el sacrificio de los animales reactivos para reducir la contaminación (Whittington et al. 2001). Sin embargo, en los países europeos en los que se aplican las medidas antes mencionadas, existen apoyos económicos para los productores al desechar animales positivos a PTB mientras que en nuestro país esto no ocurre.

CONCLUSIONES

En el presente estudio se demostró la presencia de paratuberculosis por la presencia de anticuerpos en los animales, apoyada por la identificación del agente etiológico con la PCR y el aislamiento bacteriológico. La ventaja de utilizar en estudios epidemiológicos de tipo transversal, un diagnóstico integrado, aunque es más costoso y tardado, resulta ser más adecuado y garantizar un diagnóstico certero de la paratuberculosis.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por el proyecto SAGARPA-CONACyT 48599 “Estudio epidemiológico de enfermedades que afectan la producción caprina en México” y la primera autora tuvo una beca de CONACyT para realizar sus estudios de posgrado.

REFERENCIAS

- Cannon, R.M. y Roe, R.T. (1982). Livestock Disease Surveys. A Field Manual for Veterinarians. Bureau of Resource Science, Department of Primary Industry. Australian Government Publishing Service, Canberra.
- Cuéllar, O.J.A., Tórtora, P.J., Trejo, G.A. y Román, R.P. (2012). La producción caprina mexicana, particularidades y complejidades. UNAM, SAGARPA
- De Juan L., Álvarez J., Romero B., Bezos J., Castellanos E., Aranaz A., Mateos A. 2006. Comparison of four different cultura media for isolation and growth of type II and type I/III *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains isolated from cattle and goats. *Appl Environ Microbiol*; 72, 5927-5932
- Dimareli-Malli Z & Sarris K. (2001). Comparison of DNA probe test and cultivation methods for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in caprine and ovine faeces. *Aust Vet J.*; 79(1):47-50
- Dimareli-Malli. Z., Stevenson, K., Sarris, K., & Sossidou, K. (2009). Study of microbiological and molecular typing aspects of paratuberculosis in sheep and goats in Northern Greece. *Transbound Emerg Dis*, 56, 285-290
- Eamens GJ, Walker DM, Porter NS, & Fell SA. (2007). Pooled faecal culture for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in goats. *Aust Vet J.* Jun; 85(6):243-51
- Erume, J., Spargser, J., & Rosengarten, R. (2001). Rapid detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from cattle and zoo animals by Nested PCR. *Afr Health Sci*, 1, 83-89
- Estévez, D.I., Hernández, C.R., Trujillo, G.A.M., & Chávez, G.G. (2006). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in goats and sheep flocks in Mexico. *Small Rumin Res*, doi:10.1016/j.smallrumres.2006.10.017
- Favila, H.L., Guzmán, R.C.C., Santillan, F.M.A., Díaz, A.E., Córdoba, L.D., Martínez C.A.G., et al. (2009). Estudio epidemiológico de la paratuberculosis caprina en Guanajuato Puebla y Oaxaca (resultados preliminares). *Memorias de XLV Reunión Nacional de Investigación Pecuaria*; octubre 19-24; Saltillo (Coahuila) México. 16 p
- Guzmán, R.C.C., Santillán, F.M.A., Morales, A.J., & Jorge, R.J.M. (2010). Aplicación del PPD aviar en el diagnóstico de la paratuberculosis caprina. *Memorias de XLVI Reunión Nacional de Investigación Pecuaria*; noviembre 22-27; Campeche (Campeche) México. 92 p
- Hernández, A.M. (2009). *Epidemiología Diseño y análisis de estudios*. Instituto Nacional de Salud Pública. 1ª reimpresión México: Editorial Médica Panamericana
- Hernández, J.S., Rodero, E., Herrera, M., Delgado, J.V., Barba C, & Sierra A. (2001). La caprinocultura en la Mixteca Poblana (México). Descripción e identificación de factores limitantes. *Archivos de Zootecnia*, 50, 231-239
- Kruze, J., Salgado, M., & Collins, M.T. (2007). Paratuberculosis en rebaños caprinos chilenos. *Arch. Med. Vet.*, 39,147-152
- Martínez, C.A., Santillán, F.M.A., Guzmán, R.C.C., Favila, H.L., Córdoba, L.D., Díaz, A.E., et al. (2012). Desarrollo de un inmuno-ensayo enzimático (ELISA) para el diagnóstico de paratuberculosis en bovinos. *Rev Mex Cienc Pec*, 3, 1-18
- Mercier, P., Baudry, C., Beaudeau, F., Seegers, H., & Malher, X. (2010). Estimated prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in herds of dairy goats in France. *Vet Rec*, 167, 412-415
- Merkal, R.S., & Curran, B.J. (1974). Growth and metabolic characteristics of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Appl Microbiol*, 28, 276-279
- Munjal, S.K., Boehmer, J., Beyerbach, M., Strutzberg-Minder, K., & Homuth, M. (2004). Evaluation of a LAM ELISA for diagnosis of paratuberculosis in sheep and goat. *Vet Microbiol*, 2, 107-114
- Nielsen, S.S., & Toft, N. (2009). A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. *Prev Vet Med*, 88:1-14
- Payuer, J.B., Jarnagin, J.L., Marquardt, J.G., Schaper, L.A., & Martin, B.M. (1993). Laboratory methods in veterinary mycobacteriology for the isolation and identification of mycobacteria. National Veterinary Service Laboratories Veterinary Services Animal and Plant Health Inspection Service United State Department of Agriculture. Ames, Iowa
- Ramírez, P.C., Ramírez, C.C., Valero, E.G., & Trigo, T.E. (1983). Paratuberculosis en cabras de México. *Téc Pec Méx*, 45, 104-106
- Ris, D., & Weaver, A. (1988). Natural transmission of Johne's disease to feral goats. *NZ Vet J*, 36-98
- Rogan, W.J., & Gladen, B. (2008). Estimating prevalence from the results of screening test. *American Journal of Epidemiology*, 10, 71-76
- Saxegaard, F., & Fodstad, F.H. (1985). Control de paratuberculosis (Johne's disease) in goats by vaccination. *Vet Rec*, 20, 439-441
- SIAP. (2014). Población ganadera de caprinos. Citado en Junio del 2014. En línea: http://www.campomexicano.gob.mx/portal_siap/Integracion/EstadisticaBasica/Pecuario/Poblacion-Ganadera/ProductoEspecie/caprino.pdf. 2014
- Sweeney, R.W. (1996). Transmission of paratuberculosis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract*, 12, 305-312
- Timms JV, Gehringer MM, Mitchell MH, Daskalopoulos G, & Neilan AB. (2011). How accurately can we *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection? *Journal of Microbiological Methods* 2011; 85:1-8
- Toledo, O.A., Favila, H.L.C., Díaz, A.E., Santillan, F.M.A., Lopez, C.D., et al. (2010). Seroprevalencia de paratuberculosis caprina en la Región Lagunera: resultados preliminares. *Memorias de XLVI Reunión Nacional de Investigación Pecuaria*; noviembre 22-27; Campeche (Campeche) México. 36 p
- Villalobos, S.I. (2011). Estudio epidemiológico de brucelosis y paratuberculosis caprina en la costa chica de Guerrero (tesis de licenciatura). DF (Ciudad de México) México: FMVZ-UNAM
- West, G., Agobo, M., Willeberg, P., Ruppanner, R., Aalund, O., et al. (1979). Paratuberculosis in California dairy goats. *Calif Vet*, 33, 28-31
- Whittington, R.J., Taragel, C.A., Ottaway, S., Marsh, I., Seaman, J., & Fridriksdottir, V. (2001). Molecular epidemiological confirmation and circumstances of occurrence of sheep (S) strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cases of paratuberculosis in cattle in Australia and sheep and cattle in Iceland. *Vet Microbiol*, 79, 311-322
- Yokomizo, Y., Yugi, H., & Merkal, R.S. (1985). A Method for Avoiding False- Positive Reactions in a Enzyme- Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for diagnosis of bovine paratuberculosis. *Japanese Society of Veterinary Science*, 47,111-119