

Abanico Veterinario. Enero-Diciembre 2021; 11:1-13. <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2021.5>
Artículo Original. Recibido: 28/08/2020. Aceptado: 15/01/2021. Publicado: 30/01/2021. Clave:2020-74.

Identificación del *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* y su seroprevalencia en rebaños ovinos de Aguascalientes

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* identification and seroprevalence in sheep flocks in Aguascalientes

Pallás-Guzmán Gabriel¹ ID, Quezada-Tristán Teóduo¹ ID, Chávez-Gris Gilberto² ID, Maldonado-Castro Edith² ID, Chávez-González Leticia¹ ID, García-Munguía Carlos^{*3} ID

¹Centro de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma de Aguascalientes. Av Universidad 940, col. Ciudad Universitaria, CP 20131, Aguascalientes, Aguascalientes. México. ²Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (CEIEPAA), UNAM. Carretera Federal Tequisquiapan a, Ezequiel Montes Km 8.5, CP 76790, Tequisquiapan, Querétaro, México. ^{3*}Autor para la correspondencia: García-Munguía Carlos, Departamento de Veterinaria y Zootecnia, Universidad de Guanajuato. Carretera Irapuato-Silao km 9, CP 36500 Irapuato, Guanajuato, México. cagamu@hotmail.com, gepallas@correo.uaa.mx, tequezada@correo.uaa.mx, gris@unam.mx, edithmc@unam.mx, lchavezglz@hotmail.com

RESUMEN

Con el objetivo de identificar la presencia de Paratuberculosis (PTB), enfermedad infecciosa causada por el *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* (MAP), en ovinos, a través de estudios anatomopatológicos, cultivo bacteriano y PCR *IS900*, así como estimar la seroprevalencia a MAP. El presente estudio, de tipo transversal, se realizó en 16 diferentes rebaños con el suero de 2415 animales adultos y analizados por Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA); se emplearon nueve ovinos con signos clínicos sugerentes a PTB, de los cuales se obtuvieron muestras para la realización de los estudios de identificación; obteniendo un 51.3 % de animales seropositivos a MAP (1239/2415), en el 100% de los rebaños (16/16); el aislamiento bacteriano y su identificación por PCR *IS900* en cinco de los nueve casos hallados (5/9) correspondiendo al 31.25% de los rebaños (5/16). Conformando la presencia del *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*, así como una elevada frecuencia de animales seropositivos a MAP en rebaños de Aguascalientes.

Palabras clave: Paratuberculosis, ovinos, seroprevalencia, *Mycobacterium*.

ABSTRACT

With the objective of identifying the presence of Paratuberculosis (PTB), an infectious disease caused by *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* (MAP), in sheep, through pathological studies, bacterial culture and *IS900* PCR, as well as estimating seroprevalence to MAP. The present cross-sectional study, was conducted in 16 different flocks, with the serum of 2415 adult sheep, and analyzed by Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA); nine sheep were used with clinical signs suggestive of PTB, from which samples were obtained for the identification studies; obtaining 51.3% of animals seropositive to MAP (1239/2415), in 100% of the herds (16/16); Bacterial isolation and its identification by PCR *IS900* were founded in five of the nine cases (5/9) corresponding to 31.25% of the herds (5/16). Confirming the presence of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*, and a high frequency of seropositive animals to MAP in flocks of Aguascalientes.

Keywords: Paratuberculosis, sheep, seroprevalence, *Mycobacterium*.

INTRODUCCIÓN

La paratuberculosis (PTB) o Enfermedad de Johne (EJ), es una enfermedad crónica infecciosa que ocasiona una enteritis granulomatosa en los rumiantes y eventualmente otras especies, con una amplia distribución mundial; causada por el *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) (Coelho *et al.*, 2010). Clasificada por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) como una enfermedad transmisible, con impacto socioeconómico y en la salud pública, sugiriéndose la participación de MAP en la enfermedad de Crohn en humanos (OIE, 2017; Balseiro *et al.*, 2019; Gioffré *et al.*, 2015). Del MAP se han descrito tres diferentes cepas la tipo I (Sheep), la tipo II (Cattle) y la tipo III (Bisón o intermedia), de acuerdo a su preferencia por infectar diferentes especies de rumiantes y sus distintos requerimientos para su aislamiento bacteriano (Begg y Whittington, 2010; Windsor, 2015). La enfermedad se caracteriza por presentar signos de emaciación progresiva, edema submandibular y eventualmente la muerte de los animales. La principal vía de infección es la fecal-oral, con un periodo de incubación que oscila de uno a cuatro años, por lo que pueden llegar a observarse signos de la enfermedad a partir del año de vida (Chávez *et al.*, 2004), una vez que MAP ingresa al intestino se aloja en los macrófagos constituyendo una infección granulomatosa donde se pueden observar cantidades variables de bacterias (Begg y Whittington, 2010; Windsor, 2015). El diagnóstico, prevalencia e impacto de la enfermedad son escasos y no concluyentes tanto en América Latina como en México (Chávez *et al.*, 2004; Begg y Whittington, 2010; Fernández *et al.*, 2014).

En México, se ha detectado la presencia de PTB en ovinos en diversos estados del país, como son, San Luis Potosí, Guanajuato, Querétaro, Ciudad de México, Estado de México y Veracruz (Estévez *et al.*, 2006). Particularmente, en el Estado de Aguascalientes, la actividad de la ovinocultura como en otros estados del país ha crecido a partir de 1990 en más del 100%, con una producción cárnica de aproximadamente 612 toneladas en el 2018, siendo la zona Valle, conformado por los municipios de Aguascalientes, San Francisco de los Romo, Rincón de Romos, Jesús María, Pabellón de Arteaga y Asientos, en donde se concentra el 85% de la producción de carne ovina del Estado y de la actividad pecuaria en general (SIAP, 2018).

Es de suma importancia resaltar que en esta región no se cuenta con registros del diagnóstico e identificación de las enfermedades que son capaces de afectar a los rebaños ovinos y el efecto adverso que éstas pueden causar en la productividad. Pues en el Estado de Aguascalientes existen casos no cuantificados de animales adultos con emaciación progresiva y mortalidad, sin embargo, no se realiza un diagnóstico y es imposible determinar si esta la PTB.

Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo es identificar la presencia de MAP a través de estudios anatomopatológicos, cultivo y PCR en ovinos con cuadro clínico sugerente a PTB, así como determinar la seroprevalencia contra MAP mediante ELISA en rebaños ovinos del Valle de Aguascalientes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño del estudio

Este estudio de tipo descriptivo-transversal fue realizado en el Estado de Aguascalientes, México, siendo los rebaños y animales de estudio seleccionados de acuerdo con el método no probabilístico “por conveniencia” (Trusfield, 2018). De esta manera, fueron seleccionados 16 rebaños ovinos con poblaciones que oscilaron entre 60 y 340 individuos, conformando una población total de estudio de 2,415 animales (Figura 1 y Tabla 1), donde se requería que el rebaño contara con signos clínicos de emaciación progresiva crónica sugerente a PTB en al menos un ejemplar mayor a un año; considerando a cada rebaño como unidad experimental.

Toma de muestras

Suero sanguíneo. Se obtuvieron 5 mL de sangre por venopunción de la yugular, la cual fue captada en tubos sin aditivo para la obtención del suero; posteriormente las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su empleo en la prueba ELISA.

ELISA. Los sueros previamente obtenidos, se analizaron mediante la prueba de inmunoensayo enzimático indirecto (ELISA) empleando el antígeno protoplasmático PPA3 (Allied, Mo.), el cual presenta una especificidad del 75% y una sensibilidad del 64% de acuerdo con el protocolo empleado por [García \(1992\)](#).

Obtención de muestras para estudio histopatológico y aislamiento de MAP. Tomando como referencia a Timoney (1988) y observando el curso clínico de los animales y las características epidemiológicas de los 9 rebaños, se logró establecer un diagnóstico presuntivo en 9 animales; los cuales presentaron signos de emaciación progresiva, pelo o lana hirsuta, edema submandibular, lesiones y heces blandas. Entendiendo así, que el 56.25% de los rebaños de estudio, presentaron al menos un caso sugerente a PTB.

Posteriormente los 9 animales fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital sódico ([NOM-033-SAG/ZOO-2014](#)) de acuerdo a los lineamientos establecidos en el “Comité de ética para el uso de animales en la docencia e investigación de la Universidad Autónoma de Aguascalientes”.

La confirmación de estos casos se realizó por medio de necropsia e identificación de lesiones, descartando así la presencia de posibles lesiones sugerentes a diagnósticos diferenciales de pseudotuberculosis (*Corynebacterium pseudotuberculosis*), alteraciones digestivas por presencia de cuerpos extraños, neoplasias, neumonías crónicas y parasitosis severa, ([Straub, 2004](#); [Windsor, 2014](#)).

Posterior a ello, se tomaron muestras de secciones intestinales de íleon y yeyuno, las cuales mostraron engrosamiento de la mucosa intestinal que sugerían lesiones asociadas a paratuberculosis; estas secciones fueron fijadas en formalina amortiguada (pH 7.6) para su posterior procesamiento histológico, empleando las tinciones de Hematoxilina-Eosina (H-E) y de Ziehl-Neelsen (ZN), esta última con la finalidad de evidenciar la presencia de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) ([Estévez, 2006](#)). De igual manera, se obtuvieron

muestras para aislamiento bacteriano a partir de secciones de 30 cm de íleon y yeyuno que mostraban lesiones sugerentes de PTB (Chávez *et al.*, 2004; Dennis *et al.*, 2011), siendo depositadas en recipientes estériles de plástico para su conservación a -20°C hasta su procesamiento en el laboratorio.

Cultivo Bacteriano a partir de intestino. A su vez, a las muestras tomadas de intestino se les realizó un raspado de la mucosa intestinal con bisturí estéril, procesándolas para descontaminación y concentración de las micobacterias, de acuerdo con la metodología descrita por Sánchez y Guerrero, 2006. Posteriormente, del material de la interfase obtenida, fue inoculado en los medios de cultivo de Löwentin-Jensen (L-Jm) con micobactina, colocando tres a ocho gotas de cada una de las muestras, distribuyéndose en toda la superficie del medio. De cada muestra, se inocularon en dos diferentes tubos con medio L-Jm, uno conteniendo micobactina y el segundo sin micobactina. Posteriormente fueron incubados a 37°C, manteniéndolos en posición inclinada y sin humedad. Se verificó el crecimiento bacteriano cada cuatro semanas hasta la semana doce, los medios donde no se observó crecimiento, continuaron en incubación hasta la semana 40 (De Juan *et al.*, 2006; Whittington, 2010).

PCR IS900. La identificación molecular se realizó a partir del crecimiento de las colonias de MAP, por medio de PCR punto final, empleando los iniciadores IS900P3N (5'-GGG TGT GGC GTT TTC CTT CG-3') e IS900P5N (5'-ATTCGCCGCCACCGCCACG-3') (Chávez *et al.*, 2004).

Estimación de la seroprevalencia. La prevalencia se estimó con base en la proporción de animales que resultaron positivos en la prueba de ELISA, con relación a la población total de animales adultos en cada uno de los rebaños. La información generada en el estudio se evaluó y contrastó mediante pruebas de Estadística Descriptiva, mediante "Análisis para una variable", con apoyo del paquete "Statgraphics Centurion XV"™ (Fernández *et al.*, 2002).

RESULTADOS

Seroprevalencia. El porcentaje de seroprevalencia promedio de los 16 rebaños, fue de 51.3%, con un valor mínimo de 4.8% y un valor máximo de 91.33% con un intervalo de confianza al 95.0% para la media de: [32.7173, 62.3415]. Los resultados de seroprevalencia individual para cada uno de rebaños se describen la Tabla 1. En los dieciséis rebaños en los que se realizaron las pruebas de ELISA (PPA-3), se identificaron casos positivos, obteniéndose una seroprevalencia calculada a "nivel de rebaño" del 100% (Tabla 1).

Estudio anatomopatológico. En los 9 animales a los que se les realizó la necropsia, presentaron emaciación, lana o pelo hirsutos, edema submandibular (Figura 1), presencia de ascitis, degeneración de la grasa, así como engrosamiento aparente de la mucosa intestinal a nivel de íleon y yeyuno (Figura 2), además de aumento de tamaño de linfonodos mesentéricos y fusión de éstos, no encontrándose evidencia de alteraciones o lesiones sugerentes a otra etiología diferencial a las caudas por PTB. A través del estudio histopatológico, se logró observar en 8 de los 9 animales estudiados (88.8%), la presencia de enteritis, linfadenitis granulomatosas con presencia de macrófagos, células gigantes y presencia de incontables Bacterias Acido-Alcohol Resistentes (BAAR) mediante la tinción de Ziehl-Neelsen (ZN). Determinándose como lesiones de tipo multibacilar (Figura 3). Mientras que en 1 de los 9 animales estudiados (11.2%) se observó la presencia de lesiones granulomatosas de tipo multifocal con escasa cantidad de bacilos (BAAR) en el interior de macrófagos, coincidente con una lesión tipo paucibacilar.

Tabla 1. Resultados de seroprevalencia (ELISA) a paratuberculosis, necropsias realizada y resultado de aislamiento bacteriano, por rebaño en el Valle de Aguascalientes

Número de rebaño	Seroprevalencia %	Resultados positivos ELISA-PPA-3	Animales mayores de 1 año	Ejemplares con signos clínicos sugerentes a PTB/Necropsia realizada	Aislamiento Bacteriano y PCR positivo	Ubicación por municipio
14	91.3	168	184	+1	-	Rincón de Romos
6	84.4	287	340	+1	+	Aguascalientes (sur)
3	76.3	122	160	+0	Nr	Rincón de Romos
11	73.1	117	160	+1	+	Asientos
10	64.4	125	194	+1	-	Jesús María
9	61.4	72	140	+1	+	Asientos
4	58.6	99	169	+1	+	Aguascalientes (sur)
15	56.8	50	88	+1	-	San Francisco de los Romo C
13	54.5	36	66	+0	Nr	Pabellón de Arteaga
16	46.7	56	120	+0	Nr	Aguascalientes (centro)
1	43.8	35	80	+1	-	Jesús María
8	28.3	17	60	+0	Nr	Pabellón de Arteaga
5	12.9	8	62	+0	Nr	Aguascalientes (Nte)
7	9.5	31	326	+0	Nr	Aguascalientes (sur)
12	8.1	8	99	+0	Nr	San Francisco de los Romo
2	4.8	8	167	+1	+	San Francisco de Los Romo
16	51.3	1239	2415	16/9		TOTAL

Nr: No se realizó



Figura 1. Borrega con signos de emaciación y edema submandibular sugestivos de PTB

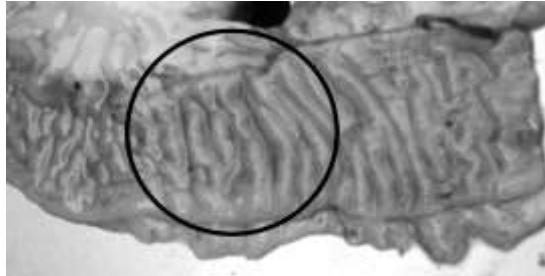


Figura 2. Lesiones macroscópicas correspondientes a engrosamiento intestinal característica de enteritis granulomatosa

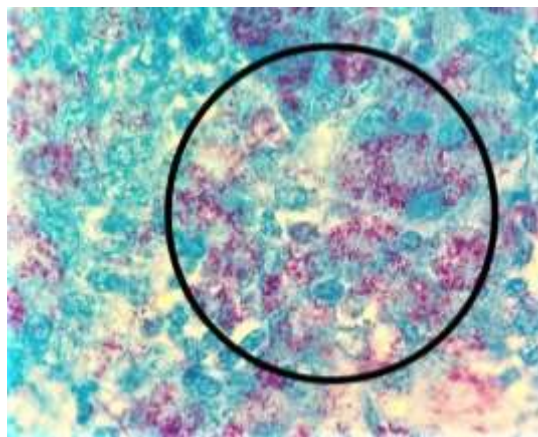


Figura 3. Lesiones Histopatológicas de ID de tipo multibacilar, tinción de Ziehl-Neelsen 400X donde se observan múltiples BAAR en mucosa intestinal

Aislamiento bacteriano. Después de 12 semanas de incubación se observaron en 5 casos (55.5%), desarrollo de colonias de color amarillo, cremosas, convexas y de forma circular característicos de MAP en los medios L-Jm adicionados con micobactina. Mientras que en 4 de los casos (44.5%), no se observó desarrollo de colonias hasta la semana 40. Todos los medios que no fueron adicionados con micobactina, no presentaron crecimiento.

PCR IS900. A partir de los cinco aislamientos bacterianos obtenidos se obtuvieron productos de amplificación de la secuencia IS900 correspondiente a 310 pares de bases (pb), confirmándose así la presencia MAP a partir de estos aislamientos obtenidos (Figura 4).

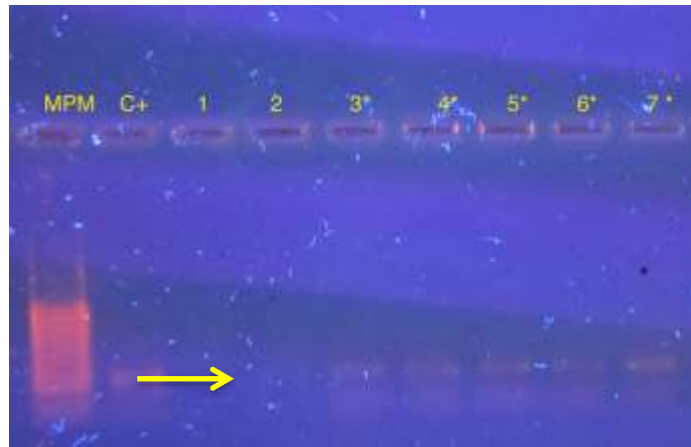


Figura 4. Fotografía de gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Donde se observan productos de amplificación con un tamaño de 310 pb, a partir de ADN de colonias bacterianas obtenidas de tejido intestinal, donde se observa en el carril MPM el marcador de peso molecular 100 pb, C+ control positivo, carril 1 control negativo (agua), carriles 3 a 7 producto de amplificación obtenidos de los aislamientos 03, 04, 05, 06 y 09, que corresponden a un fragmento de inserción IS900 de MAP (*).

Es así como en el 100% de la muestra (16 rebaños de estudio) se obtuvo seropositividad a MAP; a su vez en el 31.25% de la muestra (5 rebaños) se confirmó la presencia de MAP por aislamiento bacteriano e identificación por PCR IS900 a partir de los animales que presentaron cuadro clínico al momento del estudio (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados obtenidos “Por rebaño” correspondientes a los diferentes métodos de diagnóstico e identificación empleados

Seropositividad a MAP	Animales con signos y lesiones a la necropsia sugerentes a PTB	Aislamiento Bacteriano a partir de lesiones en Intestino delgado y PCR IS900 positivo.
16/16	9/16	5/16
100%	56.25%	31.25%

DISCUSIÓN

La seroprevalencia media obtenida en el presente estudio (51.3%) reporta ser elevada, en comparación a otros estudios realizados de medición de prevalencia tanto en el país como a nivel mundial, considerando que la enfermedad internacionalmente presenta una elevada prevalencia en diferentes especies de rumiantes, con un 20% y hasta un 40% (Whittington *et al.*, 2019). En México, diversos estudios indican evidencias serológicas ante MAP como los reportados por Jaimes *et al.*, (2008) en San Luis Potosí, México; donde los resultados de seroprevalencia en ovinos por el método de inmunodifusión en Agar-gel fue de un 44%. Mientras que en el estado Nayarit se reportó un 28.94% en ovinos, a través de pruebas de ELISA (Mejía *et al.*, 2015). En Latinoamérica, escasos trabajos realizados en ovinos muestran una amplia variabilidad en la prevalencia a MAP, donde se reportan prevalencias desde un 4.3% promedio en ovinos (Fernández *et al.*, 2014), hasta un 54.08 % de seroprevalencias a MAP en ovinos en Brasil, (Medeiros *et al.*, 2012).

Ante los escasos estudios, y una amplia variación en cuanto a la metodología y la prueba diagnóstica empleada para la evaluación de la prevalencia a la PTB, Espechit *et al.* (2017) y Whittington *et al.*, (2019) señalan que esto resulta en una gran variabilidad de los resultados, y por consecuencia, una desestimación de la presencia e impacto verdadero de la paratuberculosis.

A pesar de los resultados obtenidos de una elevada frecuencia, al momento del estudio sólo se encontraron casos clínicos (9/16) en el 56.25% de los rebaños estudiados, donde la totalidad de ellos muestran lesiones histopatológicas multibacilares o paucibacilares, características de la enfermedad, en donde si se considera que éstas se presentan en individuos mayores a un año de edad, con un tiempo prolongado de infección aunadas a la presentación de un cuadro clínico característico, altamente sugerente a PTB, se pueden llegar a considerar un diagnóstico definitivo de MAP en lo individual, difícilmente descartado por otras pruebas como cultivo y PCR como lo mencionan varios autores (Pérez *et al.*, 1999; Dennis *et al.*, 2011; Windsor, 2015; Whittington *et al.*, 2019).

Considerando que los nueve animales a los que se les realizó la necropsia presentaron lesiones características a PTB, sólo en el 55.5% (5/9) se logró el aislamiento bacteriano a pesar de presentar lesiones de tipo multibacilar en ocho de los nueve. La dificultad del aislamiento de MAP, el medio de cultivo empleado considerando la posible variación del tipo de MAP presente, "S" o "C", los que presentan una diferencia de requerimientos nutricionales para su crecimiento (Elguezabal *et al.*, 2011; Whittington, 2011; Stevenson, 2015; Whittington *et al.*, 2019), o al momento del proceso de la descontaminación bacteriana, donde se puede reducir el número de bacterias viables para su cultivo y aislamiento. El aislamiento y cultivo del microorganismo en ovinos es extremadamente difícil, siendo en rebaños ovinos que el cultivo fecal detecta menos de los casos clínicos y requiere más de 12 meses para su incubación según reportan Windsor (2015), así como Whittington, 2010.

La posterior confirmación e identificación de los aislamientos obtenidos de MAP por medio de PCR IS900, realizada a partir de los cinco cultivos obtenidos, confirmó la

presencia de MAP. Algunos autores en la actualidad sugieren que la identificación de la bacteria por PCR sea realizada a partir de las muestras obtenidas de los tejidos, agilizando el tiempo de los resultados, sin depender directamente de los cultivos obtenidos, ya que los tiempos de diagnóstico se prolongan por las características propias del aislamiento de MAP, indicando que esta prueba presenta una similar eficacia con los cultivos (Kawaji *et al.*, 2007; Nilsen *et al.*, 2008; Whittington *et al.*, 2019).

De acuerdo con autores como Kumthekar, *et al.*, (2013) y Konbon (2018) el determinar el grado de infección de la enfermedad en los rebaños, permite establecer programas de control adecuados que impacten significativamente en el costo – beneficio; considerando principalmente la prueba – desecho. Pues ante la inviabilidad de desechar y considerando la poca disponibilidad de algunos productores para la vacunación de los rebaños, las medidas de control deben enmarcarse hacia un fortalecimiento de la bioseguridad.

Considerando así la separación temprana de los corderos y la eliminación de animales con signología inicial clínica de la enfermedad, puede ser una medida que impacte positivamente a la reducción de la prevalencia de la enfermedad (Robee, 2011; Windsor 2015). Haciendo hincapié en que profesionistas del sector salud animal y líderes del sector productivo tengan un conocimiento claro del grado de presencia e impacto de la enfermedad, tanto clínica, económicamente y de salud pública; logrando así propuestas de control (Roche, 2015; Windsor, 2015; Wittington *et al.*, 2019)

CONCLUSIÓN

Se confirma la presencia del *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* como agente etiológico de la enfermedad clínica, además de observar la presencia elevada de frecuencia de animales seropositivos a MAP, en rebaños del Valle Central del estado de Aguascalientes, México. Lo cual la convierte en una patología de alto impacto en la producción ovina del estado.

LITERATURA CITADA

BALSEIRO A, Perez V, Juste R. 2019. Chronic regional intestinal inflammatory disease: A trans-species slow infection. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 62:68-100. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2018.12.001>

BEGG D, Whintington R. 2010. *Paratuberculosis in Sheep*. In: *Paratuberculosis, Organism, Disease, Control*. United Kingdom. CAB International. Pp.157-168. <http://doi.org/10.1079/9781845936136.0157>

CHÁVEZ G, Trigo TF, Svastova P, Pavlik P. 2004. Identificación del polimorfismo genético de aislamientos de *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* de caprinos del centro de México. *Veterinaria México*. 35:75-84. <https://www.redalyc.org/pdf/423/42335107.pdf>

COELHO AC, Pinto ML, Coelho AM, Aires A, Rodríguez J. 2010. A seroepidemiological survey of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in sheep from North of Portugal. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 30(11):903-908.

<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2010001100001>

DENNIS M, Reddacliff LA, Whittington RJ. 2011. Longitudinal study of clinicopathological features of Johne`s diseases in sheep naturally exposed to *Mycobacterium avium* subs *paratuberculosis*. *Veterinary. Pathology*. 48:565-575.

<http://dx.doi.org/10.1177/0300985810375049>

DE JUAN L, Álvarez J, Romero B, Bezos J, Castellanos E, Aranaz A, Mateos A, Domínguez L. 2006. Comparison of four different culture media for isolation and growth of type II and type I/III *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains isolated from cattle and goats. *Applied and Environmental Microbiology*. 72:5927-5932.

<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00451-06>

ELGUEZABAL N, Bastida F, Sevilla IA, González N, Molina E, Garrido JM, Juste RA. 2011. Estimation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Growth Parameters: Strain Characterization and Comparison of Methods. *Applied and Environmental Microbiology*. 77: 8615-8624.

<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.05818-11>

ESPESCHIT IF, Schwarz GG, Faria CS, Souza CC, Paolicchi FA, Juste RA, Carvalho IA, Moreira AS. 2017. Paratuberculosis in Latin America: a systematic review. *Tropical Animal Health and Production*. 49:1557-1576. <http://dx.doi.org/10.1007/s11250-017-1385-6>

ESTÉVEZ DI, Hernández CR, Trujillo AM, Chávez GG. 2006. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in goat and sheep flocks in México. *Small Ruminant Research*. 72:209-213. <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.10.017>

FERNANDEZ SJ, Correa NM, Fernando RN. 2014. Systematic review of the prevalence of Paratuberculosis in cattle, sheep, and goats in Latin America and the Caribbean. *Tropical Animal Health and Production*. 46:1321-1340. <http://dx.doi.org/10.1007/s11250-014-0656-8>

FERNANDEZ SF, Sánchez JM, Córdoba A, Largo AC. 2002. *Estadística descriptiva*. 2^{da} ed. Madrid, España: Editorial Esic. Pp. 566. ISBN: 978-847-35630-62

GARCÍA MJ, Chávez G, Adúriz JJ, Pérez V, Juste RA, Badiola JJ. 1992. Prevalence of paratuberculosis in infected goat flocks and comparison of different methods of diagnosis. Proc. III Int. Coll. PTBC. 157-163. <http://www.paratuberculosis.net/publications.php>

GIOFFRÉ A, Correa MM, Alvarado PM, Vaca R, Morsella C, Fiorentino MA, Romano MI. 2015. Tipificación molecular de *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis mediante análisis de repetición en tándem de número variable de múltiples locus. *Revista Brasileña de Microbiología*. 46:2: 557-564. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246220140283>

JAIMES NG, Santillán FM, Hernández CO, Córdova LD, Guzmán RC, Arellano RB, Díaz AE, Tenorio GV, Cuéllar OA. 2008. Detección de *Mycobacterium avium* subespecie paratuberculosis, por medio de PCR-anidada a partir de muestras de heces de ovinos. *Revista Veterinaria México*. 39(4): 377–386. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=42339402>

KAWAJI S, Taylor DL, Mori Y, Whittington RJ. 2007. Detection of *Mycobacterium Avium* Subsp. *paratuberculosis* in ovine faeces by direct quantitative PCR has similar or greater sensitivity compared to radiometric culture. *Veterinary Microbiology*. 125:36-48. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.05.002>

KONBOON M, Bani YM, Pithua PO, Rhee N, Aly SS. 2018. A nested compartmental model to assess the efficacy of paratuberculosis control measures on US dairy farms. *PLoS One*. 13:10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203190>

KUMTHEKAR S, Manning EJ, Ghosh P, Tiwari K., Sharma RN, Hariharan H. 2013. *Mycobacterium avium* subespecie paratuberculosis confirmada tras la vigilancia serológica de pequeños rumiantes en Granada, West Indies. *Revista de investigación de diagnóstico veterinario*. 25(4): 527-530. <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1040638713490688>

MEDEIROS JM, Garino JF, Torres MR, de Medeiros CV, Riet CF. 2012. Frequência de anticorpos para paratuberculose em bovinos no semiarido paraibano. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 32:697-700. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2012000800003>

MEJÍA MK, Lemus FC, González MC, Palomares RG, Díaz AE, Gutierréz HJ. 2015. Factores de riesgo asociados a *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* en rebaños ovinos de Nayarit, México. *Revista Científica FCV-LUZ*. 5:294-302. <https://www.redalyc.org/pdf/959/95953315005.pdf>

NIELSEN SS, Toft N. 2008. Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: A review of accuracies of ELISA, interferon-gamma assay and fecal culture techniques. *Veterinary Microbiology*. 129:217-235. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.12.011>

NOM-033-SAG/ZOO-2014. *Norma Oficial Mexicana: Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres*. México. Diario Oficial de la Federación, 26/08/2014. https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5405210&fecha=26/08/2015

OIE (World Organisation for Animal Health). 2017. Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals Vol I. Recuperado en noviembre de 2017. <http://www.oie.int/es/normas-internacionales/manual-terrestre/acceso-en-linea/>

PÉREZ V, Tellechea J, Corpa JM, Gutiérrez M, García MJ. 1999. Relation between pathologic findings and cellular immune responses in sheep with naturally acquired Paratuberculosis. *American Journal of Veterinary Research*. 60:123-127. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9918160/>

ROCHE S, Jones BA, Meehan M, Massow M, Kelton D. 2015. Evaluating the effect of focus farms on Ontario dairy producers' knowledge, attitudes, and behaviour toward control of Johne's disease. *J Dairy Sci*. 98:5222–040. <https://doi:10.3168/jds.2014-8765>

ROBBE AS. 2011. Control of Paratuberculosis in Small Ruminants. *Vet Clin Food Anim*. 27:609–620. <https://doi:10.1016/j.cvfa.2011.07.007>

SÁNCHEZ CC, Guerrero GC. 2006. *Procedimientos en microbiología clínica*. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. ISBN: 84-609-2287-1. <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia1.pdf>

SIAP (Servicio De Información Agroalimentaria Del Gobierno De México). 2018. Estadísticas de la producción pecuaria 2018. Recuperado en septiembre de 2018. <http://infosiap.siap.gob.mx/gobmx/datosAbiertos.php>

STEVENSON K. 2015. Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis and the influence of strain type on infection and pathogenesis: a review. *Veterinary Research*. 46:64. <http://dx.doi.org/10.1186/s13567-015-0203-2>

STRAUB OC. 2004. Maedi–Visna virus infection in sheep. History and present knowledge. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 27:1-5. [https://doi.org/10.1016/S0147-9571\(02\)00078-4](https://doi.org/10.1016/S0147-9571(02)00078-4)

TIMONEY JF, Gillespie JH, Scott FW, Barlough JE. 1988. *Hagan and Bruner's Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals*. Ithaca, United States: Cornell University Press. Pp. 912. ISBN: 9780-801-41896-9.

TRUSFIELD M. 2018. *Veterinary Epidemiology*. 4^{ta} ed. UK: Blackwell publishing. Pp. 888. ISBN: 978-1-118-28028-7.

WHITTINGTON RJ. 2010. *Cultivation of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*. 2^{da} ed. Wallingford, UK. Editorial Cabi. Pp. 266-304. ISBN: 978-1-789-24341-3.

WHITTINGTON RJ, Marsh IB, Saunders V, Grant IR, Juste R, Sevilla IA, Manning EJ, Whitlock RH. 2011. Culture phenotypes of genomically and geographically diverse *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from different hosts. *Journal of Clinic Microbiology*. 49:1822-1830. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00210-11>

WHITTINGTON RJ, Donat K, Weber MF. 2019. *Control of paratuberculosis: who, why and how. A review of 48 countries*. *BMC Veterinary Research*. 15:198. <http://dx.doi.org/10.1186/s12917-019-1943-4>

WINDSOR PA. 2014. Managing control programs for ovine caseous lymphadenitis and paratuberculosis in Australia, and the need for persistent vaccination. *Veterinary Medicine: Research and Reports*. 5:11–22. <https://doi.org/10.2147/VMRR.S44814>

WINDSOR PA. 2015. Paratuberculosis in sheep and goats. *Veterinary Microbiology*. 181:161-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.07.019>