



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

PROGRAMA DE POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y
PRODUCTIVIDAD

GANADERÍA

RIESGO DE LA PARATUBERCULOSIS (*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*) EN EL APARATO REPRODUCTOR Y SEMEN DE CARNEROS PELIBUEY

JOSÉ VICENTE VELÁZQUEZ MORALES

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2018

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe JOSÉ VICENTE VELÁZQUEZ MORALES, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser participe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor Dr. JUAN MANUEL CUCA GARCÍA, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis Riesgo de la paratuberculosis (Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis) en el aparato reproductor y semen de carneros Pelibuey y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 19 de JULIO de 2018



Firma del
Alumno (a)



Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada: **"RIESGO DE LA PARATUBERCULOSIS (*Mycobacterium avium* SUBSP. *paratuberculosis*) EN EL APARATO REPRODUCTOR Y SEMEN DE CARNEROS PELIBUEY"**, realizada por el alumno: **"JOSÉ VICENTE VELÁZQUEZ MORALES"** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



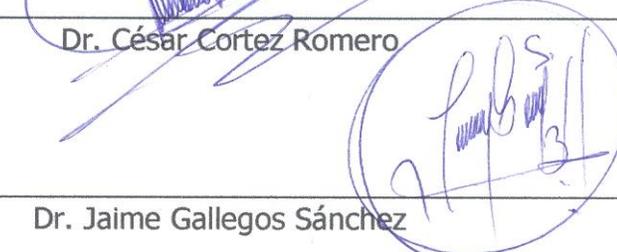
Dr. Juan Manuel Cuca García

DIRECTOR DE TESIS



Dr. César Cortez Romero

ASESOR



Dr. Jaime Gallegos Sánchez

ASESORA



Dra. María del Carmen Navarro Maldonado

ASESORA



Dra. Reyna Isabel Rojas Martínez

Montecillo, Texcoco, Estado de México, julio de 2018

RIESGO DE LA PARATUBERCULOSIS (*Mycobacterium avium* SUBSP. *paratuberculosis*) EN EL APARATO REPRODUCTOR Y SEMEN DE CARNEROS PELIBUEY

José Vicente Velázquez Morales, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2018

RESUMEN

La paratuberculosis (PTB) es una enfermedad distribuida mundialmente con prevalencia del 5 al 25 %. La importancia de conocer más sobre la diseminación de la enfermedad es debido a que el agente causal *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) es resistente a tratamientos con antibióticos y al manejo de criopreservación. Esto favorece la transmisión horizontal y vertical. En esta investigación, se plantearon los objetivos siguientes; 1) Evaluar el peso vivo, circunferencia escrotal, latencia de eyaculación y características seminales en carneros infectados naturalmente con MAP, en estado subclínico; 2) Evaluar el efecto de la restricción alimenticia a base de heno de avena (*Avena sativa*) en la manifestación de signos clínicos de paratuberculosis en carneros Pelibuey infectados naturalmente; 3) Identificar la presencia de MAP en tejido reproductivo y semen de carneros Pelibuey y 4) Mostrar la evidencia del posible riesgo e impacto, en la salud animal y humana, que puede generarse al hacer uso de rumiantes infectados. Los carneros infectados en estado subclínico no mostraron cambios en las variables de peso vivo, latencia al eyaculado y diámetro testicular. Tampoco se presentaron modificaciones en características seminales. La restricción alimenticia a base de heno de avena favoreció la transición de estado subclínico a clínico de paratuberculosis; la presencia de heces pastosas aumentó en un 42.9 % y se generó diarrea en un 28 %. Al final del periodo de la restricción alimenticia, la pérdida de peso en los carneros fue del 20.3 %. Se logró aislar e identificar a MAP en tejido linfático, digestivo y en semen. Y por primera vez, se reporta la presencia de PTB en epidídimo, glándula de Cowper, próstata y testículos de carneros Pelibuey. En este estudio se determinó que, la paratuberculosis no ocasiona cambios en las características seminales de los carneros de raza Pelibuey, así mismo, la alimentación de bajo nivel nutricional favorece la expresión de signos clínicos de PTB. Por último, se confirma que los carneros enfermos en estado subclínico son un factor de riesgo para propagar la enfermedad de manera horizontal a la hembra y vertical a los corderos, ya que MAP es capaz de infectar tejidos, órganos reproductivos y semen. Por lo tanto, es de gran importancia realizar estudios de diagnóstico y de manejo profiláctico, para disminuir el riesgo de transmisión de PTB.

Palabras clave: Paratuberculosis, carneros, restricción alimenticia, tejidos, semen.

RISK OF PARATUBERCULOSIS (*Mycobacterium avium* SUBSP. *paratuberculosis*) IN THE REPRODUCTIVE SYSTEM AND SEMEN OF PELIBUEY RAMS

José Vicente Velázquez Morales, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2018

ABSTRACT

Paratuberculosis (PTB) is a worldwide distributed disease with a prevalence of 5 to 25%. The importance of knowing more about the spread of the disease is due to the causative agent *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) is resistant to antibiotic treatments, environmental conditions and management of cryopreservation. This favors horizontal and vertical transmission. In this research, the following aims were raised; 1) Evaluate live weight, scrotal circumference, ejaculation latency and seminal characteristics in rams naturally infected with MAP, in a subclinical state; 2) Evaluate the effect of food restriction based on oats hay (*Avena sativa*) in the manifestation of clinical signs of paratuberculosis in naturally infected Pelibuey rams; 3) Identify the presence of MAP in reproductive tissue and semen of Pelibuey rams and 4) Show the evidence of the possible risk and impact on animal and human health, which can be generated by using infected ruminants. Rams infected with PTB in the subclinical state did not show changes in the variables of live weight, ejaculate latency and testicular diameter. There were no changes in seminal characteristics either. The food restriction based on oats hay favored the transition from subclinical to clinical state of paratuberculosis; the presence of pasty stools increased by 42.9 % and diarrhea was generated by 28 %. At the end of the food restriction period, weight loss in rams was 20.3%. It was possible to isolate and identify MAP in lymphatic, digestive and semen tissue. And for the first time, the presence of PTB is reported in epididymis, Cowper gland, prostate and testicles of Pelibuey rams. This study determined that paratuberculosis does not cause changes in the seminal characteristics of Pelibuey rams, and that low nutritional nutrition favors the expression of clinical signs of PTB. Finally, it is confirmed that sick rams in a subclinical state are a risk factor to spread the disease horizontally to females and vertical to lambs, since MAP is capable of infecting tissues, reproductive organs and semen. Therefore, it is very important to carry out diagnostic and prophylactic management studies to reduce the risk of transmission of this disease.

Keywords: Paratuberculosis, rams, food restriction, tissues, semen.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el financiamiento de la beca otorgada para la realización de mi doctorado en Recursos Genéticos y Productividad – Ganadería, en el Colegio de Postgraduados. Así mismo, agradezco al Colegio de Postgraduados por haberme dado el apoyo necesario para realizar el doctorado. De igual manera agradezco la capacitación técnica realizada en Laboratorio de Tuberculosis a cargo del Dr. Marco Antonio Santillán Flores, en el CENID-Microbiología animal, perteneciente al INIFAP.

La presente tesis no se hubiese podido realizar sin la colaboración e interés de mis asesores, les agradezco por haber compartido su tiempo en días y en horarios no laborales, por haber compartido sus recursos sin esperar nada a cambio y por compartir sus conocimientos adentro y a fuera del aula. El seguir su ejemplo es un vasto camino por recorrer lleno de perseverancia, dedicación y de entereza, gracias por confiar en este proyecto de investigación y de vida.

Afortunadamente, el llegar a esta meta personal ha sido un grato camino que ha involucrado el acompañamiento de muchas amistades, las cuales han llegado a ser más que solo compañeros de aulas o de trabajo, me siento afortunado de haber creado muchas historias con ustedes, gracias por su amistad la cual en muchas ocasiones fue un punto de apoyo y de motivación.

A todos ustedes gracias, porque esta meta es fruto de un trabajo compartido.

DEDICATORIA

A mi par de Ángeles que siempre me han cuidado en todo momento, a toda mi familia porque sin ellos no hubiese podido llegar hasta este momento. Gracias...

CONTENIDO

RESUMEN.....	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
CAPÍTULO 1. ANÁLISIS DE LAS CARACTERÍSTICAS SEMINALES DE CARNEROS PELIBUEY INFECTADOS CON <i>Mycobacterium avium</i> SUBSP. <i>paratuberculosis</i> EN ESTADO SUBCLÍNICO	5
1.1 RESUMEN.....	5
1.2 INTRODUCCIÓN	6
1.3 MATERIALES Y MÉTODOS	8
1.3.1 Alojamiento y animales.....	8
1.3.2 Diagnóstico de PTB.....	9
1.3.3 Mediciones de variables reproductivas y colecta del eyaculado	9
1.3.4 Evaluación del semen.....	10
1.3.5 Análisis estadístico.....	11
1.4 RESULTADOS	12
1.4.1 Peso vivo, circunferencia escrotal y latencia de eyaculación.....	12
1.4.2 Calidad seminal	13
1.5 DISCUSIÓN.....	15
1.6 LITERATURA CITADA.....	19
CAPÍTULO 2. RESTRICCIÓN ALIMENTICIA Y SU EFECTO EN LA MANIFESTACIÓN DE SIGNOS CLÍNICOS DE PARATUBERCULOSIS EN SEMENTALES OVINOS.....	24
2.1 RESUMEN	24
2.2 INTRODUCCIÓN	25
2.3 MATERIALES Y METODOS.....	28
2.3.1 Ubicación del estudio.....	28
2.3.2 Animales	29
2.3.3 Colecta de muestras	29
2.3.4 Diagnóstico de PTB.....	30
2.3.5 Análisis serológico.....	30
2.3.6 Extracción de ADN y procedimiento de PCR anidada	30
2.3.7 Alimentación.....	31
2.4 RESULTADOS.....	31

2.5 DISCUSIÓN	33
2.6 LITERATURA CITADA.....	36
CAPÍTULO 3. DETECCIÓN DEL <i>Mycobacterium avium</i> SUBSP. <i>paratuberculosis</i> EN TEJIDO REPRODUCTIVO Y SEMEN DE CARNEROS INFECTADOS NATURALMENTE	41
3.1 RESUMEN	41
3.2 INTRODUCCIÓN	42
3.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
3.3.1 Área de estudio.....	44
3.3.2 Animales	44
3.3.3 Colecta de muestras	45
3.3.4 Análisis serológico.....	46
3.3.5 Extracción de ADN y procedimiento de PCR anidada	46
3.3.6 Cultivo de MAP	47
3.4 RESULTADOS	47
3.5 DISCUSIÓN.....	51
3.6 LITERATURA CITADA.....	54
CAPÍTULO 4. RIESGO E IMPACTO DEL <i>Mycobacterium avium</i> SUBSP. <i>paratuberculosis</i> EN RUMIANTES (Propuesta para revisión de literatura)	58
4.1 RESUMEN	58
4.2 INTRODUCCIÓN	59
4.3 <i>Mycobacterium avium</i> SUBSP. <i>paratuberculosis</i> (MAP).....	61
4.4 TIPOS DE CEPA	62
4.5 PRINCIPALES TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE <i>Mycobacterium avium</i> SUBSP. <i>paratuberculosis</i>	63
4.6 CULTIVO DE <i>Mycobacterium avium</i> SUBSP. <i>paratuberculosis</i>	64
4.7 ENSAYO POR INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ELISA).....	65
4.8 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	65
4.9 TRANSMISIÓN HORIZONTAL.....	66
4.10 TRANSMISIÓN VERTICAL.....	68
4.11 RIESGO DE MAP EN LA SALUD PÚBLICA.....	71
4.12 IMPACTO ECONÓMICO DE LA PARATUBERCULOSIS	71
4.13 CONCLUSIONES.....	74
4.14 LITERATURA CITADA	74
CONCLUSIONES GENERALES	81

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Título	Página
1.1	Peso vivo, circunferencia escrotal y latencia de eyaculación en carneros Pelibuey con y sin PTB en estado subclínico.	13
1.2	Características seminales en carneros Pelibuey con y sin PTB en estado subclínico.	14
3.1	Resultados obtenidos por nPCR y ELISA en carneros Pelibuey infectados naturalmente con PTB, al inicio y al final de la restricción alimenticia.	32
3.2	Signos clínicos y pérdida de peso de carneros Pelibuey infectados naturalmente con PTB, al inicio y al final de la alimentación con paja de avena.	33
3.3	Presencia de <i>Mycobacterium avium</i> subsp. paratuberculosis en muestras de tejido y semen.	50
4.1	Impacto económico anual de la paratuberculosis bovina por variable y por estrato del Complejo Agropecuario Industrial Tizayuca, Hidalgo, México.	74

LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1.1	Mediciones realizadas semanalmente durante dos meses de peso vivo y circunferencia escrotal de carneros Pelibuey con y sin PTB en estado subclínico.	12
1.2	Mediciones realizadas semanalmente durante dos meses, de volumen de semen y concentración de espermatozoides de carneros Pelibuey con y sin PTB en estado subclínico.	14
1.3	Mediciones realizadas semanalmente durante dos meses de movilidad individual progresiva y movilidad masal de espermatozoides de carneros Pelibuey con y sin PTB en estado subclínico.	15
3.1	Amplificación de ADN por nPCR en muestras de semen proveniente de carneros infectados con PTB en electroforesis en gel de agarosa (1.5 %).	48
3.2	Tinción de Ziehl-Neelsen (ZN) a partir de los aislamientos obtenidos de los cultivos bacteriológicos.	49

INTRODUCCIÓN GENERAL

La paratuberculosis (PTB) es una enfermedad propia de ganado bovino, caprino, ovino y puede presentarse en todos los rumiantes, debido a que *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) posee una gran capacidad para infectarlos (Chiodini *et al.*, 1984). A pesar de que la enfermedad afecta principalmente a rumiantes, se ha considerado, el vínculo entre la enfermedad de Johne y la enfermedad de Crohn en humanos (Garcia y Shalloo, 2015). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* es una micobacteria intracelular de lento crecimiento, gram positiva, anaerobia, que para su crecimiento *in vitro* es dependiente de la micobactina (Ayele *et al.*, 2001). Dentro de las características principales de la patogénesis, está su habilidad para sobrevivir y replicarse dentro del macrófago (Stempler y Mundo , 2010).

La PTB es una enfermedad crónica consuntiva e incurable, causa severa gastroenteritis crónica granulomatosa con linfangiectasis y linfangitis asociada, cuya consecuencia final es la aparición del síndrome de malnutrición, con pérdida de peso, diarrea crónica o intermitente y eventualmente la muerte (Chiodini *et al.*, 1984; Whittington *et al.*, 2012). Las lesiones se desarrollan principalmente en íleon, yeyuno, intestino delgado terminal, ciego, cólon y nódulos linfáticos mesentéricos (Clarke, 1997). No obstante, el MAP se ha identificado en sitios extraintestinales como el tracto reproductivo y semen en toros (Larsen y Kopecky, 1970; Larsen *et al.*, 1981; Ayele *et al.*, 2004; Khol *et al.*, 2010) y en semen de carneros (Eppleston y Whittington, 2001). Los signos clínicos usualmente se desarrollan en meses o años

después de la exposición inicial al MAP; con un periodo de incubación cercano a los dos años en los pequeños rumiantes (Whittington *et al.*, 2012). Sin embargo, se ha considerado que factores que ocasionan estrés como la alimentación con bajo nivel nutricional, infección parasitaria, viral o bacteriana, pueden influir en la transición del estado subclínico al estado clínico de PTB (Ayele *et al.*, 2001). Inicialmente, la PTB genera lesiones restringidas a las paredes del intestino delgado y nódulos linfáticos mesentéricos, cuando la enfermedad progresa, se genera inflamación difusa granulomatosa, con un número variable de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) Clarke, (1997).

Debido a que el MAP se elimina a través de las heces (Windsor y Whittington 2010; Pritchard *et al.*, 2017); se puede generar transmisión horizontal de MAP, de individuos infectados a sanos, la cual se adquiere por las vías fecal-oral con el consumo de calostro, agua, insectos, vía sexual e inclusive, la transmisión vertical transplacentaria (Khol *et al.*, 2010, Windsor y Whittington 2010, Rindi y Garzelli 2014).

La vigilancia del MAP está basada en su detección oportuna y control, para lo cual se necesitan técnicas de diagnóstico específicas que permitan localizar los focos de infección (Jaimes *et al.*, 2008). Las pruebas más comúnmente utilizadas para la identificación de animales infectados, para la estimación de prevalencia y para programas de control de la enfermedad son el cultivo fecal, el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) sérico y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en heces (Garcia y Shaloo, 2015). Por lo tanto, es de gran

importancia realizar estudios que estimen los riesgos que implica la presencia de MAP en órganos, tejidos reproductivos y semen en carneros infectados naturalmente, con la finalidad de evitar la transmisión de MAP vía semen. Los objetivos de esta investigación fueron; Evaluar si la paratuberculosis en estado subclínico afecta el peso vivo, circunferencia escrotal, latencia de eyaculación y características seminales en carneros Pelibuey infectados naturalmente con MAP, evaluar el efecto de la alimentación con baja calidad nutricional con respecto a la manifestación de signos clínicos de PTB, identificar la presencia de MAP en tejido reproductivo y semen, y mostrar la evidencia del posible riesgo e impacto, en la salud animal y humana, generado al hacer uso de rumiantes infectados con PTB.

LITERATURA CITADA

- Ayele, W.Y., Macháčková, M. and Pavlík, I., 2001. The transmission and impact of paratuberculosis infection in domestic and wild ruminants, *Veterinarni Medicina*. 46, 205–224.
- Ayele, W. Y., Bartos, M., Svastova, P., and Pavlik, I. (2004). Distribution of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in organs of naturally infected bull-calves and breeding bulls. *Veterinary Microbiology*, 103(3–4), 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.07.011>.
- Chiodini, R. J., Van Kruiningen, H. J., and Merkal, R. S. (1984). Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): The current status and future prospects. *The Cornell Veterinarian*, 74(2), 218–262.
- Clarke, C. J. (1997). The Pathology and Pathogenesis of Paratuberculosis in Ruminants and Other Species. *Journal of Comparative Pathology*, 116(3), 217–261.
- Garcia, A. B., and Shalloo, L. (2015). Invited review: The economic impact and control of paratuberculosis in cattle. *Journal of Dairy Science*, 98(8), 5019–39. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-9241>.

- Jaimes, G.N., Santillán, F.M.A., Hernández, C.O.A., Córdova, L.D., Guzmán, R.C.C., Arellano, R.B., Díaz, A.E., Tenorio, G.V.R., Cuéllar, O.A. (2008). Detección de *Mycobacterium avium* subespecie paratuberculosis, por medio de PCR-anidada a partir de muestras de heces de ovinos. *Veterinaria México*, 39(01), 377–386.
- Khol, J. L., Kralik, P., Slana, I., Beran, V., Aurich, C., Baumgartner, W., and Pavlík, I. (2010). Consecutive Excretion of *Mycobacterium avium* Subspecies paratuberculosis in Semen of a Breeding Bull Compared to the Distribution in Feces, Tissue and Blood by IS900 and F57 Quantitative Real-Time PCR and Culture Examinations. *Journal of Veterinary Medical Science*, 72(10), 1283–1288.
- Larsen, A. B., and Kopecky, K. E. (1970). *Mycobacterium paratuberculosis* in reproductive organs and semen of bulls. *American Journal of Veterinary Research*, 31, 255–258.
- Larsen, A., Stalheim, O., Hughes, D., Appell, L., Richards, W., and Himes, E. (1981). *Mycobacterium paratuberculosis* in the semen and genital organs of a semen-donor bull. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 179(2), 7263470.
- Eppleston, J., and Whittington, R. (2001). Isolation of *Mycobacterium avium* subsp paratuberculosis from the semen of rams with clinical Johne's disease. *Australian Veterinary Journal*, 79(11), 776–777.
- Rindi, L., and Garzelli, C. (2014). Genetic diversity and phylogeny of *Mycobacterium avium*. *Infection, Genetics and Evolution*, 21, 375–383. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.12.007>.
- Stempler, A., and Mundo, S. L. (2010). Inmunodetección de p34 de *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis en macrófagos bovinos infectados. *Revista Argentina de Microbiología*, 42, 236.
- Whittington, R. J., Begg, D. J., Silva, K. De, Plain, K. M., and Purdie, A. C. (2012). Comparative immunological and microbiological aspects of paratuberculosis as a model mycobacterial infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 148(1–2), 29–47. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.03.003>

CAPÍTULO 1. ANÁLISIS DE LAS CARACTERÍSTICAS SEMINALES DE CARNEROS PELIBUEY INFECTADOS CON *Mycobacterium avium* SUBSP. *paratuberculosis* EN ESTADO SUBCLÍNICO

1.1 RESUMEN

La paratuberculosis (PTB) es una enfermedad crónica consuntiva incurable asociada a diarrea crónica o intermitente, síndrome de mal nutrición, pérdida de peso y eventualmente la muerte; siendo el agente causal el *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). Los signos clínicos de la PTB se manifiestan en meses o años después de la exposición. En el estado subclínico de la enfermedad, el MAP genera lesiones restringidas a las paredes del intestino delgado y nódulos linfáticos mesentéricos. No obstante, se desconoce si el MAP tiene afectación en características reproductivas y calidad de semen en carneros infectados naturalmente, lo cual representaría un riesgo de transmisión horizontal, ya que genera la posibilidad de propagar la enfermedad a un gran número de hembras, dado que el semental no presenta los signos clínicos evidentes de la PTB. Con la finalidad de mostrar si la paratuberculosis afecta las variables reproductivas y la calidad seminal en carneros Pelibuey infectados naturalmente con MAP en estado subclínico, se realizaron evaluaciones semanales durante dos meses de las variables de peso vivo (PV), circunferencia escrotal (CE), latencia de eyaculación (LE) y características seminales (volumen, pH, movilidad masal e individual progresiva, concentración, espermatozoides vivos y muertos) en cinco carneros infectados y cinco no infectados por MAP, con peso y edad promedio de 53.58 kg (± 3.26) y 2.91 años (± 0.59), respectivamente; los cuales fueron diagnosticados por el ensayo serológico por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Los animales

infectados con PTB, incluidos en el estudio, no mostraron cambios en las variables PV, LE y DT así como tampoco hubo modificación en las variables seminales.

Palabras clave: Paratuberculosis ovina, evaluación seminal, carneros Pelibuey.

1.2 INTRODUCCIÓN

La PTB es una enfermedad crónica debilitante incurable, causa gastroenteritis crónica granulomatosa con linfangiectasis y linfangitis. Los animales infectados con PTB, presentan una diarrea crónica o intermitente, hipoproteinemia, pérdida de peso y eventualmente la muerte, el agente etiológico es *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) y afecta principalmente a rumiantes domésticos y silvestres (Chiodini *et al.*, 1984). La vía principal de transmisión de MAP es fecal-oral (Clarke 1997; Whittington y Windsor 2009). Las lesiones que ocasiona MAP pueden presentarse 12 meses antes de que los signos clínicos de PTB sean evidentes (Mcgregor *et al.*, 2015). La progresión y el desenlace de la enfermedad varía considerablemente de manera individual; los signos clínicos generalmente se desarrollan durante meses o años después de la exposición, dependiendo de la especie; en ovinos y caprinos el periodo la etapa subclínica de la PTB tiende a ser más corto en comparación con los bovinos, aunque no hay un marco de tiempo definido (Whittington *et al.*, 2012). Así mismo, se considera que los casos clínicos son la punta del iceberg, ya que se estima que por cada caso clínico detectado hay al menos otros 25 animales que pueden estar infectados, sin manifestar signos clínicos (Whitlock y Buergelt 1996). Sin embargo, se ha mencionado que, factores que ocasionan estrés como la desnutrición, infección parasitaria, viral y/o

bacteriana, pueden influir en la transición del estado subclínico al estado clínico de PTB (Ayele *et al.*, 2001).

La tasa de prevalencia de PTB se encuentra entre el 5 y el 30 %, principalmente en bovinos, cabras, ovejas y toros de lidia (Guzmán-Ruiz *et al.*, 2016). Chávez-Gris *et al.*, (2004) informaron prevalencia de PTB del 4.4 % en ovinos (*Ovis aries*) en los estados de Querétaro y Guanajuato, México. De esta manera, Stau *et al.*, (2012) mencionaron que, la prueba diagnóstica que se utiliza con mayor frecuencia es la prueba de ELISA, la cual ha sido utilizada para detectar anticuerpos para MAP, ya que tiene un costo bajo, es fácil la colecta de muestras y la realización de la prueba, con poco riesgo de contaminación y los resultados se obtienen en menor tiempo que con otras pruebas diagnósticas. En unidades de producción de semen bovino, se ha detectado un 20 % de seroprevalencia, lo cual genera la posibilidad de propagar la enfermedad a un gran número de hembras durante la inseminación artificial (Abbas *et al.*, 2011); esto podría suceder también en los ovinos, ya que se ha indicado la presencia de MAP en semen de carneros infectados (Eppleston y Whittington, 2001). Ayele *et al.* (2004) encontraron que, el uso de sementales infectados con PTB puede ser un riesgo para la diseminación de la micobacteria vía semen; debido a que se ha reportado la presencia de MAP en testículos, epidídimo, vesículas seminales y semen de bovinos infectados en estado subclínico. En el caso de ovinos, Eppleston y Whittington (2001) indicaron la presencia de MAP en linfonodos mesentéricos, íleon y en semen. Por lo que en cuanto a las afectaciones que ocasiona PTB al semen, Khol *et al.*, (2010) informaron disminución en la movilidad, integridad de la membrana y en la morfología del espermatozoide normal

en un bovino infectado durante la transición de estado subclínico a clínico de la enfermedad. Sin embargo, no hay estudios que demuestren si PTB afecta las características seminales en carneros infectados naturalmente en estado subclínico, lo cual representa un riesgo con el uso del semen ovino en programas de mejora genética. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar el peso vivo (PV), circunferencia escrotal (CE), latencia de eyaculación (LE) y características seminales en carneros infectados naturalmente con MAP, en estado subclínico.

1.3 MATERIALES Y MÉTODOS

1.3.1 Alojamiento y animales

El experimento se realizó en corrales de observación y aislamiento pertenecientes al rebaño de ovinos del Campus Córdoba del Colegio de Postgraduados (COLPOS); unidad de investigación y estudio, con antecedentes de prevalencia de PTB, los carneros se mantuvieron en instalaciones diferentes, en corrales separados, para evitar una posible infección, bajo las mismas condiciones de manejo de tipo intensivo. Lo cual permite realizar protocolos de control y prevención de ovinos infectados naturalmente. Localizado sobre la carretera federal Córdoba-Veracruz, km 384, Congregación Manuel León, Municipio de Amatlán de los Reyes, Veracruz, con localización geográfica en 18°51'20" N y 96°51'37" O a una altitud de 720 m, el clima es cálido subhúmedo, con temperatura promedio de 18 °C, con precipitación anual de 1,807.3 mm (García, 2004). Se utilizaron diez carneros de la raza Pelibuey; cinco infectados con PTB en estado subclínico y cinco no infectados, con un peso y

edad promedio de 53.58 ± 3.26 kg, y 2.91 ± 0.59 años, respectivamente. A cada carnero por día, se le proporciono 2 kg con heno de alfalfa (18 % PC) con 200 g de concentrado (14 % PC; 1.7 EM/kg), el agua fue proporcionada a libre acceso. El experimento fue diseñado bajo los criterios de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) sobre especificaciones técnicas, para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio en concordancia a las regulaciones para el uso y cuidado de animales de investigación, aprobado por el Consejo General Académico del Colegio de Postgraduados, México.

1.3.2 Diagnóstico de PTB

Para realizar el diagnóstico de la infección y la no infección a MAP en los carneros Pelibuey, se realizó la prueba serológica de ELISA, al inicio y al final de la fase experimental. Esta prueba presenta una sensibilidad del 79.31 % y una especificidad del 82.25 %, según la metodología descrita por Martínez-Covarrubias *et al* (2012), en donde los valores mayores a 0.196 densidades ópticas se consideraron como positivos. La prueba se realizó a partir de muestras sanguíneas obtenidas por punción en la vena yugular. La recuperación del suero sanguíneo fue por centrifugación a $1000 \times g$ durante 10 min, el cual se mantuvo a -20°C , hasta su procesamiento en el laboratorio del CENID–Microbiología, perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

1.3.3 Mediciones de variables reproductivas y colecta del eyaculado

Se realizaron ocho mediciones durante la época reproductiva (meses de octubre y noviembre), semanalmente y por las mañanas, de circunferencia escrotal, latencia

de eyaculación y colecta del semen. La medición del peso vivo (PV) y de la circunferencia escrotal (CE) se realizaron antes de iniciar la colecta del semen. Para el caso del PV, se usó una báscula electrónica con capacidad de 250 Kg \pm 100 g (Braunker YP200S); para la medición de la CE, se utilizó un escrotímetro metálico flexible, según la metodología indicada por Benmoula *et al.*, (2017) y la medición de la latencia de eyaculación (LE) se realizó según lo propuesto por Swelum *et al.*, (2017). Antes de iniciar la colecta del semen, se realizó el recorte de pelos prepuciales, el lavado prepucial se realizó con jabón líquido antiséptico y desinfectante (Dermocleen^{MR}). Las muestras seminales de cada individuo se obtuvieron por el método de la vagina artificial de acuerdo a lo establecido por Williams *et al.*, (2001).

1.3.4 Evaluación del semen

Inmediatamente después de la recolección del semen, se realizó la evaluación de la calidad seminal con pruebas macroscópicas y microscópicas. Las variables de la evaluación seminal fueron: volumen (V, mL) movilidad masal (MM, clasificación del 0 al 5), porcentaje de movilidad individual progresiva (MIP, %), concentración espermática (C; valor $\times 10^6$ espermatozoides/ mL), porcentaje de espermatozoides vivos (EV, %), porcentaje de espermatozoides muertos (EM, %) y pH (valores de 0 a 14). La examinación del V (mL), la MIP y la estimación de MM, se realizó bajo el protocolo de Benmoula *et al.* (2017). La apreciación del V se realizó en tubos colectores graduados de 15 mL mantenidos a una temperatura de 37 °C. La MIP se realizó al microscopio (objetivo de 400 x), asignando valores en porcentaje de 0 a

100. Para determinar la MM, se observó el semen al microscopio (objetivo de 10 x) (Carl ZEISS, Primo Star, CP11406, Microimaging GmbH 37081, Gottingen, Germany, Serie-Nr: 3125001511), asignando valores de 0 (movilidad nula) a 5 (movilidad vigorosa). El porcentaje de EV, EM y C se realizó según la metodología de Ogundele *et al.*, (2016); el cálculo de EV y EM se realizó a partir de un frotis teñido con la técnica de tinción de eosina-nigrosina, donde se contaron al menos 200 espermatozoides con microscopio de campo claro (400 x). La C se determinó por el método de hemocitómetro, visualizando el semen (objetivo de 40 x) en la cámara de Neubauer (Marienfeld®). Para realizar la medición de pH, se utilizaron tiras reactivas de papel (Mancherey-Nagel GmbH y Co. KG) con un intervalo de pH de 0 a 14 (El-Tohamy *et al.*, 2012).

1.3.5 Análisis estadístico

El diseño experimental fue un modelo completamente al azar con mediciones repetidas en el tiempo. Se utilizaron como efecto fijo, animal infectado y como efecto aleatorio, cada animal anidado en el tratamiento con o sin PTB. Para el análisis de todas las variables, se utilizó el procedimiento Mixed del paquete estadístico SAS® (SAS Institute, 2006). La comparación de medias se realizó con prueba Tukey, con un nivel de significancia de $P \leq 0.05$.

1.4 RESULTADOS

1.4.1 Peso vivo, circunferencia escrotal y latencia de eyaculación

Las variables de PV, CE (Figura 1.1) y LE en los carneros infectados y no infectados con MAP se muestran en el Cuadro 1.1, sin embargo, la PTB en estado subclínico no afectó a estas variables ($p>0.05$).

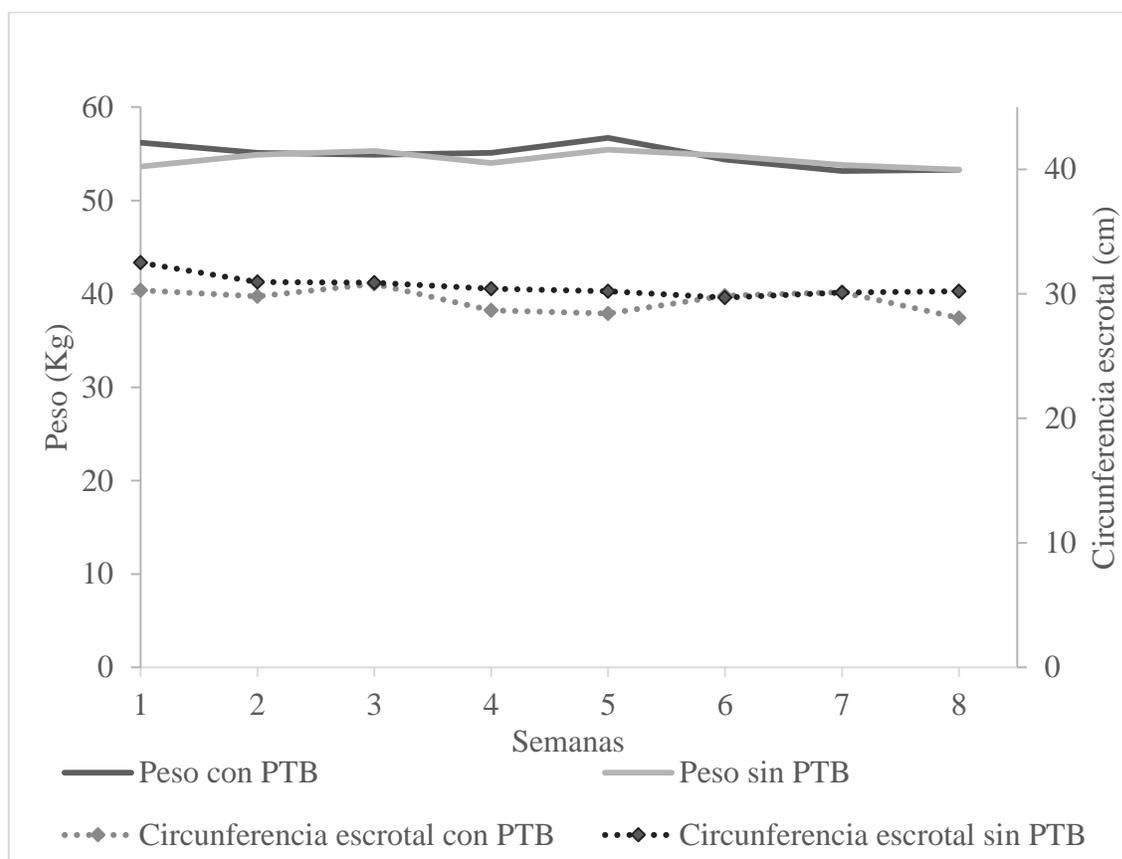


Figura 1.1. Mediciones realizadas semanalmente durante dos meses de peso vivo y circunferencia escrotal de carneros Pelibuey con y sin PTB en estado subclínico.

Cuadro 1.1. Peso vivo, circunferencia escrotal y latencia de eyaculación en carneros Pelibuey con y sin PTB en estado subclínico.

Animales	Variables		
	Peso (kg)	Circunferencia escrotal (cm)	Latencia de eyaculación (s)
Con PTB	54.3± 3.2	28.6 ± 1.47	48.8 ± 8.09
Sin PTB	54.5 ± 3.2	30.4 ± 1.47	40.7 ± 8.02

No hubo diferencias entre tratamientos (Tukey; $p>0.05$). Media \pm error estándar.

1.4.2 Calidad seminal

La calidad del eyaculado no mostró variación entre los sementales no infectados e infectados con PTB ($p > 0.05$; Cuadro 1.2), durante los dos meses que duró la prueba. Las mediciones repetidas de V y C se muestran en la Figura 1.2, donde se puede apreciar que no se encontró variación en dichas variables a través del tiempo por efecto de la PTB ($p>0.05$). Por su parte, la PTB tampoco influyó en los valores de las mediciones repetidas en el tiempo de las variables MM y MIP ($p>0.05$; Figura 1.3). Y en las mediciones de LE (Cuadro 1), pH, EV y EM (Cuadro 1.2) realizadas durante los dos meses que duró la prueba ($p>0.05$).

Cuadro 1.2. Características seminales en carneros Pelibuey con y sin PTB en estado subclínico.

Variables	Sementales	
	Con PTB	Sin PTB
Volumen (mL)	0.9 ± 0.09	0.9 ± 0.09
pH	6.9 ± 0.13	6.9 ± 0.13
Movilidad masal (0-5)	3.8 ± 0.21	4.2 ± 0.20
Movilidad individual progresiva (%)	82.7 ± 2.83	85.5 ± 2.76
Concentración (10 ⁶ espermatozoides/ mL)	2,420 ± 425.4	2,634 ± 425.4
Espermatozoides vivos (%)	83.2 ± 5.8	81.3 ± 5.8
Espermatozoides muertos (%)	16.7 ± 5.8	18.7 ± 5.8

No hubo diferencias entre tratamientos (Tukey; $p > 0.05$). Media ± error estándar.

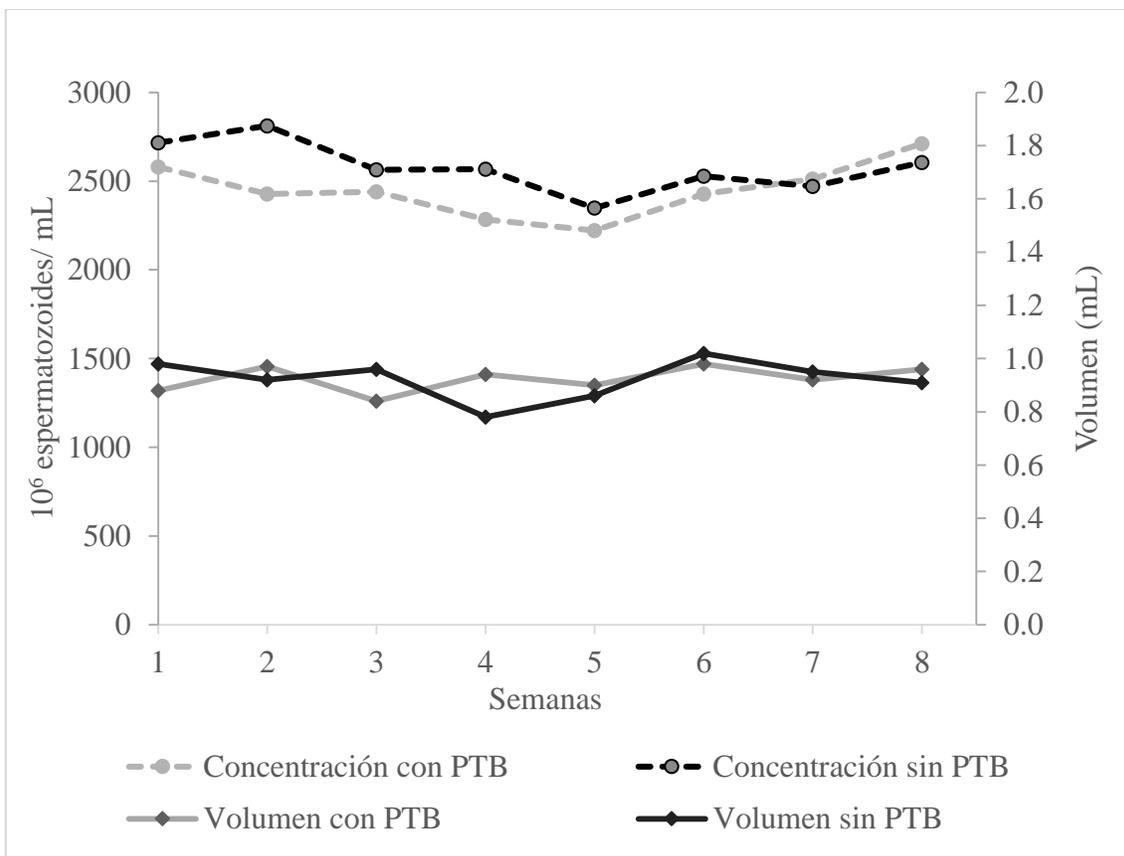


Figura 1.2. Mediciones realizadas semanalmente durante dos meses, de volumen de semen y concentración de espermatozoides de carneros Pelibuey con y sin PTB en estado subclínico.

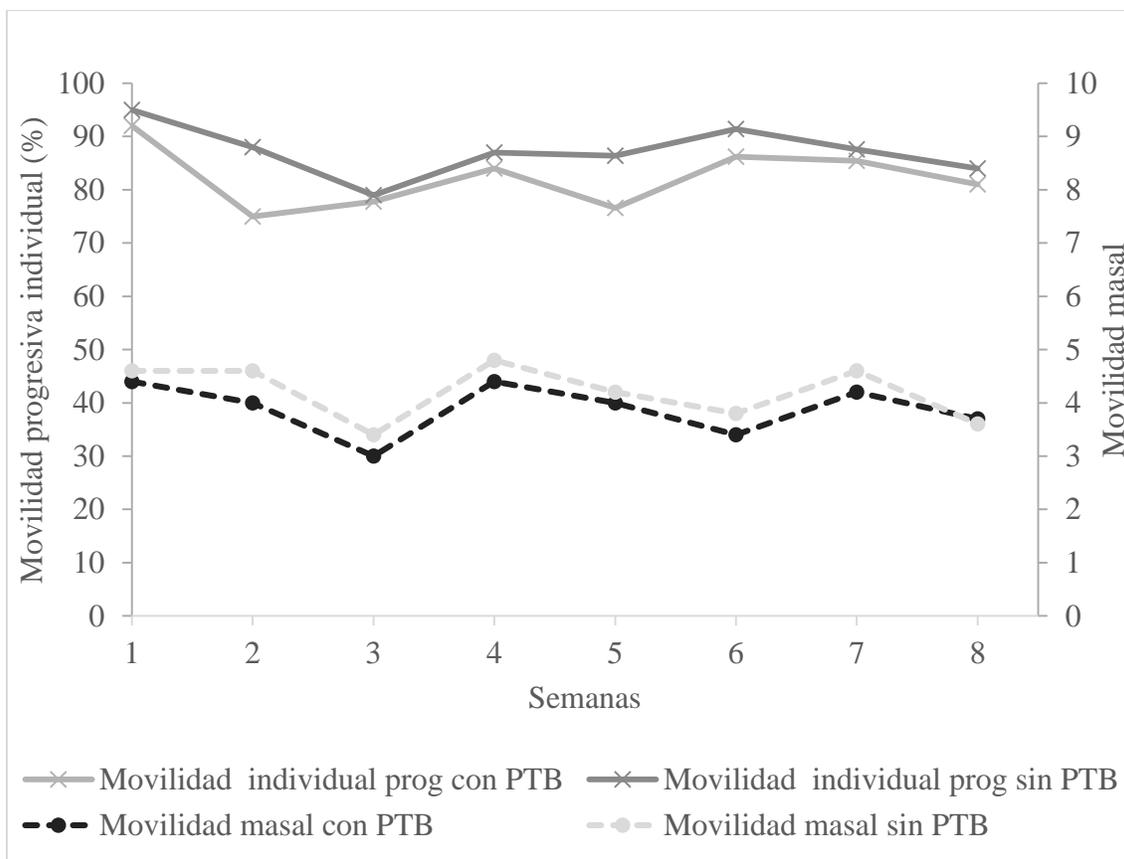


Figura 1.3. Mediciones realizadas semanalmente durante dos meses de movilidad individual progresiva y movilidad masal de espermatozoides de carneros Pelibuey con y sin PTB en estado subclínico.

1.5 DISCUSIÓN

Ayele *et al.*, (2001) reportaron problemas de infertilidad en vacas en estado subclínico con PTB. Por su parte, Smith *et al.*, (2010) indicaron la hipótesis de que PTB disminuye la fertilidad en vacas lecheras, debido a que la infección genera un balance negativo de energía y de proteína. Sin embargo, la mayoría de los estudios no confirman una asociación entre PTB con variables reproductivas. Lo cual coincide con el presente estudio, ya que no se observaron modificaciones en los valores obtenidos de las evaluaciones realizadas, con lo que se demostró que las variables PV, DT, LE y calidad seminal no presentaron modificaciones al menos en

el tiempo que se llevó a cabo el muestreo, y que los animales fueran positivos a la paratuberculosis en estado subclínico (Cuadro 1.1 y 1.2).

A pesar de que PTB es una enfermedad que se caracteriza por la pérdida de peso, deshidratación y diarrea profusa en bovinos adultos; en ovinos, la diarrea no es una constante (Verin *et al.*, 2016). En el presente estudio, los resultados indicaron que la PTB en estado subclínico no genera afectación en PV ($p > 0.05$) durante los dos meses del estudio (Cuadro 1.1). Sin embargo, este resultado difiere al reportado por McGregor *et al.*, (2015), quienes encontraron una disminución de hasta 5 kg en PV, cuando realizaron un estudio longitudinal durante tres años con ovejas Merino infectadas con PTB. La pérdida de peso fue atribuida a los efectos de las lesiones ocasionadas por MAP, las cuales generalmente ocurren a los dos años post exposición. Esto coincide a lo mencionado por Clarke (1997) y Jaimes *et al.*, (2008), quienes indican que en pequeños rumiantes, la PTB se manifiesta entre los dos y tres años de edad, debido a la hipertrofia difusa ocasionada por MAP en mucosa del yeyuno e íleon; éstas lesiones típicas de MAP (enteritis granulomatosa y el engrosamiento de la mucosa intestinal) generan mala absorción de nutrimentos con enteropatía, por lo tanto, generan pérdida en condición corporal. No obstante, no se ha determinado si estas lesiones presentes en estado subclínico, reducen la función intestinal lo suficiente como para causar un balance energético negativo (Kostoulas *et al.*, 2006). Respecto a la CE, se demostró que PTB no generó disminución en esta variable ($p > 0.05$) como se indica en el Cuadro 1.1. Por el momento, no hay literatura que reporte alteraciones en CE de carneros infectados con PTB; no

obstante, Khol *et al.*, (2010) realizaron mediciones durante un año del epidídimo en un bovino infectado y reportaron disminución en diámetro de 3 cm.

Por otro lado, la infección con MAP no ocasiono afectación en las variables de V, pH, MM, MIP, C, EV y EM ($p > 0.05$; Cuadro 2.1). Adicionalmente, no se observó afectación durante el muestreo realizado semanalmente en estas variables, ($p > 0.05$) durante los dos meses que duró el estudio, como lo muestran las Figuras 1.1, 2.1 y 3.1. Por su parte, Khol *et al.*, (2010) reportaron el caso de un bovino con evaluaciones seminales durante un año, que mostró variaciones en V y pH, entre 4 y 12 mL y entre 6 y 7.4, respectivamente; la MM disminuyó del 72 al 49 %, y la C nunca excedió los 2.8×10^6 por mL. Por lo tanto, el semen se consideró de mala calidad; pero dichos autores indicaron que esta baja calidad del semen se debió principalmente a la desnutrición y a la mala condición corporal del animal, y no como consecuencia de la infección por MAP.

Debido a que la infección de los carneros en el presente experimento fue adquirida de manera natural, resulta importante mencionar que se desconoce el tiempo de duración de la infección. Por lo tanto, es incierta la cantidad de granulomas presentes en el intestino, lesiones que requieren años para mostrar cambios en condición corporal y de salud de rumiantes (de Silva *et al.*, 2018). Los signos clínicos generalmente se presentan entre los dos y cinco años de edad en bovinos y ovinos (Verin *et al.*, 2016). A consecuencia de que la edad de los carneros en el presente experimento fue menor a los tres años, posiblemente esto no permitió la progresión de lesiones, debido a que PTB es una enfermedad crónica, la cual presenta una

fase preclínica prolongada (Subharat *et al.*, 2012). Adicionalmente, resulta importante mencionar que, la duración de dos meses de la presente fase experimental fue un periodo corto, el cual no permitió registrar la progresión y afectación de PTB en carneros en estado subclínico.

De igual manera, de Silva *et al.*, (2018) indicaron que una enfermedad crónica como la PTB, requiere de años para desarrollarse bajo condiciones naturales, por lo que un experimento con duración de 12 meses es realmente un periodo muy corto. Por lo tanto, la duración del presente estudio no permitió mostrar si PTB en estado subclínico afecta a los carneros en variables productivas y reproductivas. No obstante, es importante resaltar el riesgo que representa el utilizar sementales infectados naturalmente, debido a que éstos pueden propagar la infección, a pesar de que no muestren ningún signo clínico y ningún cambio en las variables seminales durante su vida productiva, tal y como es con los resultados de este estudio con carneros Pelibuey. Además, esto representa un contratiempo para controlar la infección, ya que el MAP se elimina a través de las heces (Windsor y Whittington, 2010; Pritchard *et al.*, 2017). Como consecuencia, se puede generar transmisión horizontal de MAP de individuos infectados a sanos, la cual se adquiere por las vías fecal-oral con el consumo de calostro, agua, insectos, vía sexual e inclusive, la transmisión vertical por la vía transplacentaria (Khol *et al.*, 2010, Windsor y Whittington 2010, Rindi y Garzelli 2014). Cabe mencionar que, cuando un animal se encuentra en estado clínico de la enfermedad, éste puede excretar entre 1.3×10^5 y 5.9×10^9 microorganismos por gramo de materia fecal (Manning y Collins 2001). Esta cantidad de microorganismos es alta, debido a que se ha reportado la infección

experimental con tan solo 10^3 organismos vía oral en corderos, los cuales presentaron lesiones microscópicas en intestino (Clarke, 1997). Adicionalmente a este hecho, se ha reportado que un animal en estado clínico tiene el potencial para infectar a 25 animales (Garcia y Shalloo 2015). Por su parte, Eppleston y Whittington (2001) indicaron que ovinos infectados pueden portar MAP en semen, por lo cual, estos ovinos pueden transmitir la infección horizontalmente.

Por lo tanto, cualquier posibilidad de propagar PTB es motivo de gran preocupación, ya que causa grandes pérdidas económicas y representa un riesgo para la salud pública, porque está relacionada con la enfermedad de Crohn en humanos (Ghadiali *et al.*, 2004; Garcia y Shalloo 2015,). De tal manera, Jaimes *et al.*, (2008) indican que el control de la enfermedad en los rumiantes domésticos depende de la detección oportuna y de la eliminación de los animales afectados, aunque esto se ve limitado por la falta de un diagnóstico adecuado. Por lo tanto, es necesario implementar estrategias de detección, control y de vigilancia del MAP, a pesar de que los carneros infectados con PTB en estado subclínico, tengan la capacidad reproductiva y estén aptos fisiológicamente.

1.6 LITERATURA CITADA

- Abbas, M., Munir, M., Khaliq, S. A., Haq, M. I. U. H., Khan, M. T., and Qureshi, Z. U. A. (2011). Detection of Paratuberculosis in Breeding Bulls at Pakistani Semen Production Units: A Continuous Source of Threat. *ISRN Veterinary Science*, 2011, 1,4. <https://doi.org/10.5402/2011/501235>.
- Ayele, W.Y., Macháčková M., Pavlík I. (2001). The transmission and impact of paratuberculosis infection in domestic and wild ruminants. Review Article. *Veterinarni Medicina*. 46 (7–8): 205–224.

- Ayele, W. Y., Bartos, M., Svastova, P., and Pavlik, I. (2004). Distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in organs of naturally infected bull-calves and breeding bulls. *Veterinary Microbiology*, 103(3–4), 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.07.011>.
- Benmoula, A., Badi, A., El Fadili, M., EL Khalil, K., Allai, L., El Hilali, A., and El Amiri, B. (2017). Effect of season on scrotal circumference, semen characteristics, seminal plasma composition and spermatozoa motility during liquid storage in INRA180 rams. *Animal Reproduction Science*, 180, 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.02.008>.
- Chávez Gris, G., Tavera Trigo, F. J., Svastova, P., and Pavlik, I. (2004). Identificación del polimorfismo genético de aislamientos de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* de caprinos del centro de México. *Veterinaria México*, 35(1), 75–82.
- Chiodini, R. J., Van Kruiningen, H. J., and Merkal, R. S. (1984). Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): The current status and future prospects. *The Cornell Veterinarian*, 74(2), 218–262.
- Clarke, C. J. (1997). The Pathology and Pathogenesis of Paratuberculosis in Ruminants and Other Species. *Journal of Comparative Pathology*, 116(3), 217–261.
- de Silva, K., Plain, K., Purdie, A., Begg, D., and Whittington, R. (2018). Defining resilience to mycobacterial disease: Characteristics of survivors of ovine paratuberculosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 195, 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2017.11.008>.
- El-Tohamy, M. M., Kotp, M. S., and Mohamed, A. H. (2012). Semen Characteristics and Oxidative/Antioxidative Status in Semen and Serum of Male Rabbits Supplemented with Antioxidants during Heat Stress. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 2(2), 175–183.
- Eppeleston, J., and Whittington, R. (2001). Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from the semen of rams with clinical Johne's disease. *Australian Veterinary Journal*, 79(11), 776–777.
- Garcia, A. B., and Shalloo, L. (2015). Invited review: The economic impact and control of paratuberculosis in cattle. *Journal of Dairy Science*, 98(8), 5019–39. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-9241>.

- García, E., 2004. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen, Serie Libros, núm. 6, Instituto de Geografía, UNAM, México.
- Ghadiali, A. H., Strother, M., Naser, S. A., Manning, E. J. B., and Sreevatsan, S. (2004). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Strains Isolated from Crohn's Disease Patients and Animal Species Exhibit Similar Polymorphic Locus Patterns. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(11), 5345–5348. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.11.5345>.
- Guzmán-Ruiz, C. C., Santillán-Flores, M. A., and Córdova-López, D. (2016). Prevalence and possible risk factors for caprine paratuberculosis in intensive dairy production units in Guanajuato, México. *Veterinary Medicine and Animal Health*, 8(11), 156–162. <https://doi.org/10.5897/JVMAH2016.0497>.
- Jaimes, G.N., Santillán, F.M.A., Hernández, C.O.A., Córdova, L.D., Guzmán, R.C.C., Arellano, R.B., Díaz, A.E., Tenorio, G.V.R., Cuéllar, O.A. (2008). Detección de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*, por medio de PCR-anidada a partir de muestras de heces de ovinos. *Veterinaria México*, 39(01), 377–386.
- Khol, J. L., Kralik, P., Slana, I., Beran, V., Aurich, C., Baumgartner, W., and Pavlík, I. (2010). Consecutive Excretion of *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* in Semen of a Breeding Bull Compared to the Distribution in Feces, Tissue and Blood by IS900 and F57 Quantitative Real-Time PCR and Culture Examinations. *Journal of Veterinary Medical Science*, 72(10), 1283–1288.
- Kostoulas, P., Leontides, L., Billinis, C., Amiridis, G. S., and Florou, M. (2006). The association of sub-clinical paratuberculosis with the fertility of Greek dairy ewes and goats varies with parity. *Preventive Veterinary Medicine*, 74(2–3), 226–238. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2005.12.001>.
- Manning, E. J., and Collins, M. T. (2001). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 20(1), 133–50. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/med/11288509>.
- Martínez-Covarrubias, A.G., Santillán-Flores, M.A., Ruiz-Guzmán, C.C., Favila-Humara, L. del C., Córdova-López, D., Efrén-Díaz, A., Hernández-Andrade, L. and Blanco-Ochoa, M.Á., (2012). Desarrollo de un inmuno-ensayo enzimático (ELISA) para el diagnóstico de paratuberculosis en bovinos, *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 3, 1–18.

- Mcgregor, H., Abbott, K. A., and Whittington, R. J. (2015). Effects of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection on serum biochemistry, body weight and wool growth in Merino sheep: A longitudinal study. *Small Ruminant Research*, 125, 146–153. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.02.004>.
- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- Ogundele, F. A., Okubanjo, O. O., Ajanusi, O. J., and Fadason, S. T. (2016). Semen characteristics and reaction time of Yankasa rams experimentally infected with *Trypanosoma evansi* infection. *Theriogenology*, 86(3), 667–673. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.02.018>.
- Pritchard, T. C., Coffey, M. P., Bond, K. S., Hutchings, M. R., and Wall, E. (2017). Phenotypic effects of subclinical paratuberculosis (Johne ' s disease) in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 1–12. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11323>.
- Rindi, L., and Garzelli, C. (2014). Genetic diversity and phylogeny of *Mycobacterium avium*. *Infection, Genetics and Evolution*, 21, 375–383. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.12.007>.
- SAS Institute. 2006. SAS/STAT Software. Release 9.1, SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Smith, R. L., Strawderman, Y. H., Schukken, S. J., Wells, A. K., Pradhan, L. A., Espejo, R. H., Whitlock, J. S., Van Kessel, J. M., Smith, D. R., Wolfgang, and Y. T. Gröhn. 2010. Effect of Johne's disease status on reproduction and culling in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 93(8), 3513–3524. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2742>.
- Stau, A., Seelig, B., Walter, D., Schroeder, C., and Ganter, M. (2012). Seroprevalence of *Mycobacterium avium* subsp . *paratuberculosis* in small ruminants in Germany. *Small Ruminant Research*, 105(1–3), 361–365. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.03.008>.
- Subharat, S., Shu, D., Wedlock, D. N., Price-Carter, M., Lisle, G. W. De, Luo, D., ... Buddle, B. M. (2012). Immune responses associated with progression and control of infection in calves experimentally challenged with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 149(3–4), 225–236. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.07.005>.
- Swelum, A. A. A., Ayadi, M., Alhidary, I., Alowaimer, A., and Abouheif, M. (2017).

The relationships between body fatness, leptin, testosterone, and reproductive performance in ram lambs as affected by level and frequency of feeding. *Theriogenology*, 89, 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.10.013>.

Verin, R., Perroni, M., Rossi, G., De Grossi, L., Botta, R., De Sanctis, B., ... Taccini, E. (2016). Paratuberculosis in sheep: Histochemical, immunohistochemical and in situ hybridization evidence of in utero and milk transmission. *Research in Veterinary Science*, 106, 173–179. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.04.006>.

Whitlock, R. H., and Buergelt, C. (1996). Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 12(2), 345–356.

Whittington, R. J., and Windsor, P. A. (2009). In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: A critical review and meta-analysis. *The Veterinary Journal*, 179(1), 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.08.023>.

Whittington, R. J., Begg, D. J., Silva, K. De, Plain, K. M., and Purdie, A. C. (2012). Comparative immunological and microbiological aspects of paratuberculosis as a model mycobacterial infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 148(1–2), 29–47. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.03.003>.

Williams, M. A., Stellflug, J. N., and Lewis, G. S. (2001). Technical note: Artificial vagina vs a vaginal collection vial for collecting semen from rams. *Journal of Animal Science*, 79, 2964–2967.

Windsor, P. A., and Whittington, R. J. (2010). Evidence for age susceptibility of cattle to Johne's disease. *The Veterinary Journal*, 184(1), 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.01.007>.

CAPÍTULO 2. RESTRICCIÓN ALIMENTICIA Y SU EFECTO EN LA MANIFESTACIÓN DE SIGNOS CLÍNICOS DE PARATUBERCULOSIS EN SEMENTALES OVINOS

2.1 RESUMEN

En los ovinos, la paratuberculosis (PTB) es provocada por el agente causal *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), la cual genera una enfermedad crónica consuntiva incurable asociada a diarrea crónica o intermitente, síndrome de malnutrición, pérdida de peso y eventualmente la muerte. Se ha indicado que algunos factores tales como desnutrición, infección parasitaria, viral o bacteriana, ocasionan estrés y pueden influir en la transición del estado subclínico al estado clínico de paratuberculosis. Así, una alimentación con nivel nutricional bajo es un factor de estrés común en las unidades de producción intensiva, lo cual genera inmunosupresión. De esta manera, con el fin de evaluar el efecto de la restricción alimenticia en la manifestación de signos de PTB en carneros en estado subclínico, se proporcionó alimentación exclusivamente con heno de avena (*Avena sativa*) durante dos meses a ocho carneros de raza Pelibuey con un peso de 53.58 kg (± 3.26) y con 2.91 años de edad (± 0.59). El diagnóstico de la PTB se realizó mediante pruebas de serología en sangre y molecular en heces. Los resultados de ambas pruebas diagnósticas se registraron al inicio y al final de alimentación con bajo nivel nutricional, así como el peso corporal, la presencia o ausencia de caquexia, de heces pastosas y diarrea. La restricción alimenticia a base de heno de avena favoreció la transición del estado subclínico al clínico de paratuberculosis; la presencia de heces pastosas aumentó en 42.9 %, se generó diarrea en 28 % y al

final del periodo de la restricción alimenticia, la pérdida de peso promedio en los carneros fue de 20.3 %.

Palabras clave: Paratuberculosis ovina, desnutrición, signos clínicos.

2.2 INTRODUCCIÓN

La paratuberculosis (PTB o enfermedad de Johne) es una infección intestinal causada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) (Dukkipati *et al.*, 2016), micobacteria intracelular de lento crecimiento (Ayele *et al.*, 2001). La PTB es una enteritis crónica a la que los rumiantes son particularmente susceptibles y compromete el bienestar animal (Pritchard *et al.*, 2017), causa diarrea crónica o intermitente, hipoproteinemia, pérdida de peso y eventualmente la muerte (Chiodini *et al.*, 1984). La PTB tiene una distribución mundial y su prevalencia varía del 5 al 25 % (Martínez-Covarrubias *et al.*, 2012) y en México está ampliamente distribuida, con una tasa de prevalencia del 5 al 30 % (Guzmán-Ruiz *et al.*, 2016). Los reportes indican que los signos clínicos generalmente se presentan entre los 2 y 5 años de edad en bovinos y ovinos (Verin *et al.*, 2016). Las lesiones que ocasiona MAP pueden presentarse 12 meses antes de que los signos de PTB sean evidentes (Mcgregor *et al.*, 2015). En un inicio, las lesiones se desarrollan en íleon, yeyuno, intestino delgado terminal, ciego, colon y nódulos linfáticos mesentéricos (Clarke, 1997).

Debido al curso lento y crónico que caracteriza a esta enfermedad, se diferencian tres fases desde un punto de vista clínico: periodo silente (I), fase subclínica (II) y fase clínica (III) (Koets *et al.*, 2015). Las pruebas actuales de diagnóstico presentan dificultad para lograr la detección de la infección en la etapa I y no detectan a muchos animales infectados de forma subclínica en la etapa II. Por esta razón, se recomienda hacer uso de más de una prueba confirmatoria para realizar un diagnóstico adecuado de PTB (Ayele *et al.*, 2001). El ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) es la prueba utilizada con mayor frecuencia, por su costo comparativamente bajo y el menor riesgo para contaminar las muestras durante la recolección (Stau *et al.*, 2012). Sin embargo, a pesar de que ELISA presenta alta especificidad (85-100 %), no es una prueba perfecta, ya que depende del Kit, de la especie y de la etapa de infección en que se encuentre el animal, lo cual puede disminuir la sensibilidad a un 50 % (Begg *et al.*, 2015). Otra alternativa a la prueba serológica es el diagnóstico molecular, la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con iniciadores para la secuencia nucleotídica IS900, la cual es considerada específica para el genoma de MAP. El efectuar esta técnica permite obtener un diagnóstico rápido y tiene la ventaja adicional de detectar cepas que son incultivables (Kaur *et al.*, 2011).

Por otro lado, los factores que ocasionan estrés, como la desnutrición, infección parasitaria, viral o bacteriana, pueden influir en la transición del estado subclínico al estado clínico de PTB (Ayele *et al.*, 2001). En las hembras, la regulación inmune durante la gestación para no rechazar el embrión, parece favorecer la proliferación de infección y la seroconversión de animales que se infectaron a temprana edad

(Kostoulas *et al.*, 2006). Por su parte, Feola *et al.* (1999) en estudios *in vitro* encontraron que, la prolactina y la hormona del crecimiento, disminuyen la capacidad de los macrófagos bovinos para controlar el crecimiento de MAP intracelular. En consecuencia, se puede suponer que las fluctuaciones en los niveles circulantes de estas hormonas que ocurren durante el parto y la lactancia, genera que los fagocitos sean permisivos al crecimiento intracelular de MAP. Pero en el caso de los machos, la expresión de signos clínicos puede ser debido a los factores que generan inmunosupresión, tal es el caso de proporcionar una alimentación con un nivel nutricional bajo, el cual es un factor de estrés común en las unidades de producción intensiva (Quist *et al.*, 2002).

En este contexto, el creciente uso de esquilmos agrícolas en la alimentación del ganado, se debe a que se trata de una fuente de energía abundante, y de bajo costo (Yescas *et al.*, 2004). En México, el uso de estos esquilmos es común en el periodo de sequía (SIAP, 2012). De tal manera que, son la base de la alimentación del ganado, sobre todo en época de escasez de forraje verde (Reyes-Muro *et al.*, 2013). Sin embargo, estos esquilmos presentan una digestibilidad baja y un valor nutrimental insuficiente, ocasionado por su alto contenido de fibra (estado de lignificación) (Fuentes *et al.*, 2001). Adicionalmente, se ha registrado el 1.3 % de mortalidad debido a la malnutrición y el 6.2 % debido a la PTB en granjas de ovinos en diferentes épocas del año. La desnutrición ocasionó mayor mortalidad en invierno (67 %), debido a la escasez en calidad y cantidad del forraje en el verano (Bush *et al.*, 2006). A pesar de que se ha relacionado a la PTB con la desnutrición, hasta el momento no existe literatura que indique cómo la alimentación con nivel

nutricional bajo, puede inducir la expresión de signos clínicos propios de la PTB en carneros. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de restricción alimenticia a base de heno de avena (*avena sativa*) en la manifestación de signos clínicos de paratuberculosis en carneros Pelibuey infectados naturalmente.

2.3 MATERIALES Y METODOS

2.3.1 Ubicación del estudio

El experimento se realizó en corrales de observación y aislamiento pertenecientes al rebaño de ovinos del campus Córdoba del Colegio de Postgraduados (COLPOS); unidad de investigación y estudio con antecedentes de prevalencia de PTB, lo cual permite realizar protocolos de control y prevención de ovinos infectados naturalmente. Localizado sobre la carretera federal Córdoba-Veracruz, km 384, congregación Manuel León, Municipio de Amatlán de los Reyes, Veracruz, con localización geográfica en 18°51'20" N y 96°51'37" O a una altitud de 720 m, el clima es cálido subhúmedo, con temperatura promedio de 18 °C, con precipitación anual de 1,807.3 mm (García 2004). Durante el desarrollo del experimento, los carneros se alojaron en dos corrales separados por grupo, en instalaciones diferentes, para evitar una posible infección, bajo las mismas condiciones de manejo de tipo intensivo.

2.3.2 Animales

Se utilizaron ocho carneros de raza Pelibuey, de los cuales siete fueron diagnosticados con PTB en etapa subclínica y un carnero no infectado, el cual fue utilizado como testigo negativo. El peso y edad promedio de los ovinos fue de 57.23 ± 1.73 kg y 2.91 ± 0.17 años, respectivamente. El experimento fue diseñado bajo los criterios de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) sobre especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio en concordancia a las regulaciones para el uso y cuidado de animales de investigación, aprobado por el Consejo General Académico del Colegio de Postgraduados, México.

2.3.3 Colecta de muestras

Las muestras de sangre (5 mL) se colectaron vía punción de la yugular, posteriormente, se realizó centrifugación ($1000 \times g$ durante 10 min) para recuperar el suero en tubos colectores estériles de 2 mL. La colecta de heces se realizó con guante y bolsa colectora estéril vía rectal, las muestras de heces (20 g) se pusieron en tubos colectores estériles de 50 mL. Las muestras de suero y de heces se almacenaron a -20 °C, para su posterior procesamiento en el laboratorio en el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria (CENID)-Microbiología Animal, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

2.3.4 Diagnóstico de PTB

Las pruebas de diagnóstico fueron la PCR anidada (nPCR) para detectar MAP en heces, y la prueba serológica ELISA para detectar anticuerpos específicos para MAP en suero de sangre. Las pruebas de diagnóstico y el reporte de signos clínicos se realizaron al inicio y al final de la prueba.

2.3.5 Análisis serológico

Se realizó la prueba de ELISA para la determinación de anticuerpos en muestras de suero, según la metodología descrita por Martínez-Covarrubias *et al.* (2012). Esta prueba tuvo una sensibilidad del 79.31 % y una especificidad del 82.25 %, en donde los valores mayores a 0.196 densidades ópticas fueron considerados como positivos.

2.3.6 Extracción de ADN y procedimiento de PCR anidada

Se realizó la extracción de ADN a partir de muestras de heces, con el kit comercial BDtract™ Genomic, utilizando el protocolo del fabricante. Las condiciones del Master Mix y de la amplificación para nPCR fueron realizadas, según el protocolo de Martínez-Covarrubias *et al.*, (2012), con cebadores para la secuencia de inserción 900 (IS900), con una sensibilidad del 67 % y una especificidad del 84 %. Los iniciadores para la primera y segunda reacción fueron considerados aquellos según Erume *et al.*, (2001); para la primera reacción: Paratb1 (5'-TGA TCT GGA CAA TGA CGG TTA CGG A-3') y Paratb 4 (5'-CGC GGC ACG GCT CTT GTT-3'), con la cual se obtuvo un producto de 563 pares de bases (pb). Para la segunda reacción, se utilizaron los cebadores Paratb 2 (5'-GCC GCG CTG CTG GAG TTG

A-3') y Paratb 3 (5'-AGC GTC TTT GGC GTC GGT CTT G-3'), con los cuales se obtuvo un producto final de 210 pb. Se utilizó ADN de una cepa de MAP (ATCC #700535) como testigo positivo. El producto de amplificación esperado se visualizó en gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio. La electroforesis se realizó en una cámara horizontal modelo Horizon 11.14 (Life Technologies®). Las condiciones de la electroforesis fueron de 45 min a 87 voltios. El gel se observó en un transiluminador (modelo Gel Doc 2000, Marca Bio Rad® de luz ultravioleta) y la imagen se capturó por computadora con el programa Quatitvone.

2.3.7 Alimentación

La alimentación fue equivalente para todos los carneros, infectados y testigo, ya que se les proporcionó exclusivamente heno de avena molida (2 kg animal⁻¹ día⁻¹) y agua *ad libitum*. El análisis bromatológico, realizado en el Laboratorio de Nutrición Animal perteneciente al Colegio de Postgraduados, estimó los siguientes valores: materia seca 92.1 %, proteína 5.1 %, Energía Metabolizable de 1.50 Mcal kg⁻¹ (NRC, 1989), MS, (AOAC, 2012), Fibra 41.1 % y FDN 72.3 % (Van Soest *et al.*, 1991).

2.4 RESULTADOS

En el Cuadro 3.1 se aprecian los resultados de la prueba de diagnóstico molecular con nPCR, realizada en heces de los siete carneros infectados con PTB y del carnero utilizado como testigo negativo. Así mismo, los resultados de la prueba de ELISA, realizada en suero, al inicio y al final del periodo de alimentación con paja de avena durante dos meses. Se obtuvo el 100 % de pruebas positivas con nPCR,

en heces, al inicio y al final del periodo de restricción alimenticia. Sin embargo, la prueba ELISA estimo valores positivos al inicio de la prueba en un 57.1 %, pero al final de la restricción, solo se reporta un 42.8 %, dado que no se incluyen los resultados serológicos de dos carneros, debido a su muerte durante la última semana del experimento.

Cuadro 3.1. Resultados obtenidos por nPCR y ELISA en carneros Pelibuey infectados naturalmente con PTB, al inicio y al final de la restricción alimenticia.

Identificación de carneros	Inicio		Final	
	nPCR en heces	ELISA	nPCR en heces	ELISA
1	+	+	+	N/D
2	+	+	+	N/D
3	+	+	+	+
4	+	-	+	-
5	+	+	+	+
6	+	-	+	+
7	+	-	+	-
N	-	-	-	-

“+” Corresponde al resultado positivo, “-” corresponde al resultado negativo, en las pruebas diagnósticas de PTB.

En el Cuadro 3.2 se reportan los signos clínicos y la pérdida de peso (%), al inicio y al final del periodo de alimentación con heno de avena, en los siete carneros infectados y del carnero usado como testigo negativo. Al inicio de la restricción alimenticia, ningún carnero mostró signos clínicos evidentes de PTB como caquexia ni diarrea, solo dos carneros mostraban heces pastosas (28.5 %). Sin embargo, al final del periodo de restricción, el 71.4 % de los carneros presentaron heces pastosas; es decir, se tuvo un incremento del 42.9 % en la manifestación de éste

signo clínico; mientras tanto, solo el 28 % de los carneros presentaron diarrea al final del experimento. Adicionalmente, los carneros infectados perdieron en promedio un 20.3 % de su peso vivo, durante los dos meses que duró el periodo de alimentación con paja de avena.

Cuadro 3.2. Signos clínicos y pérdida de peso de carneros Pelibuey infectados naturalmente con PTB, al inicio y al final de la alimentación con paja de avena.

Identificación carneros	Inicio			Final			Pérdida de peso (%)
	Caquexia	Heces pastosas	Diarrea	Caquexia	Heces pastosas	Diarrea	
1	-	+	-	+	+	+	22.6
2	-	+	-	+	+	+	18.8
3	-	-	-	-	-	-	20.7
4	-	-	-	-	-	-	14.1
5	-	-	-	+	+	-	22.0
6	-	-	-	-	+	-	21.5
7	-	-	-	-	+	-	22.2
N	-	-	-	-	-	-	19.9

"+" observación positiva, "-" observación negativa, durante la valoración de signos clínicos de PTB.

2.5 DISCUSIÓN

Al inicio y al final de la restricción alimenticia, los siete carneros Pelibuey infectados mantuvieron el resultado positivo con la prueba diagnóstica de la nPCR. Esto es debido a que los animales eliminan grandes cantidades de bacilos en heces, ya que un animal infectado puede excretar entre 1.3×10^5 y 5.9×10^9 microorganismos por gramo de materia fecal (Manning *et al.*, 2001), a pesar de la excreción intermitente del bacilo (Jaimes *et al.*, 2008). Por su parte, la prueba de ELISA estimó 57.1 % de carneros positivos al inicio de la restricción, pero al final de la prueba solo se obtiene

42.8 % de sementales positivos, debido a la muerte de dos carneros. Esta situación no permitió aplicar la prueba serológica en todos los carneros; razón por la cual se obtuvo un menor porcentaje de diagnósticos positivos con esta prueba en comparación con la nPCR.

En general, el bajo porcentaje de la detección de PTB por ELISA, posiblemente se deba a que la producción de anticuerpos resulta afectada debido a la pérdida de respuesta inmune ante la infección; esta actividad supresora, llamada anergia, se presenta cuando los animales son viejos o la infección está en su etapa final (Jaimes *et al.*, 2008). Por lo tanto, el hacer uso de técnicas de diagnóstico en conjunto permitió detectar convenientemente la PTB, lo cual es importante para contener la dispersión de la enfermedad, ya que actualmente se estima que por cada caso clínico detectado, hay al menos otros 25 animales que pueden estar infectados, sin expresar signos clínicos (Whitlock y Buergelt, 1996).

En el presente estudio, la restricción alimenticia con heno de avena afectó al carnero utilizado como testigo negativo, ya que mostró pérdida de peso del 19.9 % debido a la subnutrición, dado que los animales alimentados con esquilmos agrícolas, no pueden mantener su peso corporal (Reyes-Muro *et al.*, 2013). Sin embargo, a pesar de esta pérdida de peso significativa, este carnero Pelibuey no presentó los signos clínicos característicos de la PTB; además, conservó sus resultados negativos con nPCR y ELISA. Por su parte, los carneros Pelibuey infectados perdieron en promedio 20.3 % de su peso vivo. Respecto a esta variable, McGregor *et al.* (2015) reportaron pérdida de peso en ovejas infectadas de raza Merino, durante un estudio

longitudinal de tres años, las cuales presentaron disminución de hasta 5 kg en PV. La pérdida de peso fue atribuida a los efectos de las lesiones ocasionadas por MAP, las cuales generalmente ocurren a los dos años post exposición. Así mismo, se ha reportado que el estrés generado por la desnutrición, afecta en la disminución de las subpoblaciones de linfocitos (Pollock *et al.*, 1993). Esto podría favorecer a la generación de lesiones de MAP, debido a que los linfocitos localizados en las placas de Peyer son los responsables de la producción de citocina, la cual activa a los macrófagos responsables para limitar el crecimiento de las micobacterias (Martinez y Gordon, 2014). Sin embargo, en el presente estudio la expresión de signos clínicos aumentó al final de los dos meses de la alimentación con bajo nivel nutricional, de tal manera que, en un inicio, solo dos carneros mostraban heces pastosas (28.5 %). Sin embargo, al final del periodo de restricción, el 71.4 % de los carneros presentaron heces pastosas. La expresión de signos clínicos posiblemente se deba a que se dio aumento en la cantidad de las lesiones que genera MAP, como la hipertrofia difusa ocasionada en la mucosa del yeyuno e íleon, la cual provoca engrosamiento macroscópico de la pared intestinal debido a la distribución de las lesiones granulomatosas. Estas lesiones generan mala absorción de los nutrimentos, motivo que genera la forma clínica de PTB; por lo tanto, se genera pérdida en condición corporal (Clarke 1997, Jaimes *et al.*, 2008, Rocca *et al.*, 2010). Al respecto, Clarke (1997), indican que los animales afectados presentan diarreas severas, emaciación y, finalmente, la muerte. Esta situación se observó en el presente estudio, ya que los borregos que manifestaron diarrea (28 %, al final de la fase de restricción), fueron los que fallecieron de manera natural al final del experimento. Esto coincide con lo reportado por Verin *et al.* (2016) y Sharifzadeh *et*

al. (2010), quiénes indicaron que la diarrea no es un signo constante en pequeños rumiantes. Por su parte, Ayele *et al.* (2001) afirmaron que la alimentación con bajo nivel nutricional influye en la evolución del estado subclínico al estado clínico de PTB. Sin embargo, éste es el primer estudio que reporta la utilización de una restricción alimenticia con heno de avena, para generar la manifestación de signos clínicos de PTB. Por lo tanto, falta generar información sobre los mecanismos fisiológicos implicados durante la evolución de la enfermedad, por efectos de una alimentación con bajo nivel nutricional, ya que aún es escasa la información respecto al tema y por el momento no hay tratamiento que sea efectivo para los animales infectados (Garcia y Shalloo, 2015). Es importante mencionar que el control de la enfermedad en los rumiantes domésticos depende de la detección oportuna y de la eliminación de los animales afectados, aunque esto se vea limitado por la falta de un diagnóstico adecuado. Por ello, es necesario implementar estrategias de detección, control y de vigilancia del MAP (Jaimes *et al.*, 2008).

2.6 LITERATURA CITADA

AOAC International, 2012. Official Methods of Analysis (19th Ed.) Association Official Analytical Chemists, Arlington, VA. USA.

Ayele, W.Y., Macháčková, M. and Pavlík, I., 2001. The transmission and impact of paratuberculosis infection in domestic and wild ruminants, *Veterinarni Medicina*. 46, 205–224.

Ayele, W. Y., Bartos, M., Svastova, P., and Pavlik, I. (2004). Distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in organs of naturally infected bull-calves and breeding bulls. *Veterinary Microbiology*, 103(3–4), 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.07.011>.

Begg, D. J., de Silva, K., Plain, K. M., Purdie, A. C., Dhand, N., and Whittington, R. J. (2015). Specific faecal antibody responses in sheep infected with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 166, 125–131.

<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2015.06.011>.

- Bush, R. D., J-Alml, T., and Windsor, P. A. (2006). The impact of malnutrition and other causes of losses of adult sheep in 12 flocks during drought. *PRODUCTION ANIMALS*, 84(7), 5–8.
- Chiodini, R. J., Van Kruiningen, H. J., and Merkal, R. S. (1984). Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): The current status and future prospects. *The Cornell Veterinarian*, 74(2), 218–262.
- Clarke, C. J. (1997). The Pathology and Pathogenesis of Paratuberculosis in Ruminants and Other Species. *Journal of Comparative Pathology*, 116(3), 217–261.
- Dukkipati, V. S. R., Ridler, A. L., Thompson, K. G., Buddle, B. M., Hedgespeth, B. A., Price-carter, M., ... Murray, A. (2016). Experimental infection of New Zealand Merino sheep with a suspension of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) strain Telford: Kinetics of the immune response, histopathology and MAP culture. *Veterinary Microbiology*, 195, 136–143. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.09.018>.
- Erume, J., Spergser, J., and Rosengarten, R. (2001). Rapid detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from cattle and zoo animals by Nested PCR. *African Health Sciences*, 1(12), 83–89.
- Feola, R. P., Collins, M. T., and Czuprynski, C. J. (1999). Hormonal modulation of phagocytosis and intracellular growth of *Mycobacterium avium* ss. *paratuberculosis* in bovine peripheral blood monocytes. *Microbial Pathogenesis*, 26(1), 1–11. <https://doi.org/10.1006/mpat.1998.0246>.
- Fuentes, J., Magaña, C., Suárez, L., Peña, R., Rodríguez, S., and Benjamín, O. de la R. (2001). ANÁLISIS QUÍMICO Y DIGESTIBILIDAD “IN VITRO” DE RASTROJO DE MAÍZ (*Zea mays* L.). *Agronomía Mesoamericana*, 12(2), 189–192.
- Garcia, A. B., and Shalloo, L. (2015). Invited review: The economic impact and control of paratuberculosis in cattle. *Journal of Dairy Science*, 98(8), 5019–39. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-9241>.
- García, E., 2004. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen, Serie Libros, núm. 6, Instituto de Geografía, UNAM, México.

- Guzmán-Ruiz, C. C., Santillán-Flores, M. A., and Córdova-López, D. (2016). Prevalence and possible risk factors for caprine paratuberculosis in intensive dairy production units in Guanajuato, México. *Veterinary Medicine and Animal Health*, 8(11), 156–162. <https://doi.org/10.5897/JVMAH2016.0497>.
- Jaimes, G.N., Santillán, F.M.A., Hernández, C.O.A., Córdova, L.D., Guzmán, R.C.C., Arellano, R.B., Díaz, A.E., Tenorio, G.V.R., Cuéllar, O.A. (2008). Detección de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*, por medio de PCR-anidada a partir de muestras de heces de ovinos. *Veterinaria México*, 39(01), 377–386.
- Kaur, P., Folia, G., Singh, S. V, Patil, P. K., Ravi Kumar, G. V. P. P. S., and Sandhu, K. S. (2011). Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: IS900 PCR identification and IS1311 polymorphism analysis from ruminants in the Punjab region of India. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 34(2), 163–169. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2010.09.002>.
- Koets, A. P., Eda, S., and Sreevatsan, S. (2015). The within host dynamics of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infection in cattle: Where time and place matter. *Veterinary Research*, 46(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0185-0>.
- Kostoulas, P., Leontides, L., Billinis, C., Amiridis, G. S., and Florou, M. (2006). The association of sub-clinical paratuberculosis with the fertility of Greek dairy ewes and goats varies with parity. *Preventive Veterinary Medicine*, 74(2–3), 226–238. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2005.12.001>.
- Larsen, A. B., and Kopecky, K. E. (1970). *Mycobacterium paratuberculosis* in reproductive organs and semen of bulls. *American Journal of Veterinary Research*, 31, 255–258.
- Larsen, A., Stalheim, O., Hughes, D., Appell, L., Richards, W., and Himes, E. (1981). *Mycobacterium paratuberculosis* in the semen and genital organs of a semen-donor bull. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 179(2), 7263470.
- Manning, E. J., and Collins, M. T. (2001). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 20(1), 133–50. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/med/11288509>.

- Martínez-Covarrubias, A.G., Santillán-Flores, M.A., Ruiz-Guzmán, C.C., Favila-Humara, L. del C., Córdova-López, D., Efrén-Díaz, A., Hernández-Andrade, L. and Blanco-Ochoa, M.Á., (2012). Desarrollo de un inmuno-ensayo enzimático (ELISA) para el diagnóstico de paratuberculosis en bovinos, *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 3, 1–18.
- Martinez, F. O., and Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Reports*, 6(March), 1–13. <https://doi.org/10.12703/P6-13>.
- Mcgregor, H., Abbott, K. A., and Whittington, R. J. (2015). Effects of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection on serum biochemistry, body weight and wool growth in Merino sheep: A longitudinal study. *Small Ruminant Research*, 125, 146–153. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.02.004>.
- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- Pollock, J. M., Rowan, T. G., Dixon, J. B., Carter, S. D., Spiller, D., and Warenius, H. (1993). Alteration of cellular immune responses by nutrition and weaning in calves. *Research in Veterinary Science*, 55(3), 298–305. [https://doi.org/10.1016/0034-5288\(93\)90098-Z](https://doi.org/10.1016/0034-5288(93)90098-Z)
- Pritchard, T. C., Coffey, M. P., Bond, K. S., Hutchings, M. R., and Wall, E. (2017). Phenotypic effects of subclinical paratuberculosis (Johne's disease) in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 100(1), 1–12. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11323>.
- Quist, C. F., Nettles, V. F., Manning, E. J. B., Hall, D. G., Joseph, K., Wilmers, T. J., and Lopez, R. R. (2002). Paratuberculosis in key deer (*Odocoileus virginianus*). *Journal of Wildlife Diseases*, 38(4), 729–737.
- Reyes-Muro, L., Camacho-Villa, T. C., and Guevara-Hernández, F. (2013). *Rastrojos. Manejo, uso y mercado en el centro y sur de México. Libro Técnico Núm. 7.* (C. I. J. L. R. G. (INIFAP) M. C. Santa Ana Ríos Ruiz (INIFAP) Lic. Norma Barrueco (Bayamo and A. C. . Dr. Julio César Velásquez Hernández (RED, Eds.) (Primera ed). México, D. F.
- Rocca, S., Cubeddu, T., Nieddu, A. M., Pirino, S., Appino, S., Antuofermo, E., ... Leoni, A. (2010). Detection of *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* (MAP) in samples of sheep paratuberculosis (Johne's disease or JD) and human Crohn's disease (CD) using liquid phase RT-PCR, in situ RT-PCR and immunohistochemistry. *Small Ruminant Research*, 88(2–3), 126–134.

<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.12.020>.

- SIAP. (2012). Sistema de Información Agroalimentaria de Consulta (SIACON), Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). <http://www.siap.gob.mx/>.
- Sharifzadeh, A., Doosti, A., Fazeli, M. H., and Adavoudi, I. (2010). Nested PCR on semen samples for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *African Journal of Microbiology Research*, 4(24), 2787–2789.
- Stau, A., Seelig, B., Walter, D., Schroeder, C., and Ganter, M. (2012). Seroprevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in small ruminants in Germany. *Small Ruminant Research*, 105(1–3), 361–365. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.03.008>.
- Verin, R., Perroni, M., Rossi, G., De Grossi, L., Botta, R., De Sanctis, B., ... Taccini, E. (2016). Paratuberculosis in sheep: Histochemical, immunohistochemical and in situ hybridization evidence of in utero and milk transmission. *Research in Veterinary Science*, 106, 173–179. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.04.006>.
- Whitlock, R. H., and Buergelt, C. (1996). Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 12(2), 345–356.
- Yescas, R., Ricardo, Y., Gama, B., Mendoza, G. D., González, S. S., Mario, M., ... Cobos-peralta, M. (2004). Digestibilidad *in situ* de dietas con rastrojo de maíz o paja de avena con enzimas fibrolíticas. *Agrociencia*, 38, 23–31.

CAPÍTULO 3. DETECCIÓN DEL *Mycobacterium avium* SUBSP. paratuberculosis EN TEJIDO REPRODUCTIVO Y SEMEN DE CARNEROS INFECTADOS NATURALMENTE

3.1 RESUMEN

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (MAP) es el agente causal de la paratuberculosis (PTB), enfermedad que ocasiona síndrome de mala absorción de los nutrientes, pérdida de peso y eventualmente la muerte. El intestino es el órgano blanco donde se desarrolla la infección; sin embargo, en ovinos hay evidencia de la infección de MAP en sitios extraintestinales. La finalidad del estudio fue identificar la presencia de MAP en tejido reproductivo y semen de carneros Pelibuey infectados naturalmente en estado subclínico de PTB. Se utilizaron siete carneros en estado clínico, positivos por serología, nPCR y cultivo bacteriológico y un carnero no infectado de raza Pelibuey, con peso y edad promedio de 57.23 ± 1.73 kg y 2.91 ± 0.17 años, respectivamente. Se identificó la presencia de MAP en muestras de tejido de bazo (14.3 y 28.6 %), intestino delgado (42.9 y 57.1 %) y linfonodos mesentéricos (42.9 y 42.9 %), con nPCR y cultivo, respectivamente. También se identificó en tejido de epidídimo (14.3 %), glándula de Cowper (28.6 %) y próstata (28.6 %), utilizando nPCR, pero sin detección en cultivo. Se identificó en tejido testicular en un 28.6 % con ambas técnicas. Finalmente, se identificó MAP en un 42.9 % de muestras de semen con nPCR; sin embargo, no se detectó a través de cultivo. En conclusión, se identificó la presencia de MAP en epidídimo, glándula de Cowper, próstata y testículos de carneros Pelibuey.

Palabras clave: *Mycobacterium paratuberculosis*, tejido; semen, carnero Pelibuey.

3.2 INTRODUCCIÓN

La PTB o enfermedad de Jhone es crónica consuntiva e incurable, causada por el MAP; micobacteria intracelular de lento crecimiento, gram positiva, anaerobia que en su genotipo posee de 14 a 18 copias de un elemento de inserción llamado IS900 (Ayele *et al.*, 2001, 2004). Enfermedad propia de rumiantes (Garcia y Shalloo, 2015), aunque también infecta a monogástricos y aves silvestres (Ayele *et al.*, 2001; Pieper *et al.*, 2014), que causa gastroenteritis crónica granulomatosa con linfangiectasis y linfangitis; lesiones que generan la aparición del síndrome de mala absorción de los nutrientes, pérdida de peso, diarrea crónica o intermitente, causa debilitamiento y eventualmente la muerte (Chiodini *et al.*, 1984; Whittington *et al.*, 2012; Mcgregor *et al.*, 2015). La vía fecal-oral es la ruta principal para la transmisión de MAP (Whittington y Windsor, 2009), sea en la lactancia o por consumo de forraje contaminado (Chiodini *et al.*, 1984; Windsor y Whittington, 2010). La PTB tiene una fase subclínica crónica (Subharat *et al.*, 2012) y factores como estrés, infección parasitaria, viral o bacteriana, influyen en la transición del estado subclínico al estado clínico (Ayele *et al.*, 2001), con un periodo de incubación cercano a los dos años en los pequeños rumiantes (Whittington *et al.*, 2012).

Inicialmente, la PTB genera lesiones restringidas a las paredes del intestino delgado y nódulos linfáticos mesentéricos, pero cuando la enfermedad progresa, se genera inflamación difusa granulomatosa, con número variable de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR). Así, las lesiones se desarrollan en íleon, yeyuno, intestino delgado terminal, ciego y colon (Clarke, 1997; Sigurðardottir *et al.*, 2004). No obstante, MAP puede diseminarse a sitios extraintestinales como el tracto

reproductivo y semen en toros (Larsen y Kopecky, 1970; Larsen *et al.*, 1981; Ayele *et al.*, 2004; Khol *et al.*, 2010) y semen de carneros (Eppleston y Whittington, 2001), pero aún no se ha reportado en tejido reproductivo de ovinos. Sin embargo, los órganos reproductivos infectados no presentan respuesta inflamatoria (Buergelt *et al.*, 2004). A pesar de no observarse lesiones histológicas en testículo de bovino, se ha logrado determinar la presencia de MAP en dicho tejido, con la técnica de cultivo y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Glawischnig *et al.*, 2004).

De esta manera, el uso de sementales infectados en tejido reproductivo y semen representa un riesgo de transmisión horizontal vía sexual para la diseminación del MAP, por ser un reservorio extraintestinal (Buergelt *et al.*, 2004). Por lo tanto, la posibilidad de propagar PTB por vía semen es motivo de preocupación para el sector ganadero, por las pérdidas económicas y el riesgo para la salud pública, al relacionarse con la enfermedad de Crohn en humanos (Ghadiali *et al.*, 2004). En México no se realiza un control sanitario en los programas de mejoramiento genético para certificar que el semen de ovinos se encuentre libre de MAP, posiblemente sea porque la PTB ovina ha recibido poca atención. No obstante, la PTB avanza lentamente en las poblaciones de pequeños rumiantes, a menos que se introduzcan medidas de manejo, ya que la acumulación de infección por MAP en la población aumentará cada vez más (Windsor, 2015). Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue identificar la presencia de MAP en tejido reproductivo y semen de carneros Pelibuey infectados en estado clínico de PTB.

3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1 Área de estudio

El experimento se realizó en corrales de observación y aislamiento pertenecientes al rebaño de ovinos del campus Córdoba del Colegio de Postgraduados (COLPOS); unidad de investigación y estudio con antecedentes de prevalencia de PTB, lo cual permite realizar protocolos de control y prevención de ovinos infectados naturalmente. Localizado sobre la carretera federal Córdoba-Veracruz, km 384, congregación Manuel León, Municipio de Amatlán de los Reyes, Veracruz, con localización geográfica en 18°51'20" N y 96°51'37" O a una altitud de 720 m, el clima es templado regular, con temperatura promedio de 18 °C, con precipitación anual de 1,807.3 mm (García, 2004). Los carneros se alojaron en instalaciones diferentes, en corrales separados por grupo, para evitar una posible infección, bajo las mismas condiciones de manejo de tipo intensivo.

3.3.2 Animales

Se utilizaron ocho carneros de raza Pelibuey, de los cuales siete fueron diagnosticados con PTB y un carnero no infectado, el cual fue utilizado como testigo negativo. Las pruebas de diagnóstico fueron PCR anidada (nPCR) y cultivo bacteriológico, para detectar MAP en heces. Y la prueba serológica ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para detectar anticuerpos. El peso y edad promedio de los ovinos fue de 57.23 ± 1.73 kg y 2.91 ± 0.17 años, respectivamente. El experimento fue diseñado bajo los criterios de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) sobre especificaciones técnicas, para la

producción, cuidado y uso de animales de laboratorio en concordancia a las regulaciones para el uso y cuidado de animales de investigación, aprobado por el Consejo General Académico del Colegio de Postgraduados, México. Además, bajo las especificaciones de la Norma Oficial Mexicana (NOM-033-ZOO-1995) para el sacrificio de los animales utilizados.

3.3.3 Colecta de muestras

Las muestras de sangre (5 mL) se colectaron vía punción de la yugular. Posteriormente, se realizó centrifugación (1000 x *g* durante 10 min) para recuperar el suero en tubos colectores estériles de 2 mL. La colecta de heces se realizó con guante y bolsa colectora estéril vía rectal. La colecta de semen se realizó por medio de vagina artificial, de acuerdo al protocolo propuesto por Bergstein-Galan *et al.* (2017). Antes de iniciar la colecta de semen, se realizó recorte de pelos prepuciales, el lavado prepucial se realizó con jabón líquido antiséptico y desinfectante (Dermocleen^{MR}). Se utilizó una colecta de semen por carnero, para realizar cultivo y extracción de ADN. Para realizar la colecta de los tejidos, se realizó el sacrificio de los carneros en condiciones humanitarias, bajo las especificaciones de la Norma Oficial Mexicana (NOM-033-ZOO-1995), con una sobredosis de barbitúrico (T61[®], Intervet, S.A., México) vía intravenosa. Al momento de realizar la colecta de tejido de cada muestra, se utilizó bisturí, pinzas y guantes nuevos para evitar la contaminación cruzada. Las muestras de tejido (20 g) se maceraron en condiciones estériles y se colocaron en tubos colectores estériles de 50 mL. Finalmente, el almacenamiento de las muestras de suero, heces, tejido (bazo, intestino, linfonodos mesentéricos, epidídimo, glándula de Cowper, próstata, testículos) y semen se

efectuó a -20°C , para su posterior procesamiento en el laboratorio del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria (CENID)-Microbiología Animal, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

3.3.4 Análisis serológico

Se realizó la prueba de ELISA para la determinación de anticuerpos en muestras de suero, según la metodología descrita por Martínez-Covarrubias *et al.* (2012). Esta prueba tiene una sensibilidad del 79.31 % y una especificidad del 82.25 %, en donde los valores mayores a 0.196 densidades ópticas se consideraron como positivos.

3.3.5 Extracción de ADN y procedimiento de PCR anidada

Se realizó la extracción de ADN a partir de muestras de heces, tejidos y semen, con el kit comercial, Kit BDtract™ Genomic, utilizando el protocolo del fabricante. Las condiciones del Master Mix y de la amplificación por nPCR para todas las muestras fueron las mismas, según el protocolo de Martínez-Covarrubias *et al.* (2012), con cebadores para la secuencia de inserción 900 (IS900), en las muestras de ADN de heces, tejidos y semen. Los cebadores para la primera y segunda reacción fueron los recomendados por Erume *et al.* (2001); para la primera reacción: Paratb1 (5'-TGA TCT GGA CAA TGA CGG TTA CGG A-3') y Paratb 4 (5'-CGC GGC ACG GCT CTT GTT-3'), con la cual se obtuvo un producto de 563 pares de bases (pb). Para la segunda reacción, se utilizaron los cebadores Paratb 2 (5'-GCC GCG CTG CTG GAG TTG A-3') y Paratb 3 (5'-AGC GTC TTT GGC GTC GGT CTT G-3'), con los cuales se obtuvo un producto final de 210 pb. Se utilizó ADN de una cepa de MAP (ATCC #700535) como testigo positivo. El producto de amplificación esperado se

visualizó en gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio. La electroforesis se realizó en una cámara horizontal modelo Horizon 11.14 (Life Technologies®). Las condiciones de la electroforesis fueron de 45 min a 87 voltios. El gel se observó en un transiluminador (modelo Gel Doc 2000, Marca Bio Rad® de luz ultravioleta) y la imagen se capturó por computadora con el programa Quatitvone.

3.3.6 Cultivo de MAP

El aislamiento bacteriológico se realizó de acuerdo al protocolo de Martínez-Covarrubias *et al.* (2012), donde las muestras de tejido y semen fueron descontaminadas con el método ácido álcali y se sembraron por duplicado en medio de cultivo Herrorld, adicionado con yema de huevo y micobactina (2 mg/L, Allied Monitor Inc.). La incubación fue a 37 °C durante un periodo de 14 semanas. Para confirmar la presencia de BAAR, se realizó una tinción de Ziehl-Neelsen (ZN).

3.4 RESULTADOS

La nPCR permitió identificar la presencia de MAP en semen de los carneros infectados, al visualizar una banda de 210 pb en los productos amplificados (Figura 3.1). El 42.9 % de las muestras de ADN obtenidas a partir de semen fueron positivas a nPCR. Sin embargo, no se obtuvo resultados positivos a MAP en semen con la técnica de cultivo (Figura 3.1; d).

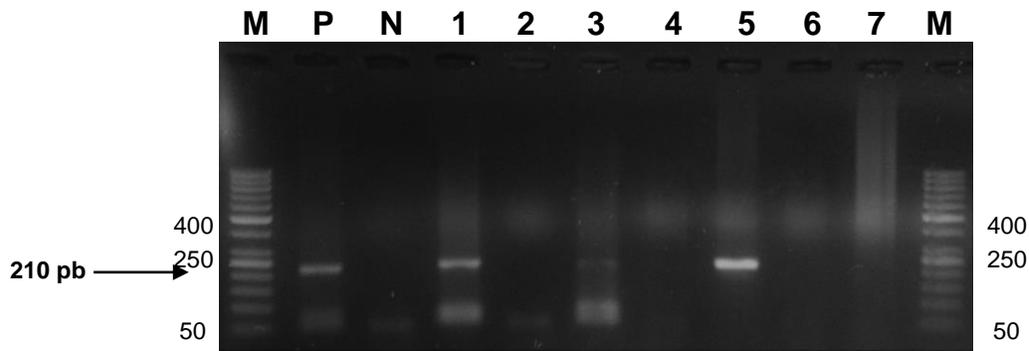


Figura 3.1. Amplificación de ADN por nPCR en muestras de semen proveniente de carneros infectados con PTB en electroforesis en gel de agarosa (1.5 %). Carriles: M: marcador molecular 50 pb; P: testigo positivo (ADN de MAP ATCC #700535); N: testigo negativo ADN de semen de carnero; muestras de ADN de semen de los animales incluidos en el experimento: 1 (positivo), 2 (negativo), 3 (positivo), 4 (negativo), 5 (positivo), 6 y 7 (negativos).

Para determinar la presencia de BAAR, se realizó la tinción de ZN (Figura 3.2) a partir de los aislamientos obtenidos de los cultivos bacteriológicos de tejido digestivo (a), linfático (b), reproductivo (c) y semen (d). Las tinciones demostraron un 22.4 % de presencia de BAAR en todos los tipos de tejido, pero no se mostró crecimiento de MAP en las muestras de semen (d).

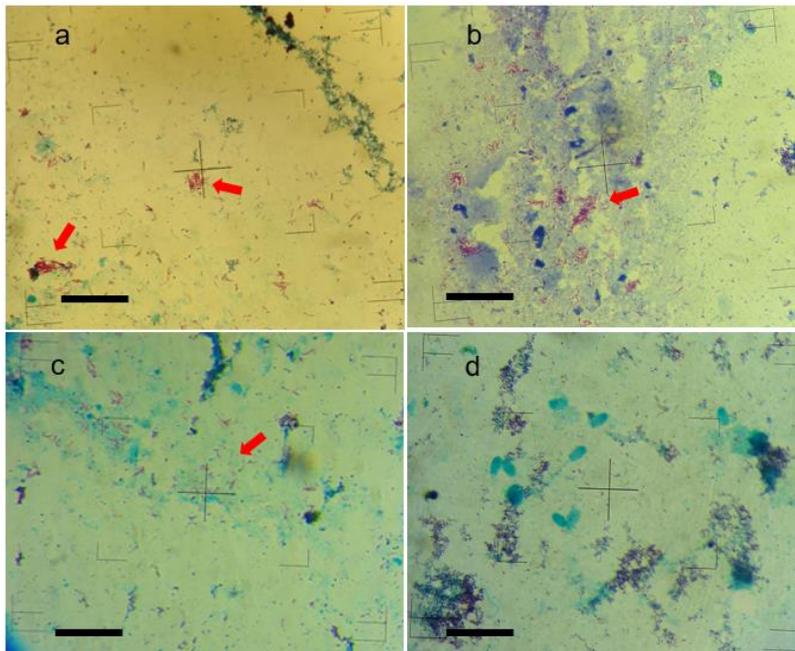


Figura 3.2. Tinción de Ziehl-Neelsen (ZN) a partir de los aislamientos obtenidos de los cultivos bacteriológicos, de: a) intestino, b) linfonodos mesentérico, c) testículo y d) semen. Las flechas en color rojo indican la presencia de BAAR. Barra escala = 10 μ m.

Se identificó la presencia de MAP en muestras de tejido de bazo (14.3 % y 28.6 %) e intestino delgado (42.9 % y 57.1%) por nPCR y cultivo, respectivamente. Para el caso de tejido de los linfonodos mesentéricos, la presencia de la micobacteria fue del 42.9 % con ambas técnicas. Así mismo, se identificó en muestras de tejido reproductivo; 14.3 % en epidídimo y el 28.6 % en glándula de Cowper y próstata, con la prueba de nPCR. Sin embargo, en los cultivos realizados con estos tres tejidos reproductivos, no se observó crecimiento de la micobacteria. En las muestras de testículos, se obtuvo un 28.6 % de presencia de MAP con ambas técnicas (Cuadro 3.3).

Cuadro 3.3. Presencia de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en muestras de tejido y semen.

Identificación de carneros	Bazo		Intestino		Linfonodos mesentéricos		Epidídimo		Glándula de Cowper		Próstata		Testículos		Semen	
	PCR	Cultivo	nPCR	Cultivo	nPCR	Cultivo	nPCR	Cultivo	nPCR	Cultivo	nPCR	Cultivo	nPCR	Cultivo	nPCR	Cultivo
N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
6	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

“+” = resultado positivo, “-” = resultado negativo.

3.5 DISCUSIÓN

Cuando los rumiantes infectados naturalmente con PTB, presentan signos clínicos, es de esperarse el establecimiento de MAP en intestino delgado, especialmente en lámina propia y submucosa, así como en la cápsula y corteza de los linfonodos asociados al intestino (Larsen *et al.*, 1981; Whittington *et al.*, 2012; Garcia y Shalloo, 2015). De esta manera, el presente estudio indica que, las muestras provenientes del intestino delgado presentaron el mayor número de resultados positivos (57 % en cultivo y 42.9 % con nPCR). Este resultado confirma que el tracto intestinal es el principal sitio de infección de PTB; no obstante, MAP también ha sido aislado en sitios extraintestinales (Hasonova *et al.*, 2009), como la identificación de MAP en bazo por nPCR (14.2 %) y por cultivo (28.6 %) en este estudio. Para el caso de las muestras de linfonodos mesentéricos del presente estudio, se identificó MAP en un 42.9 % con ambas pruebas. Este último valor presentó una similitud con lo reportado por Hasonova *et al.* (2009) y Hemalatha y Roy (2013), quienes encontraron valores de 61.2 % y 53 %, respectivamente. Esto es debido principalmente a que los linfonodos y el intestino delgado, son los tejidos donde principalmente se desarrollan las lesiones, como lo confirman Eppleston y Whittington (2001), quienes reportaron el cultivo de MAP a partir de muestras de linfonodos inguinales (72 %) e íleon (100 %), en corderos en estado clínico de PTB. Es relevante enfatizar que la presencia de MAP en sitios extraintestinales, posiblemente se deba a la difusión a través de la sangre y del sistema linfático (Buergelt *et al.*, 2004), lo que permite encontrar a la micobacteria en otros tejidos diferentes al intestinal.

Por lo tanto, MAP se puede identificar en otros sitios extraintestinales, tales como en vesícula seminal y próstata (Larsen *et al.*, 1982), en tejido testicular

(Glawischnig *et al.*, 2004) y semen de bovino (Larsen *et al.*, 1981; Khol *et al.*, 2010). En el presente estudio, la prueba de nPCR detectó MAP en muestras de tejido de epidídimo, glándula de Cowper y próstata; sin embargo, la técnica de cultivo no permitió detectar resultados positivos a MAP en estos tejidos. Ello indica que la técnica de nPCR fue más sensible que la técnica de cultivo. De acuerdo a lo señalado por Nebbia *et al.* (2006), quienes señalan que el cultivo de MAP es una herramienta de diagnóstico poco sensible, sobre todo cuando las micobacterias ya no son viables, en comparación a las técnicas moleculares, las cuales pueden contribuir a la identificación del agente etiológico aunque no esté viable. Así mismo, se ha reportado que el cultivo es capaz de ofrecer un diagnóstico adecuado a partir de 10^{10} organismos viables de la cepa de S de MAP, en ovejas (Windsor, 2015). Mientras que Whipple *et al.* (1992) reportaron que la PCR con cebadores IS900, es capaz de detectar infecciones con tan solo 10^4 unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo, en heces de bovinos.

En las muestras de tejido de testículo, se identificó un 26 % de tejido infectado por MAP con las pruebas de nPCR y cultivo. Estas técnicas también han revelado la presencia de la micobacteria en tejidos de testículo provenientes de un bovino en estado clínico, a pesar de que los tejidos no denotaban lesiones clínicas; estos resultados exhiben la posibilidad de la transmisión de MAP en semen (Glawischnig *et al.*, 2004). De igual manera, Larsen *et al.* (1982) y Ayele *et al.* (2001) afirmaron que, toros diagnosticados en estado clínico pueden estar infectados en varias partes de sus órganos reproductivos y, como consecuencia, pueden portar la bacteria en semen, lo que podría convertir al semen en un vector de transmisión horizontal. Asimismo, en ovinos en la etapa clínica de la infección de PTB, Eppleston y Whittington (2001) obtuvieron aislamientos

positivos en semen de ovinos (27 %), confirmando que la bacteria tiene la habilidad de infectar el semen, a pesar de que no determinaron el origen de MAP. Pero a diferencia del presente estudio, estos autores no reportaron resultados positivos en órganos reproductivos. Esta diferencia en los resultados obtenidos puede deberse a la cantidad de UFC viables presentes en las muestras de tejido y semen. Adicionalmente, este es el primer estudio que confirma la presencia de MAP con nPCR en epidídimo, glándula de Cowper, próstata y testículos en ovinos de pelo en la etapa clínica de la infección de PTB. Sharifzadeh *et al.* (2010) han discutido que la presencia de MAP en semen posiblemente se deba a la habilidad del organismo para sobrevivir a tratamientos con antibióticos; adicionalmente enfatizan en la propiedad de MAP para resistir a la criopreservación en nitrógeno líquido. En el presente estudio se determinó la presencia de MAP con nPCR en el 42.9 % de las muestras de semen; sin embargo, no se logró cultivar la bacteria en ninguna de las muestras de semen. Este resultado coincide con lo reportado por (Khol *et al.*, 2010), quienes reportaron la presencia de MAP en todas las muestras de semen de un bovino con PCR y cebadores IS900, pero no se reportó aislamiento de la micobacteria en cultivo. Tal como señalan los autores, esto posiblemente se deba al escaso número de bacterias presentes en el semen o a la baja viabilidad de las mismas, causada por el proceso de descontaminación de la muestra. Por otra parte, se ha reportado que el proceso de congelación y descongelación de las muestras, puede contribuir a la disminución de la viabilidad de la micobacteria y, por consecuencia, disminuye el subsecuente resultado positivo a MAP en cultivo (Hasonova *et al.*, 2009). No obstante, a pesar de que las micobacterias de las muestras de semen utilizadas en este estudio no mostraron capacidad de

replicación en cultivo; la identificación de MAP en semen por medio de nPCR, revela el riesgo potencial de transmisión horizontal hacia la hembra vía semen, lo cual ya ha sido considerado en bovinos (Larsen *et al.*, 1981; Ayele *et al.*, 2004). Para comprobar el riesgo de transmisión horizontal, se han inseminado vacas con dosis de 5×10^8 UFC de MAP, veinticuatro horas después de la inseminación artificial o después de la monta natural, posteriormente se logró aislar esta micobacteria en útero y en cuernos uterinos durante la primera semana, en útero y linfonodos pélvicos en la segunda semana (Perry *et al.*, 2006). Por otra parte, se tiene que considerar que este tipo de infección, podría retardar los programas de control de la enfermedad (Whittington y Windsor, 2009). Por lo tanto, se recomienda implementar medidas de diagnóstico y manejo oportuno, para identificar y eliminar a los carneros que pueden ser la causa de propagación o permanencia de PTB en los rebaños donde sea requerido. El presente estudio permitió identificar la presencia del *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en tejido linfático, tracto digestivo y semen y, por primera vez, en tejido de epidídimo, glándula de Cowper, próstata y testículos de carneros infectados naturalmente.

3.6 LITERATURA CITADA

Ayele, W.Y., Macháčková, M. and Pavlík, I., (2001). The transmission and impact of paratuberculosis infection in domestic and wild ruminants, *Veterinarni Medicina*. 46, 205–224.

Ayele, W.Y., Bartos, M., Svastova, P. and Pavlik, I., (2004). Distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in organs of naturally infected bull-calves and breeding Bulls, *Veterinary Microbiology*, 103, 209–217.

Bergstein-Galan, T.G., Romualdo Weiss, R. and Ernandes Kozick, L., (2017). Sperm subpopulations in ejaculated sperm and spermatozoa recovered

from ovine epididymides up to 48 h after death, *Animal Reproduction Science*, 187, 20–27 (Elsevier).

Buergelt, C.D., Donovan, G.A. and Williams, J.E., (2004). Identification of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* by Polymerase Chain Reaction in Blood and Semen of a Bull with Clinical Paratuberculosis, *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, 2, 130–134.

Chiodini, R.J., Van Kruiningen, H.J. and Merkal, R.S., (1984). Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): The current status and future prospects, *The Cornell Veterinarian*, 74, 218–262.

Clarke, C.J., (1997). The Pathology and Pathogenesis of Paratuberculosis in Ruminants and Other Species, *Journal of Comparative Pathology*, 116, 217–261.

Eppleston, J. and Whittington, R., (2001). Isolation of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* from the semen of rams with clinical Johne's disease, *Australian Veterinary Journal*, 79, 776–777.

Erume, J., Spergser, J. and Rosengarten, R., (2001). Rapid detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from cattle and zoo animals by Nested PCR *African Health Sciences*, 1, 83–89.

Garcia, A.B. and Shalloo, L., (2015). Invited review: The economic impact and control of paratuberculosis in cattle, *Journal of dairy science*, 98, 5019–39 (Elsevier).

García, E., (2004). *Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen*, Serie Libros, núm. 6, Instituto de Geografía, UNAM, México.

Ghadiali, A.H., Strother, M., Naser, S.A., Manning, E.J.B. and Sreevatsan, S., (2004). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Strains Isolated from Crohn's Disease Patients and Animal Species Exhibit Similar Polymorphic Locus Patterns, *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 5345–5348.

Glawischnig, W., Awad-Masalmeh, M., Khaschabi, D. and Schonbauer, M., (2004). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from the testicles of a clinically infected breeding animal, *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 117, 136–139.

Hasonova, L., Trcka, I., Babak, V., Rozsypalova, Z., Pribylova, R. and Pavlík, I., (2009). Distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in

tissues of naturally infected cattle as affected by age, *Veterinari Medicina*, 54, 257–269.

Hemalatha, S., Roy, P., Purushothaman, V. and Iyue, M., (2013). Paratuberculosis in different breeds of sheep: A retrospective study of cases *International Journal of Mycobacteriology*, 2, 166–170 (Asian-African Society for Mycobacteriology).

Khol, J.L., Kralik, P., Slana, I., Beran, V., Aurich, C., Baumgartner, W. and Pavlík, I., (2010). Consecutive Excretion of *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* in Semen of a Breeding Bull Compared to the Distribution in Feces, Tissue and Blood by IS900 and F57 Quantitative Real-Time PCR and Culture Examinations, *Journal of Veterinary Medical Science*, 72, 1283–1288.

Larsen, A.B. and Kopecky, K.E., (1970). *Mycobacterium paratuberculosis* in reproductive organs and semen of Bulls, *American Journal of Veterinary Research*, 31, 255–258.

Larsen, A., Stalheim, O., Hughes, D., Appell, L., Richards, W. and Himes, E., (1981). *Mycobacterium paratuberculosis* in the semen and genital organs of a semen - donor bull *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 179, 7263470.

Martínez-Covarrubias, A.G., Santillán-Flores, M.A., Ruiz-Guzmán, C.C., Favila-Humara, L. del C., Córdova-López, D., Efrén-Díaz, A., Hernández-Andrade, L. and Blanco-Ochoa, M.Á., (2012). Desarrollo de un inmuno-ensayo enzimático (ELISA) para el diagnóstico de paratuberculosis en bovinos, *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 3, 1–18.

Mcgregor, H., Abbott, K.A. and Whittington, R.J., (2015). Effects of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection on serum biochemistry, body weight and wool growth in Merino sheep: A longitudinal study, *Small Ruminant Research*, 125, 146–153 (Elsevier B.V.).

Nebbia, P., Robino, P., Zoppi, S. and Meneghi, D. De, (2006). Detection and excretion pattern of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in milk of asymptomatic sheep and goats by Nested-PCR, *Small Ruminant Research*, 66, 116–120.

Norma Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995. Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres.

Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

- Perry, G.H., Vivanco, H., Holmes, I., Gwozdz, J.M. and Bourne, J., (2006). No evidence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in in vitro produced cryopreserved embryos derived from subclinically infected cows, *Theriogenology*, 66, 1267–1273.
- Pieper, L., Sorge, U., Godkin, A., DeVries, T., Lissemore, K. and Kelton, D., (2014). Management Practices and Their Potential Influence on Johne's Disease Transmission on Canadian Organic Dairy Farms-A Conceptual Analysis, *Sustainability*, 6, 8237–8261.
- Sharifzadeh, A., Doosti, A., Fazeli, M.H. and Adavoudi, I., (2010). Nested PCR on semen samples for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* *African Journal of Microbiology Research*, 4, 2787–2789.
- Sigurðardóttir, G.Ó., Valheim, M. and Charles McL, P., (2004). Establishment of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in the intestine of ruminants, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56, 819–834.
- Subharat, S., Shu, D., Wedlock, D.N., Price-Carter, M., Lisle, G.W. De, Luo, D., Collins, D.M. and Buddle, B.M., (2012). Immune responses associated with progression and control of infection in calves experimentally challenged with *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 149, 225–236 (Elsevier B.V.).
- Whipple, D.L., Kapke, P.A. and Andersen, P.R., (1992). Comparison of a commercial DNA probe test and three cultivation procedures for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine feces, *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 4, 23–27.
- Whittington, R.J. and Windsor, P.A., (2009). In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: A critical review and meta-analysis, *The Veterinary Journal*, 179, 60–69 (Elsevier Ltd).
- Whittington, R.J., Begg, D.J., Silva, K. De, Plain, K.M. and Purdie, A.C., 2012. Comparative immunological and microbiological aspects of paratuberculosis as a model mycobacterial infection, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 148, 29–47 (Elsevier B.V.).
- Windsor, P.A. and Whittington, R.J., (2010). Evidence for age susceptibility of cattle to Johne's disease, *Veterinary Journal*, 184, 37–44 (Elsevier Ltd).
- Windsor, P.A., (2015). Paratuberculosis in sheep and goats, *Veterinary Microbiology*, 181, 161–169 (Elsevier B.V.).

CAPÍTULO 4. RIESGO E IMPACTO DEL *Mycobacterium avium* SUBSP. *paratuberculosis* EN RUMIANTES (Propuesta para revisión de literatura)

4.1 RESUMEN

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (MAP) es el agente causal de la enfermedad de Johne (JD) o paratuberculosis (PTB), la cual es crónica consuntiva, incurable y que afecta a bovinos, ovejas, cabras, así como a otros animales silvestres. Causa una severa enteritis crónica granulomatosa con linfangiectasia y linfangitis asociada, cuya consecuencia final es la aparición de síndrome de malnutrición con pérdida de peso, diarrea crónica o intermitente y eventualmente la muerte. El objetivo de la presente revisión fue mostrar evidencia del posible riesgo e impacto, en la salud animal y humana, que puede generarse al hacer uso de rumiantes infectados con PTB. Ya que éstos podrían ser un factor de diseminación de la micobacteria al ambiente y a las crías, a pesar de no presentar signos clínicos propios de la enfermedad. Por lo cual, la diseminación oportuna de PTB es motivo de interés principalmente para la industria ganadera, así como para el sector de salud pública, debido a que actualmente no existe un tratamiento asertivo propio para la enfermedad.

Palabras clave: Paratuberculosis, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, rumiantes.

4.2 INTRODUCCIÓN

MAP es conocido como el agente causal de la enfermedad de JD o PTB, siendo MAP un bacilo ácido alcohol resistente (BAAR) el cual fue observado por primera vez por Johne y Frothingham en 1895, tras demostrar su presencia en la porción final del intestino delgado infectado en bovinos, el agente causal de PTB fue universalmente reconocido como una micobacteria, la cual después de muchos años en su clasificación, fue identificada como una subespecie con el nombre de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Thorel *et al.*, 1990). La enfermedad de PTB, se encuentra presente a nivel mundial y ha sido reconocida como una enfermedad altamente contagiosa (Chiodini *et al.*, 1984). Que se encuentra principalmente en rumiantes domésticos y silvestres (Windsor, 2015). De igual manera, la PTB afecta a las especies no rumiantes silvestres como el conejo salvaje europeo (*Oryctolagus cuniculus*) y en carnívoros (Carta *et al.*, 2013; Chiodini *et al.*, 1984). Por lo tanto, los reportes de PTB en animales de fauna silvestre también incluyen especies monogástricas, lo cual representa un riesgo adicional en cuanto a la propagación de la enfermedad (Whittington *et al.*, 2012). La epidemiología de MAP está ligada a las características biológicas del microorganismo, el cual es de lento desarrollo, posee alta resistencia ambiental, es facultativo gram positivo, y para su crecimiento *in vitro* es dependiente de micobactina (Ramírez *et al.*, 2011). Entre las características principales de la patogénesis, está la habilidad de la micobacteria para sobrevivir y replicarse dentro del macrófago (Stempler y Mundo, 2010). La PTB tiene una distribución mundial y su prevalencia varía del 5 al 25 % (Martínez-Covarrubias *et al.*, 2012). Referente a México, la PTB está ampliamente distribuida, los estudios indican que la tasa de prevalencia se encuentra entre el 5 y el 30 %, principalmente en

bovinos, caprinos, ovinos y toros de lidia (Guzmán-Ruiz *et al.*, 2016). Chávez-Gris *et al.* (2004) reportaron prevalencia de PTB en los estados de Querétaro y Guanajuato, del 4.4 % en ovinos (*Ovis aries*), y del 8.8 % en caprinos (*Capra hircus*), usando la prueba de Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP). Sin embargo, el carácter subclínico de la infección y los escasos diagnósticos hacen que la enfermedad esté subestimada en México, causando un impacto negativo en la economía de las exportaciones ovinas (Morón-Cedillo *et al.*, 2013). La vigilancia del MAP está basada en su detección oportuna y control, para lo cual se necesitan técnicas de diagnóstico específicas que permitan localizar los focos de infección; sin embargo, esto último se ve limitado por falta de un diagnóstico oportuno y adecuado (Jaimes *et al.*, 2008).

Los signos clínicos usualmente se desarrollan en meses o años después de la exposición inicial a MAP; con un periodo de incubación cercano a los dos años en los pequeños rumiantes (Whittington *et al.*, 2012). No obstante, esta enfermedad avanza lentamente en las poblaciones, a menos que se introduzcan intervenciones de manejo, ya que la acumulación de infección en la población aumentará cada vez más (Windsor, 2015). A pesar de que la enfermedad afecta principalmente a rumiantes, se ha considerado el vínculo entre la enfermedad de Johne y la enfermedad de Crohn en humanos, lo cual ha generado preocupación sobre la seguridad de productos lácteos (Ghadiali *et al.*, 2004; Garcia *et al.*, 2015). Por lo tanto, el objetivo de la presente revisión fue mostrar evidencia de la transmisión horizontal y vertical de MAP y del posible riesgo e impacto, en la salud animal y humana, que puede generarse al hacer uso de rumiantes infectados con PTB.

4.3 *Mycobacterium avium* SUBSP. *paratuberculosis* (MAP)

La PTB o enfermedad de Jhone es causada por el MAP; micobacteria intracelular de lento crecimiento, Gram positivo, anaerobio (Ayele *et al.*, 2001). Este bacilo mide de 0.5 -1.5 μm de longitud, el organismo fue originalmente nombrado *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis johne*, más recientemente fue llamado *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (*M. a. paratuberculosis*) (Clarke, 1997). O simplemente MAP (Grant, 2005). En su genotipo posee de 14 - 18 copias de un elemento de inserción llamado IS900 (Ayele *et al.*, 2004). MAP es resistente al secado, a condiciones ácidas y a ciertos desinfectantes, puede sobrevivir durante meses en el agua, el suelo y las heces (Chiodini *et al.*, 1984). Y también puede sobrevivir a tratamientos con antibióticos y a procesos de congelación (Khol *et al.*, 2010). Debido a que la pared celular de las micobacterias es compleja, relativamente impermeable y rica en lípidos, lo que le da la propiedad de ser ácido alcohol resistente, la pared celular comprende una capa interna de peptidoglicano, una bicapa asimétrica intermedia de ácidos grasos de cadena larga (ácidos micólicos) unidos al arabinogalactano, y una capa externa de peptidoglicolípidos (micosidos) (Clarke, 1997). El cultivo veterinario/clínico de MAP es de lento crecimiento, puede tardar de 3 a 4 meses o más, a una temperatura de 37 °C y bajo condiciones aerobias, el tamaño de las colonias son pequeñas de (1-2 mm) (Grant, 2005).

4.4 TIPOS DE CEPA

Los organismos de MAP se clasificaron primero en dos grupos que reflejan parcialmente su especificidad de hospedador: el tipo S (Sheep - ovinos), también diseñado como tipo I, y el tipo C (Cattle - bovinos), posteriormente se detectó un tipo III o "intermedio", entre los genotipos S y C, actualmente se clasifica como otro subtipo de la cepa Tipo S (Stevenson, 2015). Los Tipos I y III algunas veces son agrupadas como Tipo I/III, debido a su cercana homología genética (Carta *et al.*, 2013). La literatura describe la identificación de un tercer tipo de cepa, la cepa "Tipo B" (Bisonte), inicialmente aislado de un bisonte en América del Norte, recientemente se ha demostrado que los aislamientos de "tipo Bison" de origen indio no es exactamente idéntica a las cepas estadounidenses "tipo B" y representaba un nuevo genotipo, el cual al parecer es altamente patógeno (Rindi y Garzelli, 2014). Sin embargo, hoy se considera que estos aislados son subtipos dentro del Tipo C o bovino (Stevenson, 2015).

La tipificación de cepa S y C se lleva a cabo por medio de un PCR IS1311, para el cual se utilizan los iniciadores M56 (5'-GCG TGA GGC TCT GTG GTG AA-3') y M119 (5'-ATG ACG ACC GCT TGG GAG AC-3'); que amplifican un fragmento de 608 pb (Correa *et al.*, 2013; Marsh, *et al.*, 1999). La interpretación de la tipificación de estos resultados, se realiza según Marsh *et al.* (1999), donde un aislado es clasificado como perteneciente al tipo "C", si se presenta un patrón de digestión correspondiente a los fragmentos de 67, 218, 285 y 323 pb. Las cepas del tipo "S" son definidas por las bandas de 285 y 323 pb. Se considera que las ovejas son susceptibles a la cepa C, y los bovinos son relativamente resistentes a la infección con la cepa S (Windsor, 2015). La diferenciación de las cepas tipo

B se ha realizado sobre la base del número de copias con una C o una T en el par de bases 223 en la secuencia de inserción IS1311. Todas las copias de IS1311 en cepas de tipo B tienen una posición Tat 223, mientras que las cepas de tipo S todas tienen una C y las cepas de tipo C tienen una o más copias con una C o una T en esta posición (Stevenson, 2015).

Los bovinos generalmente son infectados por la cepa Tipo II, la cual es también la más común en animales de vida silvestre, las ovejas generalmente son infectadas por las cepa Tipo I y las cabras por los tres tipos de cepas (Carta *et al.*, 2012; Windsor, 2015). Durante la examinación de animales infectados con cepas C y S en corderos Assaf, se observó producción de anticuerpos específicos e interferón gamma (IFNg) y fue mayor en animales infectados con la cepa C, los animales infectados con cepas S no presentaron respuestas inmuno constante de IFNg, las lesiones de la cepa C fueron más severas, se concluyó que la cepas de MAP tienen una gran influencia sobre las respuestas inmunológicas y patológicas desarrolladas por el huésped (citado por Windsor, 2015). Adicionalmente, se han demostrado diferencias en la tasa de infección y en la intensidad de lesiones según el tipo de cepa infectante.

4.5 PRINCIPALES TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE *Mycobacterium avium* SUBSP. *paratuberculosis*

El diagnóstico de PTB está basado en la identificación de MAP en muestras clínicas (Méndez-Olvera *et al.*, 2013). Las pruebas más comúnmente utilizadas para la identificación de animales infectados, para la estimación de prevalencia y para programas de control de la enfermedad son: el cultivo fecal (muestras

fecales individuales y combinadas), ELISA sérico y ELISA de leche. La PCR fecal también puede usarse como una prueba confirmatoria (Garcia y Shalloo, 2015).

Debido al curso lento y crónico que caracteriza a esta enfermedad, se diferencian varias fases desde un punto de vista clínico: periodo silente, fase subclínica y fase clínica (Koets *et al.*, 2015). Las pruebas actuales de diagnóstico presentan dificultad para lograr la detección de la infección en la etapa I y no detectan a muchos animales infectados de forma subclínica en la etapa II, por esta razón se ha recomendado hacer uso de más de una prueba confirmatoria para realizar un diagnóstico adecuado de PTB (Ayele *et al.*, 2001). Debido a que el diagnóstico en etapas tempranas del estado subclínico es difícil, ninguna prueba individual puede diagnosticar con precisión todos los animales infectados del hato (Singh *et al.*, 2010).

4.6 CULTIVO DE *Mycobacterium avium* SUBSP. *paratuberculosis*

El cultivo bacteriológico a partir de heces es considerada como la prueba de oro para muchos investigadores, dado que permite la detección clínica y subclínica de paratuberculosis, posee especificidad del 100% sin embargo, presenta una sensibilidad menor a 50% y para su aislamiento se requiere un periodo de ocho a dieciséis semanas (Jaimes *et al.*, 2008). Debido a que MAP es de crecimiento lento y delicado, requiere de una fuente orgánica de hierro; el hierro es quelado por exoquelinas extracelularmente y luego intercambiado con micobactinas asociadas a la membrana, por lo tanto, durante el cultivo requiere de micobactina exógena (Clarke, 1997; Méndez-Olvera *et al.*, 2013).

4.7 ENSAYO POR INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ELISA)

La prueba de diagnóstico que se utiliza con mayor frecuencia es la prueba de ensayo por ELISA, ya que tiene un costo comparativamente bajo, es fácil de realizar, además, el riesgo de contaminar las muestras durante la recolección es bajo (Stau *et al.*, 2012). Sin embargo, a pesar de que esta prueba serológica presenta alta especificidad (85 - 100 %) es considerada como una prueba no perfecta, ya que depende del Kit que es utilizado, de la especie, y de la etapa de infección en que se encuentre el animal, lo cual puede disminuir la sensibilidad a un 50 % (Begg *et al.*, 2015).

4.8 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Otra alternativa a la prueba serológica son las pruebas de diagnóstico molecular como la PCR, la cual permite tener un diagnóstico rápido, en menos de 24 horas (Kaur *et al.*, 2011; Khol *et al.*, 2010). La PCR con secuencias específicas para el ADN de MAP es utilizada para confirmar el resultado de un cultivo, o bien, para realizar la detección de MAP en muestras de heces, tejido, sangre y leche (Khol *et al.*, 2010). El hacer uso de la PCR presenta la ventaja adicional de que detecta cepas de MAP que son incultivables (Kaur *et al.*, 2011). La especificidad de la prueba es del 90 % y cercana al 100 % en PCR en tiempo real (qPCR) (Khol *et al.*, 2010). La PCR anidada con cebadores IS900 ha sido eficaz para detectar MAP a partir de muestras de semen de toros, camélidos y ovejas, y es considerada como una prueba valiosa para la detección en rebaños con la enfermedad de Johne (Khamesipour *et al.*, 2014; Sharifzadeh *et al.*, 2010).

Los iniciadores que más se han estudiado son los diseñados a partir de la secuencia nucleotídica llamada secuencia de inserción 900 (IS900), considerada como específica para MAP, con la finalidad de favorecer la especificidad y sensibilidad en el diagnóstico de PTB (Jaimes *et al.*, 2008). La secuencia de inserción IS900 fue descubierta en los 1980s y es un segmento de 1451 pb y se repite de 15 a 20 veces en el genoma de MAP (Vansnick *et al.*, 2004). Sin embargo, se han obtenido resultados falso positivos con PCR IS900 para algunos complejos de cepas de *Mycobacterium avium* y para cepas no aisladas de MAP, lo cual causa incertidumbre acerca de la especificidad (Citado por Möbius *et al.*, 2008). Debido a que ha sido reportada una homología del 97% en el ADN entre los aislados de MAP con *M. avium* subespecie *avium* (Vansnick *et al.*, 2004). Por lo cual, Möbius *et al.* (2008) y Correa *et al.* (2013) recomiendan utilizar la secuencia de inserción IS900, junto con el resultado positivo de otro blanco específico como el F57, para evitar falsos positivos. La secuencia F57 es específica para la enfermedad de Johne's, no se encuentra en ninguna otra especie de micobacteria o especie de *M. avium* subespecies *avium*, éste es un segmento de 620 bp con un contenido de G + C del 58.9 % (Vansnick *et al.*, 2004). Sin embargo, la región F57 presenta bajo número de copias en el genoma en MAP a comparación de la región IS900, lo cual disminuye la sensibilidad (Kaur *et al.*, 2011).

4.9 TRANSMISIÓN HORIZONTAL

La vía de infección más común de MAP es fecal-oral, por el consumo de organismos a partir de la alimentación con leche/calostro infectado, la contaminación fecal de los pezones o la ingestión de alimentos y agua

contaminada, es el medio más importante de transmisión (Kopečna *et al.*, 2008). Los animales más susceptibles de contraer la infección son los jóvenes, especialmente antes de los seis meses de edad o durante la lactancia, en neonatos aumenta la probabilidad de que sean susceptibles, debido a que se está incrementando la permeabilidad del intestino durante las primeras 24 h de vida (Chiodini *et al.*, 1984). La infección de crías mediante la leche o calostro también puede presentarse en vacas asintomáticas (Khol *et al.*, 2010). Cuando un animal se encuentra en estado clínico de la enfermedad, puede excretar entre 1.3×10^5 y 5.9×10^9 microorganismos por gramo de materia fecal (Manning y Collins, 2001). Esta cantidad de microorganismos es alta, debido a que se ha reportado la infección experimental con tan solo 10^3 organismos vía oral en corderos, los cuales presentaron lesiones microscópicas en intestino (Clarke, 1997). Es posible que solo se requiera una pequeña dosis de microorganismos para establecer la infección en un ternero recién nacido, y probablemente sea posible una resistencia abrumadora relacionada con la edad mediante la introducción de una gran dosis de organismos en una vaca adulta, por lo que la progresión de la enfermedad depende de la cantidad de organismos en la exposición y la edad del animal (Sweeney, 1996).

En especies de vida silvestre y exótica, se sospecha que la infección ocurre por consumo de pastos contaminados por ovinos y bovinos (Carta *et al.*, 2013). Por lo cual, la propagación de MAP mediante las heces representa un contratiempo para controlar la infección (Windsor y Whittington 2010; Pritchard *et al.*, 2017). Debido a que se ha reportado que un animal en estado clínico tiene el potencial para infectar a 25 animales (García y Shalloo, 2015). De tal manera, que el

control de la enfermedad en los rumiantes domésticos depende de la detección oportuna y de la eliminación de los animales afectados, aunque esto se ve limitado por la falta de un diagnóstico adecuado (Jaimes *et al.*, 2008).

4.10 TRANSMISIÓN VERTICAL

Las micobacterias patógenas tienen más de un mecanismo de transmisión entre animales, si bien es probable que la transmisión fecal-oral de MAP es el medio dominante de perpetuación de la enfermedad de Johne en el ganado, es poco probable que sea el único medio (Whittington y Windsor, 2009). En vacas en estado clínico se ha reportado el aislamiento de MAP en útero y de fluidos uterinos (Rohde *et al.*, 1999). Y se ha estimado que los fetos provenientes de vacas infectadas en estado subclínico se infectan en 9 % y los fetos provenientes de vacas en estado clínico se infectan en un 39 %, pero se considera que el mecanismo de infección intrauterina aún es incierto (Windsor y Whittington, 2010). Con base en los estudios publicados, es complicado inferir sobre el inicio de este tipo de infección, sin embargo, se puede implicar la diseminación hematogena en el tejido del útero gestante, seguida de colonización o movimiento a través de la carúncula materna y alantocoreana fetal ya que se detectó MAP en sangre materna y en ambos tejidos placentarios, otra posibilidad es que el organismo acceda al útero a través de la vulva, asociado con una mala conformación vulvar y el desprendimiento fecal (Whittington y Windsor, 2009).

En los machos se ha considerado que la contaminación del semen incorpora dos principios; el primero es debido a la presencia y cantidad del MAP en semen y, el segundo, se relaciona a la habilidad del organismo para establecer la infección

en el huésped vía vaginal (Eppleston y Whittington, 2001). El primer principio aún es motivo de debate debido a que se ha argumentado que la transmisión de MAP vía semen es improbable por la baja cantidad de MAP en los eyaculados de semen infectados (Buergelt y Williams, 2004). Adicionalmente, se ha reportado que posiblemente no exista infección de embriones expuestos a PTB, debido a la presencia de la zona pelúcida, la cual es una barrera efectiva de protección contra el agente patógeno (Kruip *et al.*, 2004). Sin embargo, es importante monitorear a los machos, ya que aún en estado subclínico de PTB pueden contener MAP en el semen (Ayele *et al.*, 2004).

En bovinos se ha encontrado el organismo en semen, testículos, epidídimo, vesícula seminal y otros órganos parenquimatosos (Ayele *et al.*, 2004). Por lo cual, se ha demostrado que la infección puede diseminarse a sitios extraintestinales, en toros se ha reportado el aislamiento de MAP en el tracto reproductivo y semen (Khol *et al.*, 2010; Larsen *et al.*, 1981; Larsen y Kopecky, 1970). Se considera que el semen se puede convertir en un vector de transmisión de MAP (Ayele *et al.*, 2001; Larsen *et al.*, 1981). Por tanto, en el ganado además de encontrar la infección en intestino, MAP también se puede encontrar en sitios extra-intestinales, debido a la difusión a través de la sangre y del sistema linfático (Buergelt y Williams, 2004). Larsen *et al.* (1970) trabajaron con 6 bovinos donadores de semen durante 21 meses y lograron aislar MAP en semen, en la necropsia se aisló MAP de vesículas seminales y próstata, pero no en testículos. Por su parte, Sharifzadeh *et al.* (2010) demostraron que MAP se puede detectar en semen de toros con el uso de PCR anidada con cebadores específicos para IS900, con lo cual obtuvieron 12.50 % de muestras portadoras de la

micobacteria. Glawischnig *et al.* (2004) trabajaron con bovinos de 6 años de edad, los cuales presentaban signos clínicos de PTB, al realizar la necropsia no se observaron lesiones histológicas; sin embargo, realizaron frotis de tejidos testiculares y detectaron BARR, con los cuales realizaron PCR, se demostró la presencia de PTB en testículos. Lo cual coincide a lo reportado por Buergelt *et al.* (2004) quienes aseveran que, a diferencia del tracto intestinal, los órganos reproductivos infectados no presentan respuesta inflamatoria. En ovinos se han obtenido aislamientos positivos en semen (27 %), confirmando que la bacteria tiene la habilidad de infectar el semen, a pesar de que no determinaron el origen de MAP (Eppleston y Whittington, 2001).

Por otra parte, se debe considerar que las nuevas tecnologías reproductivas también pueden comprometer la esterilidad de los embriones, a través de la contaminación por nitrógeno líquido, por lo que el semen y los embriones pueden ser infectados con muchos microorganismos, los cuales conservan su viabilidad durante largos periodos a temperaturas de congelación (Bielanski *et al.*, 2012). Debido a que MAP puede sobrevivir a procesos de congelación y a tratamientos con antibióticos (Khol *et al.*, 2010). Bielanski, (2012) menciona que para reducir el riesgo de contaminación se realiza la técnica de gradiente de centrifugación y/o procedimiento Swim-up para eliminar o reducir la carga de diversos virus y bacterias en el semen congelado-descongelado antes de la fertilización, ya que se ha demostrado que este procedimiento disminuye el riesgo de transmisión de enfermedades a receptores y la contaminación de la fecundación *in vitro*.

4.11 RIESGO DE MAP EN LA SALUD PÚBLICA

La enfermedad de PTB, se encuentra presente a nivel mundial y ha sido reconocida como una de las enfermedades altamente contagiosas (Chiodini *et al.*, 1984). A pesar de que la enfermedad afecta principalmente a rumiantes, se ha considerado, el vínculo entre la enfermedad de Johne y la enfermedad de Crohn en humanos lo cual ha generado preocupación sobre la seguridad de productos lácteos, priorizando el control de la enfermedad particularmente en el ganado lechero (Garcia y Shalloo, 2015). Dalziel en 1913 (citado por Rocca *et al.*, 2010), fue el primero que reportó una posible asociación entre la enfermedad de Crohn, en humanos, ya que refirió una gran similitud con la proliferación crónica de enteritis causada por MAP en rumiantes con la enteritis crónica con humanos, esta fue la idea principal de la asociación de ambas enfermedades. Adicionalmente, MAP ha sido aislada en pacientes diagnosticados con la enfermedad de Crohn, lo cual se respalda la teoría anterior (Green *et al.*, 1989; Greenstein, 2003). Aunque, el papel de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* como agente etiológico de la enfermedad de Crohn en humanos es objeto de debate (Garcia y Shalloo, 2015; Whittington *et al.*, 2005). Debido a que no existe evidencia definitiva para demostrar que MAP contribuye a la enfermedad de Crohn en humanos, sin embargo, es más frecuente que sea detectada en pacientes con la enfermedad de Crohn (Garcia y Shalloo, 2015).

4.12 IMPACTO ECONÓMICO DE LA PARATUBERCULOSIS

Ramírez *et al.* (2011) indican que PTB en hatos de ganado lechero, causa grandes pérdidas económicas, a causa de los efectos derivados del

desmejoramiento de la condición corporal, debidas a los efectos negativos sobre la producción, la salud, la reproducción, el costo de los procedimientos de diagnósticos y de monitoreo. Por su parte, Raizman *et al.* (2004) afirman que las pérdidas económicas son debido a la menor producción de leche, menor valor de la canal al sacrificio, disminución de la vida productiva de por eliminación prematura y por costos de tratamiento. Por lo cual Garcia y Shalloo, (2015). Afirman que la propagación de PTB es motivo de gran preocupación para el sector ganadero, ya que no hay tratamiento que sea efectivo para los animales infectados. Hecho que resulta de gran importancia debido a que es una enfermedad incurable que podría poner en riesgo la reputación del sector agroalimentario (Pritchard *et al.*, 2017).

En Estados Unidos PTB se estima pérdidas económicas graves de alrededor de \$ 200 a \$ 250 millones al año, solo en la industria láctea (Wu *et al.*, 2007). El costo del control de la paratuberculosis en hatos con prevalencia inferior al 10 % se estima en \$ 97/vaca¹, en comparación a hatos con prevalencia mayor al 10 %, donde los costos son de \$ 245/vaca¹, aunque estas cifras pueden subestimar los costos reales debido a la dificultad de medir las pérdidas subclínicas (Windsor y Whittington, 2010). Ramírez *et al.* (2011) hacen un estimado en hatos con una prevalencia relativamente alta de paratuberculosis (>10%), donde reportan pérdidas de hasta 700 kg de leche por vaca.

El impacto económico de la paratuberculosis en México es poco valorado, sin embargo, un estudio realizado en Tizayuca, Hidalgo, por Miranda (2005) demostró que las pérdidas por esta enfermedad son de \$ 10,345 por vaca al año.

Lo que representó una pérdida en la Cuenca de \$ 25, 411, 836 al año, que expresa el 4% del precio por litro pagado al productor, del total de costos, adicionalmente, la mayor pérdida se observó con una disminución en la producción de leche (47%). Los datos anteriormente mencionados se describen con mayor detalle en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Impacto económico anual de la paratuberculosis bovina por variable y por estrato del Complejo Agropecuario Industrial Tizayuca, Hidalgo, México.

Estrato de los hatos	Estimación número de vacas seropositivas	Desecho prematuro	Disminución de producción láctea
1 (Chico)	\$228.20	\$750,405.63	\$2,014,465.88
2 (Mediano)	\$300.37	\$1,532,996.41	\$4,115,332.89
3 (Grande)	\$1,240.36	\$2,109,316.81	\$5,662,466.29
Totales		\$4,392,718.85	\$11,792,265.06
Porcentaje del total		17.6 %	47.2 %

Estrato de los hatos	Falla reproductiva	Tratamiento medico	Total de pérdidas económicas
1 (Chico)	\$887,684.50	\$629,248.64	\$4,271,804.64
2 (Mediano)	\$1,793,013.18	\$1,285,486.96	\$8,726,828.95
3 (Grande)	\$2,467,085.26	\$1,768,756.36	\$12,007,624.95
Totales	\$5,147,782.94	\$3,683,491.96	\$25,006,258.54
Porcentaje del total	20.6 %	14.7 %	100 %

Modificado de Miranda (2005).

El impacto económico de la paratuberculosis puede ser considerado en los rebaños, a partir de casos clínicos, sin embargo, los efectos de la paratuberculosis en estado subclínico, no es de todo claro, por lo tanto las estimaciones de las pérdidas económicas dependen del correcto diagnóstico (Garcia y Shalloo, 2015).

4.13 CONCLUSIONES

Se ha logrado aislar a la micobacteria a partir de muestras provenientes de vesículas seminales, próstata y en semen, en bovinos, y en semen en ovinos, por ende, el uso de sementales infectados podría ser una posible causa de transmisión de MAP hacia las hembras. Las consecuencias de infectar al hato se reflejan en pérdidas económicas causadas por el desmejoramiento de la condición corporal, la menor producción de leche, menor valor de la canal al sacrificio, disminución de fertilidad y por gastos infructuosos asociados al tratamiento debido a que PTB es incurable. Por lo que, es de gran importancia realizar estudios de diagnóstico de PTB en los sementales, ya que la detección oportuna permite realizar prácticas preventivas, para disminuir el riesgo de transmisión del agente causal hacia las hembras y a las crías, durante. De igual manera, es necesario plantear estrategias de manejo reproductivo para minimizar los riesgos de transmisión de MAP en semen, independientemente del estado clínico o subclínico del semental que se va a utilizar durante el manejo reproductivo.

4.14 LITERATURA CITADA

- Ayele, W.Y., Macháčková, M. and Pavlík, I., (2001). The transmission and impact of paratuberculosis infection in domestic and wild ruminants, *Veterinarni Medicina*. 46, 205–224.
- Ayele, W. Y., Bartos, M., Svastova, P., and Pavlik, I. (2004). Distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in organs of naturally infected bull-calves and breeding bulls. *Veterinary Microbiology*, 103(3–4), 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.07.011>
- Begg, D. J., de Silva, K., Plain, K. M., Purdie, A. C., Dhand, N., and Whittington, R. J. (2015). Specific faecal antibody responses in sheep infected with

Mycobacterium avium subespecie *paratuberculosis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 166, 125–131.

Bielanski A. 2012. A review of the risk of contamination of semen and embryos during cryopreservation and measures to limit cross-contamination during banking to prevent disease transmission in ET practices. *Theriogenology* 77, 467-482.

Buergelt, C. D., Donovan, G. A., and Williams, J. E. (2004a). Identification of *Mycobacterium avium* subespecies *paratuberculosis* by Polymeerase Chain Reaction in Blood and Semen of a Bull with Clinical Paratuberculosis. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, 2(2), 130–134.

Carta, T., Martin-Hernando, M. P., Boadella, M., Fernández-de-Mera, I. G., Balseiro, A., Sevilla, I. A., ... Gortazar, C. (2012). No evidence that wild red deer (*Cervus elaphus*) on the Iberian Peninsula are a reservoir of *Mycobacterium avium* subespecies *paratuberculosis* infection. *Veterinary Journal*, 192(3), 544–546. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.08.010>

Carta, T., Alvarez, J., Pérez de la Lastra, J. M., and Gortázar, C. (2013). Wildlife and paratuberculosis: A review. *Research in Veterinary Science*, 94(2), 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.11.002>

Chávez Gris, G., Tavera Trigo, F. J., Svastova, P., and Pavlik, I. (2004). Identificación del polimorfismo genético de aislamientos de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* de caprinos del centro de México. *Veterinaria México*, 35(1), 75–82.

Chiodini, R. J., Van Kruiningen, H. J., and Merkal, R. S. (1984). Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): The current status and future prospects. *The Cornell Veterinarian*, 74(2), 218–262.

Clarke, C. J. (1997). The Pathology and Pathogenesis of Paratuberculosis in Ruminants and Other Species. *Journal of Comparative Pathology*, 116(3), 217–261.

Correa, M., Medina, G., Rentería, T., Moge, F., González, V., and López, G. (2013). Caracterización molecular de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* en bovinos y ovinos de Mexicali, Baja California, México. *Rev Mex Cienc Pec*, 4(4), 489–500.

Eppleston, J., and Whittington, R. (2001). Isolation of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* from the semen of rams with clinical Johne's disease. *Australian Veterinary Journal*, 79(11), 776–777.

- Garcia, A. B., and Shalloo, L. (2015). Invited review: The economic impact and control of paratuberculosis in cattle. *Journal of Dairy Science*, 98(8), 5019–39. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-9241>.
- Glawischnig, W., Awad-Masalmeh, M., Khaschabi, D. and Schonbauer, M., (2004). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from the testicles of a clinically infected breeding animal, *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 117, 136–139.
- Grant, I. R. (2005). Zoonotic potential of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: the current position. *Journal of Applied Microbiology*, (98), 1282–1293. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02598.x>.
- Green, E.P., Tizard, M.L.V., Moss, M.T., Thompson, J., Winterbourne, D.J., McFadden, J.J., Hermon-Taylor, J. (1989). Sequence and characteristic of IS900: an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Nucleic Acids Res.* 17:9063–9087.
- Greenstein, R.J. 2003. Is Crohn's disease caused by a mycobacterium? Comparisons with leprosy, tuberculosis, and Johne's disease. *Lancet Infect. Dis.* 3:507–514.
- Guzmán-Ruiz, C. C., Santillán-Flores, M. A., and Córdova-López, D. (2016). Prevalence and possible risk factors for caprine paratuberculosis in intensive dairy production units in Guanajuato, México. *Veterinary Medicine and Animal Health*, 8(11), 156–162. <https://doi.org/10.5897/JVMAH2016.0497>.
- Jaimes, G.N., Santillán, F.M.A., Hernández, C.O.A., Córdova, L.D., Guzmán, R.C.C., Arellano, R.B., Díaz, A.E., Tenorio, G.V.R., Cuéllar, O.A. (2008). Detección de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*, por medio de PCR-anidada a partir de muestras de heces de ovinos. *Veterinaria México*, 39(01), 377–386.
- Kaur, P., Folia, G., Singh, S. V, Patil, P. K., Ravi Kumar, G. V. P. P. S., and Sandhu, K. S. (2011). Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: IS900 PCR identification and IS1311 polymorphism analysis from ruminants in the Punjab region of India. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 34(2), 163–169. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2010.09.002>.
- Khamesipour, F., Doosti, A., and Mazrouei Sebdani, M. (2014). Survey for the Presence of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in the Bull Frozen Semen Samples and Blood Samples of Cattle, Sheep and Camel by Nested-PCR. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 20(5), 681–686.

- Khol, J. L., Kralik, P., Slana, I., Beran, V., Aurich, C., Baumgartner, W., and Pavlík, I. (2010). Consecutive Excretion of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Semen of a Breeding Bull Compared to the Distribution in Feces, Tissue and Blood by IS900 and F57 Quantitative Real-Time PCR and Culture Examinations. *Journal of Veterinary Medical Science*, 72(10), 1283–1288.
- Koets, A. P., Eda, S., and Sreevatsan, S. (2015). The within host dynamics of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infection in cattle: Where time and place matter. *Veterinary Research*, 46(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0185-0>.
- Kopecna, M., Parmova, I., Dvorska-Bartosova, L., Moravkova, M., Babak, V., and Pavlik, I. (2008). Distribution and transmission of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in farmed red deer (*Cervus elaphus*) studied by faecal culture, serology and IS900 RFLP examinations. *Veterinarni Medicina*, 53(9), 510–523.
- Kruip, T. A. M., Muskens, J., & Roermund, H. J. W. Van. (2004). Lack of association of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with oocytes and embryos from moderate shedders of the pathogen, 59(2003), 1651–1660.
- Larsen, A. B., and Kopecky, K. E. (1970). *Mycobacterium paratuberculosis* in reproductive organs and semen of bulls. *American Journal of Veterinary Research*, 31, 255–258.
- Larsen, A., Stalheim, O., Hughes, D., Appell, L., Richards, W., and Himes, E. (1981). *Mycobacterium paratuberculosis* in the semen and genital organs of a semen-donor bull. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 179(2), 7263470.
- Manning, E. J., and Collins, M. T. (2001). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 20(1), 133–50. Retrieved from <http://europemc.org/abstract/med/11288509>.
- Marsh, I., Whittington, R., and Cousins, D. (1999). PCR-restriction endonuclease analysis for identification and strain typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium* based on polymorphisms in IS1311. *Mol. Cell Probes*, 13(2), 115–126. Retrieved from [papers3://publication/uuid/9C9D0064-000B-43AB-BCE7-86E82AFFB1B2](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9930064/).
- Martínez-Covarrubias, A. G., Santillán-Flores, M. A., Ruiz-Guzmán, C. C., Favila-Humara, L. del C., Córdova-López, D., Efrén-Díaz, A., ... Blanco-Ochoa, M.

- Á. (2012). Desarrollo de un inmuno-ensayo enzimático (ELISA) para el diagnóstico de paratuberculosis en bovinos. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 3(1), 1–18.
- Méndez Olvera, T. E., Ramírez Lorenzo, N. I., Rojas Serranía, N., Olivares Orozco, L. J., and Martínez Gómez, D. (2013). Detección de *Mycobacterium avium paratuberculosis* en caprinos ubicados en una zona semi-árida en el municipio de Tecozautla Hidalgo. *Rev. Salud Anim.*, 35(3), 182–188.
- Miranda BMV. (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, UNAM 2005.
- Möbius, P., Hotzel, H., Raßbach, A., and Köhler, H. (2008). Comparison of 13 single-round and nested PCR assays targeting IS900, ISMav2, f57 and locus 255 for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Veterinary Microbiology*, 126(4), 324–333. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.07.016>.
- Morón-Cedillo Felipe de Jesús. Cortez-Romero César. Gallegos-Sánchez Jaime. Figueroa-Sandoval Benjamín. Aquino-Pérez Gildardo. Amante-Orozco Alejandro. (2013). Prevalencia de la infección por *mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* en rebaños de ovinos de dos municipios de san luis potosí, México. *Revista Científica, FCV-LUZ, XXIII(4)*, 293–299.
- Pritchard, T. C., Coffey, M. P., Bond, K. S., Hutchings, M. R., and Wall, E. (2017). Phenotypic effects of subclinical paratuberculosis (Johne' s disease) in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 100(1), 1–12. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11323>.
- Ramírez-V, N., Rodríguez, B., and Fernández-S, J. (2011). Diagnóstico clínico e histopatológico de paratuberculosis bovina en un hato lechero en Colombia. *Revista MVZ Cordoba*, 16(3), 2742–2753.
- Rindi, L., and Garzelli, C. (2014). Genetic diversity and phylogeny of *Mycobacterium avium*. *Infection, Genetics and Evolution*, 21, 375–383. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.12.007>.
- Rocca S., T. Cubeddu, Nieddu A.M., Pirino S., Appino S., Antuofermo E., Tanda F., Verin R., Sechi L.A., Taccini E., Leoni A. 2010. Detection of *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* (MAP) in samples of sheep paratuberculosis (Johne's disease or JD) and human Crohn's disease (CD) using liquid phase RT-PCR, in situ RT-PCR and immunohistochemistry. *Small Ruminant Research*. Volume 88, Issues 2–3, Pages 126–134.

- Rohde RF, Shulaw WP. 1990. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from the uterine flush fluids of cows with clinical paratuberculosis. *J Am Vet Med Assoc*;11:1482–3.
- Sharifzadeh, A., Doosti, A., Fazeli, M. H., and Adavoudi, I. (2010). Nested PCR on semen samples for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *African Journal of Microbiology Research*, 4(24), 2787–2789.
- Singh, A. V., Singh, S. V., Singh, P. K., and Sohal, J. S. (2010). Genotype diversity in Indian isolates of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* recovered from domestic and wild ruminants from different agro-climatic regions. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 33(6), e127–e131. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2010.08.001>.
- Stau, A., Seelig, B., Walter, D., Schroeder, C., and Ganter, M. (2012). Seroprevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in small ruminants in Germany. *Small Ruminant Research*, 105(1–3), 361–365. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.03.008>.
- Stempler, A., and Mundo, S. L. (2010). Inmunodetección de p34 de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en macrófagos bovinos infectados. *Revista Argentina de Microbiología*, 42, 236.
- Stevenson, K. (2015). Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and the influence of strain type on infection and pathogenesis: a review. *Veterinary Research*, 46(1), 64. <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0203-2>.
- Sweeney, R. W. (1996). Transmission of paratuberculosis. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*. Elsevier Masson SAS. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30408-4](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30408-4).
- Thorel, M., and Lévy-Krichevsky, M Frébault, V. (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*, 40(July 1990), 254–260.
- Vansnick, E., De Rijk, P., Vercammen, F., Geysen, D., Rigouts, L., and Portaels, F. (2004). Newly developed primers for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Veterinary Microbiology*, 100(3–4), 197–204. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.02.006>.
- Whittington, R. J., Marsh, I. B., and Reddacliff, L. A. (2005). Survival of

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* in Dam Water and Sediment. *Applied and environmental microbiology*, 71(9), 5304–5308. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5304>.

Whittington, R. J., and Windsor, P. A. (2009). In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a critical review and meta-analysis. *The Veterinary Journal*, 179(1), 60–9. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.08.023>.

Whittington, R. J., Begg, D. J., Silva, K. De, Plain, K. M., and Purdie, A. C. (2012). Comparative immunological and microbiological aspects of paratuberculosis as a model mycobacterial infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 148(1–2), 29–47. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.03.003>.

Windsor, P. A. (2015). Paratuberculosis in sheep and goats. *Veterinary Microbiology*, 181(1–2), 161–169. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.07.019>.

Windsor, P. A., and Whittington, R. J. (2010). Evidence for age susceptibility of cattle to Johne's disease. *The Veterinary Journal*, 184(1), 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.01.007>.

Wu, C. W., Livesey, M., Schmoller, S. K., Manning, E. J. B., Steinberg, H., Davis, W. C., et al. Talaat, A. M. (2007). Invasion and persistence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* during early stages of Johne's disease in calves. *Infection and Immunity*, 75(5), 2110–2119. <https://doi.org/10.1128/IAI.01739-06>

CONCLUSIONES GENERALES

Los sementales ovinos de pelo diagnosticados con paratuberculosis en estado subclínico no mostraron afectación en variables de peso vivo, circunferencia escrotal y latencia al eyaculado. De igual manera, las variables seminales de volumen, pH, motilidad masal, motilidad individual progresiva, concentración, espermatozoides vivos y espermatozoides muertos, no mostraron diferencias significativas debido a la infección por la enfermedad. Por otra parte, la subnutrición durante dos meses con paja de avena favoreció la transición de estado subclínico a clínico de PTB en carneros adultos de raza Pelibuey, la presencia de heces pastosas aumento en un 42.9 % y se generó diarrea en un 28 %, la pérdida de peso en los caneros fue del 25 % y el 28 % de los carneros que fallecieron al final del periodo de restricción.

Por otra parte, se identificó MAP en tejido testicular en un 28.6 % con técnicas de PCR y cultivo, y la presencia de MAP en muestras de semen con nPCR fue del 42.9 %, y por primera vez, se reporta la presencia de MAP en epidídimo, glándula de Cowper, próstata y testículos de carneros Pelibuey infectados naturalmente. Por lo tanto, es de gran importancia realizar estudios de diagnóstico de PTB en los carneros que sean utilizados como sementales, ya que la detección oportuna permite realizar prácticas profilácticas, para disminuir el riesgo de la transmisión del agente causal hacia las hembras (vía horizontal) y a las crías (vía vertical).