

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
VICERECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL
“DETECCIÓN DE *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* EN
MUESTRAS CLÍNICAS Y AMBIENTALES EN FINCAS LECHERAS DE LA
PROVINCIA DE CHIRIQUÍ A TRAVÉS DE CULTIVO Y PCR EN TIEMPO REAL”

POR

ING. DAYAN AUGUSTO PALACIO RODRÍGUEZ

ASESOR: AMADOR GOODRIDGE, PhD

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE MAESTRÍA EN
MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL

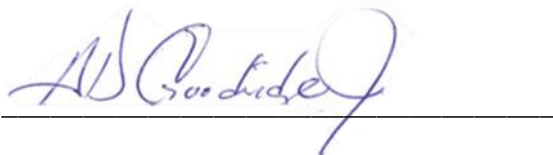
REPÚBLICA DE PANAMÁ, 2024

AMADOR GOODRIDGE, Investigador del Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta tecnología de Panamá (INDICASAT-AIP) y profesor adjunto de la Universidad de Panamá.

CERTIFICA QUE: DAYAN AUGUSTO PALACIO RODRÍGUEZ

Ha realizado bajo su asesoría el trabajo de investigación correspondiente a Tesis de maestría con el título: DETECCIÓN DE *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* EN MUESTRAS CLÍNICAS Y AMBIENTALES EN FINCAS LECHERAS DE LA PROVINCIA DE CHIRIQUÍ A TRAVÉS DE CULTIVO Y PCR EN TIEMPO REAL.

Revisado este trabajo, autoriza su presentación para ser juzgada por las autoridades pertinentes.



Amador Goodridge, PhD

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de tesis a toda mi familia, especialmente a mis padres Mgtr. Diana R. Rodríguez y Prof. Martín Palacio. A mis hermanos Pedro A. Palacio y Arianis A. Palacio, quienes me brindaron apoyo incondicional a lo largo de este arduo camino.

A mis amigos y seres queridos, gracias por su paciencia, comprensión y motivación durante este período.

Estoy orgulloso de compartir este logro con quienes me han apoyado de diversas maneras a lo largo de este viaje. Gracias por ser parte de este hito tan importante en mi vida.

AGRADECIMIENTO

Primero, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a Dios por darme la fortaleza para no rendirme y seguir adelante en este desafiante camino. Su guía y apoyo me han permitido superar obstáculos y alcanzar metas que parecían inalcanzables.

A la Universidad de Panamá, mi gratitud por brindarme la oportunidad de formarme y desarrollarme profesionalmente en un entorno académico de excelencia. Agradezco especialmente a SENACYT por su respaldo financiero y a INDICASAT-AIP por su apoyo en mi investigación. Sin estos recursos, este trabajo no habría sido posible.

Agradezco al Dr. Amador Goodridge por su valiosa dirección y mentoría durante este trabajo. Al Dr. Fermín Acosta, sus conocimientos y consejos han sido fundamentales para mi crecimiento académico y personal.

Finalmente, quiero agradecer a todos mis compañeros de clase, de laboratorio y de campo del equipo de biomarcadores de tuberculosis. Su compañerismo y dedicación han sido una fuente constante de inspiración y motivación. Aprecio profundamente su trabajo en equipo y su disposición para ayudarme en todo momento.

Agradezco también a los productores de la provincia de Chiriquí, por su buena disposición al atender el llamado a participar de este estudio. Sin su colaboración este trabajo no hubiese sido posible

Este trabajo es el resultado de la colaboración y el esfuerzo conjunto de muchas personas. Gracias a todos por hacer posible este logro.

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	1
1.1 Introducción.....	2
1.2 Objetivos.....	5
1.2.1 General:.....	5
1.2.2 Específicos.....	5
1.3 Hipótesis de trabajo.....	5
1.4 Justificación.....	6
1.5 Planteamiento del problema.....	6
CAPÍTULO 2: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	8
2.1 Características de la bacteria <i>Mycobacterium avium</i> subsp <i>paratuberculosis</i> (MAP).....	9
2.1.1 Morfología y estructura.....	11
2.2 Transmisión de MAP.....	11
2.2.1 Transmisión oro-fecal.....	13
2.2.3 Transmisión congénita.....	14
2.2.4 Transmisión por lactancia.....	15
2.3 Proceso de infección por MAP y enfermedad.....	15
2.4 Signos clínicos.....	16
2.5 Diagnóstico.....	18
2.5.1 Diagnóstico clínico.....	18
2.5.2 Diagnóstico de laboratorio.....	18
2.6 MAP en el ambiente.....	23
2.7 Implicaciones de MAP en salud pública.....	24
2.8 Impacto económico de la infección con MAP.....	25
2.9 Manejo y control de la paratuberculosis.....	27
2.10 Cuestionarios epidemiológicos y evaluación de prácticas de manejo.....	29
2.11 Estado actual de la ganadería y producción de leche en panamá.....	30
CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA.....	31
3.1 Estandarización y evaluación del cultivo en medio líquido de <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	32
3.2 Evaluación de medio de cultivo sólidos para el crecimiento de <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	32
3.3 Análisis de muestras clínicas y ambientales.....	33
3.4 Área de estudio.....	33
3.5 Cuestionario de evaluación de riesgos.....	34
3.6 Muestras.....	36
3.7 Recolección de muestras fecales.....	36

3.8	Recolección y transporte de muestras de agua	37
3.9	Recolección y transporte de muestras de suelo.....	37
3.10	Análisis de muestras	37
3.10.1	Descontaminación de muestras de heces y suelo para cultivo bacteriano	37
3.10.2	Siembra en medios de cultivo y tiempo de incubación.....	38
3.10.3	Tinción ZN en frotis de muestras directas y de cultivo	39
3.10.4	Extracción de ADN de muestras fecales para PCR	40
3.10.5	Procesamiento de muestras de agua para PCR y cultivo	41
3.10.6	Identificación de crecimiento de MAP en medio de cultivo líquido M7H9C.....	42
3.10.7	Preparación de muestra de cultivo líquido para extracción de ADN y PCR.....	42
3.10.8	Identificación de MAP en medios de cultivo sólidos.....	43
3.10.9	Reacción en cadena de la polimerasa para detección de MAP	43
3.11	Análisis de datos	45
CAPÍTULO 4: RESULTADOS		46
4.1	Estandarización y evaluación del cultivo en medios líquido de <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	47
4.2	Extracción de ADN de <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> a partir de medio líquido M7H9C.....	48
4.3	Evaluación de medio de cultivo sólidos para el crecimiento de <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	49
4.4	Fincas ganaderas evaluadas en el estudio	49
4.5	Resultados de tinción ZN directo de muestras clínicas y ambientales	50
4.6	Cultivo de <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	52
4.7	Cultivo de MAP a partir de muestras de heces.....	54
4.8	Detección de MAP por PCR directo en muestras de heces	57
4.9	Comparación del desempeño de cultivo líquido y PCR directo para la detección de MAP a nivel de finca.....	60
4.10	Comparación del desempeño de cultivo líquido de MAP y PCR directo aplicado a muestras de heces	61
4.11	Comparación del desempeño de cultivo líquido de MAP y resultados de ZN directo aplicado a muestras de heces.....	62
4.12	Comparación de resultados de cultivo líquido de MAP y conteo de BAAR en muestras directas de heces	63
4.13	Cultivo de MAP a partir de muestras de agua	64
4.14	Evaluación directa de muestras de agua por ZN y PCR para detección de MAP	65
4.15	Cultivo de MAP a partir de muestras de suelo.....	66
4.16	Desempeño de cebadores utilizados para la detección de MAP	68
4.17	Resultados de cuestionario.....	70
4.17.1	Prácticas de manejo en fincas con cultivo positivo	72

CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN	76
CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	84
Referencias bibliográficas.....	87

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales rutas de transmisión de MAP	13
Tabla 2. Ventajas y desventajas de los principales medios de cultivo utilizados para la detección de MAP.....	23
Tabla 3. Estimaciones de impacto económico asociado a la paratuberculosis bovina en distintos países.	26
Tabla 4. Preguntas incluidas en el cuestionario aplicado a productores.	35
Tabla 5. Composición por litro de medios de cultivo para el aislamiento de <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	39
Tabla 6. Materiales y reactivos utilizados para la extracción de ADN con el método CTAB.	41
Tabla 7. Cebadores utilizados para la detección molecular de <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	44
Tabla 8. Condiciones de reacción PCR en tiempo real utilizando el cebador IS900.	45
Tabla 9. Condiciones de reacción de PCR punto final con cebadores específicos de MAP.	45
Tabla 10. Detección de bacilos ácido-alcohol resistentes en muestras clínicas y ambientales según el tipo de muestra.	50
Tabla 11. Total de aislamientos de MAP por medio de cultivo.	52
Tabla 12. Características y resultado de cultivo de 23 fincas ganaderas en la provincia de Chiriquí evaluadas para la detección de <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	53
Tabla 13. Resultados de cultivo de MAP en medio líquido y sólido.....	54
Tabla 14. Comparación de resultados de ZN y PCR directo en muestras fecales de fincas con cultivo positivo y negativo.	59
Tabla 15. Análisis de la prueba de Kappa entre los resultados obtenidos por cultivo y PCR directo a nivel de finca (n=23).	60
Tabla 16. Análisis de la prueba de Kappa entre los resultados obtenidos por cultivo y PCR directo a nivel de animales (n=462).	61
Tabla 17. Análisis de la prueba de Kappa entre los resultados obtenidos por cultivo y PCR directo a nivel de animales (n=462).	62
Tabla 18. Evaluación de cultivo de muestras de agua para la detección de <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	64
Tabla 19. Resultados de análisis directo por ZN y PCR de muestras de agua para detección de MAP.	65
Tabla 20. Evaluación de cultivo de muestras de suelo para la detección de MAP.....	66
Tabla 21. Resultado de cultivo y PCR directo aplicado muestras de heces, suelo y agua para detección de MAP en 23 fincas ganaderas en la provincia de Chiriquí.	67
Tabla 22. Desempeño de cebadores específicos para la detección de MAP en 62 muestras de cultivo en medio líquido.	69
Tabla 23. Respuestas afirmativas a preguntas relacionadas con el manejo de las 23 fincas lecheras evaluadas en la provincia de Chiriquí.....	73
Tabla 24. Resultados de preguntas relacionadas al manejo de estiércol, movimiento de animales y personal dentro de las fincas.....	74
Tabla 25. Resultado de preguntas relacionadas a manifestaciones de la enfermedad.....	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de micobacterias en base a su tasa de crecimiento y Análisis filogenético intra – especie de <i>Mycobacterium avium</i>	10
Figura 2. Colonias de MAP en medio de cultivo de yema de huevo de Herrold después de 20 semanas de incubación (Kumar et al., 2019).	11
Figura 3. Lesiones macro y microscópicas causadas por infección por <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	17
Figura 4. Morfología de colonias MAP creciendo en medio Middlebrook 7H9. (A) Colonias MAP en medio 7H9 sin Tween 80. (B) Colonias MAP en medio 7H9 con Tween 80.	22
Figura 5. Interacción entre MAP, huésped y ambiente y medidas de intervención.	29
Figura 6. Fincas de producción de leche muestreadas y analizadas para la detección de <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	34
Figura 7. Curva de crecimiento de MAP en medio líquidos M7H9C y A7H9J.	47
Figura 8. Resultados de ensayos de extracción de ADN a partir de medio líquido M7H9C.	48
Figura 9. Curva de crecimiento de cepa MAP de referencia en medios de cultivo sólido.	49
Figura 10. Bacilos ácido-alcohol resistente observados en muestras fecales y ambientales.	51
Figura 11. Colonias pequeñas de aspecto liso y color crema aisladas en medio de cultivo sólido 7H9 -OP.	55
Figura 12. Porcentaje de fincas con cultivo positivo de MAP en muestras de heces.	56
Figura 13. Distribución geográfica de 23 fincas analizadas según resultados de cultivo de <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> en la provincia de Chiriquí.	56
Figura 14. Porcentaje de fincas positivas por PCR directo en muestras de heces.	57
Figura 15. Curva de amplificación por PCR en tiempo real de la secuencia de inserción IS900 (IS900 -qPCR) para detección de <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	58
Figura 16. Distribución geográfica de 23 fincas analizadas según resultados de PCR directo de muestras de heces para detección de <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> en la provincia de Chiriquí.	59
Figura 17. Comparación de la carga bacilar determinada por el conteo promedio de BAAR/campo.	63
Figura 18. Tamaño promedio del hato en fincas positivas y negativas por cultivo de <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	70
Figura 19. Media de la producción de leche (L/leche/día/vaca) en fincas positivas y negativas por cultivo de <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	71

ABREVIATURAS

MAP: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

NTM: Micobacterias no tuberculosas

MAC: Complejo *Mycobacterium avium*

EC: Enfermedad de Crohn

ZN: Ziehl Neelsen

BAAR: Bacilo ácido alcohol resistente

HPC: Cloruro de hexadecilpiridinio

CTAB: Bromuro de cetiltrimetil amonio

SDS: Dodecilsulfato sódico

ADC: Albúmina-Dextrosa-Catalasa-Cloruro de sodio, suplemento adicionado a los medios de cultivo para MAP

M7H9C: Middlebrook 7H9, formula de medio líquido para MAP

A7H9J: 7H9-ADC-Micobactina J, formula de medio líquido para MAP

HEYM-PS: Medio sólido Herrold con yema de huevo – piruvato de sodio

7H11: Medio Middlebrook 7H11

7H9-OP: Medio Middlebrook 7H9-optimizado

MJ: Micobactina J

IS900R: Cebador IS900 refinado

qPCR: PCR en tiempo real cuantitativo

TE: Tris EDTA

MIDA: Ministerio de Desarrollo Agropecuario

VPP: Valor predictivo positivo

VPN: Valor predictivo negativo

RESUMEN

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (MAP) es un patógeno intracelular facultativo y agente etiológico de la paratuberculosis bovina, una infección que afecta el tracto gastrointestinal de animales rumiantes domésticos y salvajes. El progreso de la infección con MAP lleva al desarrollo de un cuadro clínico denominado Enfermedad de Johne. Esta enfermedad se caracteriza por presentar diarrea intermitente a persistente y de curso crónico, deshidratación, emaciación progresiva y edema submandibular en estados avanzados. La contaminación ambiental con MAP ocurre debido a la presencia de animales infectados que liberan bacterias principalmente en heces. Se evaluó el desempeño de medios de cultivo líquidos y sólidos en el crecimiento de MAP. El medio de cultivo líquido M7H9C tuvo mejor desempeño ($p < 0.05$) que el medio A7H9J para el crecimiento de la cepa MAP de referencia. El medio de cultivo sólido 7H9-OP mostró mejor desempeño que los medios HEYM-PS y 7H11-M al permitir un crecimiento temprano (3 semanas) de la cepa MAP de referencia. MAP está presente en 3.1% (17 /546) de muestras evaluadas por cultivo (heces, suelo y agua). Del total de aislamientos confirmados el 82.4% (14/17) fue en muestras de heces, el 11.8% (2/17) fue en muestras de agua y el 5.9% (1/17) fue en muestra de suelo. La prueba de Chi-cuadrado determinó que transportar estiércol en vehículos compartidos estuvo asociado significativamente ($p = 0.02$) con el estado de infección con MAP de las fincas. En conjunto estos resultados brindan información importante sobre la detección por cultivo de MAP en muestras de heces y muestras ambientales como suelo y agua.

Palabras clave: MAP, cultivo bacteriano, M7H9C, IS900

ABSTRACT

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (MAP) is a facultative intracellular pathogen and etiologic agent of bovine paratuberculosis, an infection affecting the gastrointestinal tract of domestic and wild ruminants. The progression of infection with MAP leads to the development of a clinical picture called Johne's disease. This disease is characterized by intermittent to persistent and chronic diarrhea, dehydration, progressive emaciation and submandibular edema in advanced stages. Environmental contamination with MAP occurs due to the presence of infected animals that release bacteria mainly in feces. The performance of liquid and solid culture media on MAP growth was evaluated. Liquid culture medium M7H9C performed better ($p < 0.05$) than medium A7H9J for the growth of the reference MAP strain. The solid culture medium 7H9-OP showed better performance than HEYM-PS and 7H11-M media in allowing early growth (3 weeks) of the reference MAP strain. MAP is present in 3.1% (17 /546) of samples evaluated by culture (feces, soil and water). Of the total number of confirmed isolates 82.4% (14/17) were in stool samples, 11.8% (2/17) were in water samples and 5.9% (1/17) were in soil samples. The Chi-square test determined that transporting manure in shared vehicles was significantly associated ($p = 0.02$) with the MAP infection status of the farms. Taken together these results provide important information on the detection by culture of MAP in fecal samples and environmental samples such as soil and water. The evaluation of risk factors associated with paratuberculosis allows recommendations to be made to producers to reduce the risk of new infections with MAP.

Key words: MAP, bacteriological culture, M7H9C, IS900

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1 Introducción

La infección por *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP) provoca una enfermedad entérica granulomatosa crónica denominada enfermedad de Johne. El agente etiológico fue reconocido en 1895 por Johne y Frothingham. Las principales cepas de MAP hasta ahora identificadas son la cepa S de oveja y la cepa C de ganado bovino (D. M. Collins et al., 1990).

La bacteria MAP se clasifica como una bacteria ácido alcohol resistente, característica que le permite sobrevivir durante periodos prolongados de tiempo en el ambiente, llegando a sobrevivir hasta 55 semanas en un ambiente seco y completamente sombreado (Whittington et al., 2004). Los datos sobre la persistencia de MAP en el ambiente son importantes desde el punto de vista epidemiológico, cuando el objetivo es controlar la dispersión de la enfermedad (Sukhbir et al., 2006).

La principal vía de infección es la ruta oro-fecal y son los animales jóvenes los más susceptibles. Un animal se infecta a través del pastoreo y por la ingesta de heces de animales infectados que contienen MAP (Ly et al., 2019). La infección a través del pastoreo puede ocurrir ya sea por presencia de animales con infección activa que liberan MAP en el ambiente o por prácticas de fertilización con estiércol no madurado. Los animales son más susceptibles a infectarse en los primeros meses de vida, sin embargo, los síntomas no son evidentes hasta que alcanzan los 2 ó 3 años. Si la madre está infectada o el ambiente está muy contaminado, las crías pueden llegar a presentar síntomas dentro de los primeros 12-18 meses de edad (Coromoto et al., 2006). Existe también el riesgo de infección congénita del feto si la vaca está infectada y el riesgo se incrementa de acuerdo con el estado de infección de la vaca gestante (Whittington & Windsor, 2009).

Los animales infectados, con el tiempo excretan MAP de manera irregular siendo mayor la cantidad de bacterias en heces cuando hay presencia de signos clínicos (Eamens et al., 2007); esto aumenta la dificultad en su control y la eliminación de la bacteria del ambiente. Clínicamente la enfermedad se manifiesta con cuadros de diarrea y deshidratación que induce a un consumo de mayor cantidad de agua,

emaciación y finalmente la muerte. Algunos de los animales expuestos a MAP podrán eliminar la infección gracias a la respuesta de su sistema inmune, mientras que otros evolucionan hasta el establecimiento de la infección y avance en sus estadios clínicos (Sweeney, 2011).

Dentro de los objetivos que se plantean en los programas de control de la paratuberculosis están prevenir la introducción de la enfermedad y el propio control de la infección en los rebaños (Johnson-Ifeorlundu & Kaneene, 1998). Para el control de la enfermedad, inicialmente se ha enfocado los esfuerzos en la eliminación de los animales infectados, sin embargo, se debe tomar en cuenta el componente ambiental (Berghaus et al., 2006).

Para determinar la presencia de MAP en las fincas son varias las metodologías que se han desarrollado y han evolucionado en el tiempo para el aislamiento e identificación de la bacteria. Los métodos de diagnóstico más usados son el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) (Kudahl et al., 2008) que detecta la presencia de anticuerpos anti-MAP, el PCR en tiempo real (qPCR) y el cultivo bacteriológico (Wichert et al., 2021).

A pesar de que se ha reportado presencia de anticuerpos de paratuberculosis en Panamá, no se han implementado programas formales para su control. Para el mes de febrero de 2020, el boletín epidemiológico mensual del Ministerio de Desarrollo Agropecuario (MIDA) reportó 3 casos positivos en la provincia de Coclé. Para mayo del 2023 se reportó 2 casos positivos en la provincia de Veraguas (MIDA, 2023). Estos datos no reflejan la verdadera situación de la paratuberculosis en el país. El largo periodo de incubación y la presencia de casos asintomáticos o subclínicos deben tomarse en cuenta para un control y manejo eficiente de MAP.

La paratuberculosis es una de las enfermedades infecciosas más costosas y prevalentes en las explotaciones lecheras. Las pérdidas económicas causadas por la PTB en los rebaños de ganado lechero representan una carga significativa, pero a menudo no reconocida, tanto para los agricultores, como para la industria láctea (Hasanova & Pavlik., 2006). La prevalencia de la enfermedad en las fincas disminuye considerablemente la producción láctea causando pérdidas económicas

considerables a la industria láctea. Las pérdidas económicas Canadá por vaca/año se ha estimado en 40 dólares /vaca/ año (Tiwari et al., 2008).

En Panamá, anualmente se consumen unos 480 millones de litros de leche entre fluida y diversos productos lácteos nacional e importada, siendo la producción panameña de unos 180 millones de litros y el consumo per cápita está por 120 litros (MIDA, 2022). Debido a la gran demanda de producción de leche a nivel de país, es necesario dirigir los esfuerzos en el manejo y el control de las enfermedades patógenas como MAP, con la finalidad de fortalecer el rendimiento de los sistemas de producción y manejo de este.

El presente estudio se enfocará en determinar la presencia y distribución de MAP en fincas lecheras previamente identificadas en la provincia de Chiriquí a través de análisis de muestras fecales y ambientales y correlacionar los resultados con datos obtenidos de un cuestionario que busca evaluar las prácticas de manejo. En este estudio se evaluarán medios de cultivo líquidos basados en el caldo Middlebrook 7H9 incluyendo el medio M7H9C (Whittington et al., 2013) y medios de cultivo sólidos como el medio de cultivo sólido optimizado (Dane et al., 2022) para el aislamiento de MAP. La confirmación de MAP en muestras de heces y de cultivo se hará mediante PCR utilizando cebadores específicos. También el estudio validará el cuestionario que permitirá su implementación a nivel nacional, siendo así un apoyo clave para el desarrollo de un programa de control de paratuberculosis.

1.2 Objetivos

1.2.1 General:

- Evaluar la detección y el aislamiento de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* según las prácticas de manejo ganadero en fincas lecheras de la provincia de Chiriquí.

1.2.2 Específicos

- Medir el desempeño de medios de cultivo líquidos y sólidos para el aislamiento de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.
- Detectar *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en muestras de heces bovinas, suelo y agua utilizando cultivo líquido y sólido y PCR para detectar la secuencia de inserción IS900, F57, ISMAv-2 y Locus 255.
- Determinar la asociación entre las prácticas de manejo ganadero y la presencia de MAP en las fincas mediante un cuestionario de evaluación de riesgos.

1.3 Hipótesis de trabajo

1. La combinación de cultivo bacteriológico y posterior confirmación con PCR es eficiente para detectar la presencia de MAP en muestras fecales y ambientales.
2. El estado de infección con MAP presenta relación con las prácticas de manejo pecuario.

1.4 Justificación

La reducción significativa de la producción de leche es solo uno de todos los factores en que impacta negativamente la prevalencia de MAP en animales y fincas infectadas. El impacto económico negativo también se refleja en los costos de alimentación, costos de atención veterinaria en animales clínicamente afectados. También es considerable el costo relacionado al descarte de animales debido al bajo rendimiento como consecuencia de la infección con MAP.

El desconocimiento del estado de infección con *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis (MAP) en los animales de un hato y su permanencia prolongada en el mismo aumentan la prevalencia de la infección. Además, la permanencia de animales infectados representa un riesgo significativo de nuevas infecciones entre

1.5 Planteamiento del problema

La paratuberculosis causada por MAP es una infección ampliamente distribuida en los sistemas de producción de animales rumiantes y genera pérdidas económicas importantes relacionadas a la producción de leche, a los costos veterinarios y de sacrificio. La presencia de animales en estado asintomático son el principal problema, ya que, estos liberan bacterias MAP a través de las heces, contaminando el ambiente e infectando a otros animales.

La prevalencia de la paratuberculosis ha disminuido con éxito en países donde se han implementado programas de control. Estos programas de control requieren métodos diagnósticos que permitan la detección temprana de MAP en los animales y el ambiente de las fincas.

MAP puede ser liberado en las heces y en la leche de animales infectados. Es capaz de sobrevivir por largo tiempo en el ambiente y a procesos de pasteurización deficientes. Esto representa un riesgo para la cadena agroalimentario y por ende a la salud pública por su posible asociación con la enfermedad de Crohn en humanos. Aunque todavía no existe un consenso mundial que señale a MAP como el agente causal directo de esta enfermedad, es necesario reducir la exposición de las personas a este patógeno.

En Panamá se reportó en 2013 evidencia de exposición a MAP mediante ensayos de ELISA (Goodridge et al., 2013) y posteriormente en 2023 (MIDA 2023). Sin embargo, no se ha logrado el aislamiento y reporte de MAP. La información epidemiológica sistemática de la paratuberculosis. No se ha descrito factores de riesgo asociados a la enfermedad. Investigar el estado de infección con MAP mediante el aislamiento y cultivo, así como la influencia de las prácticas de manejo ganadero es la base para estudios de diagnóstico y la implementación de medidas de prevención efectivas.

CAPÍTULO 2: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características de la bacteria *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* (MAP)

La bacteria MAP pertenece al género *Mycobacterium* y es una de las subespecies clínicamente importantes dentro del complejo *Mycobacterium avium* (*Mycobacterium avium* Complex, MAC) (Kaczmarkowska et al., 2022). Son bacilos aerobios inmóviles y no esporulados con un alto contenido de lípidos en su pared celular (Meehan et al., 2021) lo que les provee su característica de ácido-alcohol resistencia (Steck et al., 1978). La pared celular de las micobacterias es un factor clave en su supervivencia ambiental (Lara, M, 2017). Su tamaño va desde 0.5 a 1.5 μm de longitud y 0.5 μm de ancho, siendo superior al de la mayoría de las micobacterias patógenas (Cocito et al., 1994). La secuenciación del genoma de la cepa K-10 de MAP describió 4.829.781 pares de bases con un contenido de G-C de 69.3% (Li et al., 2005).

Las micobacterias se pueden dividir en dos grupos principales: las de crecimiento rápido como *M. smegmatis*, *M. phlei*, *M. chelonae*, y *M. parafortuitum* y las de crecimiento lento como *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. gordonae* y *M. avium* (Madigan, Martinko, Bender, Buckley, & Stahl, 2015). MAP se clasifica como una bacteria de lento crecimiento (>7 días) (Bergey's, 2012) con un tiempo de generación de más de 20 horas (Lambrecht et al., 1988). El periodo de incubación necesario para su desarrollo y crecimiento *in vitro* varía según el medio de cultivo empleado. En medio sólido el periodo de incubación toma entre 12 a 20 semanas, mientras que en medio líquido oscila entre 6 a 12 semanas (Schwalm et al., 2019; Whittington et al., 2013). En comparación con otras micobacterias, MAP posee un truncamiento en el gen *mbtA*, relacionado con la producción de micobactina (Kruijf et al., 2017) molécula encargada de la captación y transporte de hierro férrico (Arnold et al., 2020; Viale et al., 2016.). Bioquímicamente, MAP es considerada como dependiente de micobactina (Wang et al., 2016) y es necesaria su adición a los medios de cultivo para el crecimiento de MAP. Para un crecimiento óptimo de MAP en cultivo se requiere 1.2 μM . En etapas de subcultivo, esta dependencia de micobactina se

pierde influenciado por el resultado de un arrastre a partir del medio primario (Lambrecht & Collins., 1992).

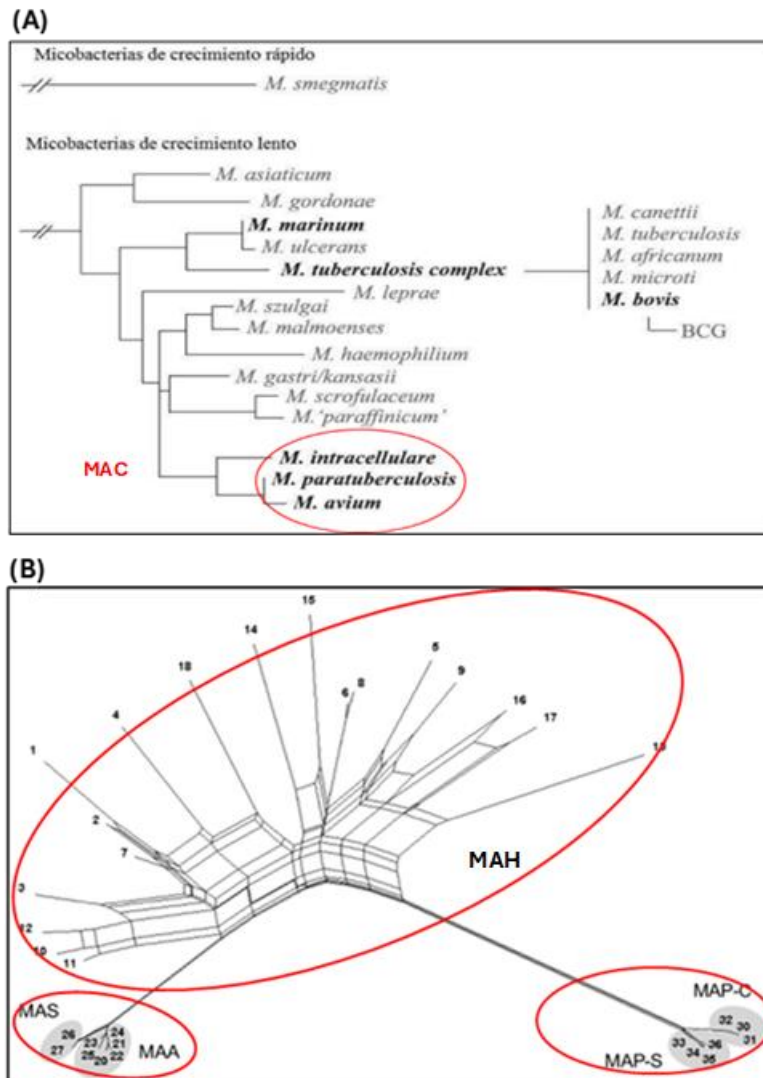


Figura 1. (A) Clasificación de micobacterias en base a su tasa de crecimiento. (B) Análisis filogenético intra – especie de *Mycobacterium avium*.

2.1.1 Morfología y estructura

Las MAP son bacilos rectos, inmóviles y ligeramente incurvados. MAP es una bacteria de crecimiento lento y solo se producen colonias visibles con un inóculo diluido tras días o semanas de incubación. Cuando crecen en medios sólidos, las micobacterias forman colonias duras y compactas, a menudo rugosas.

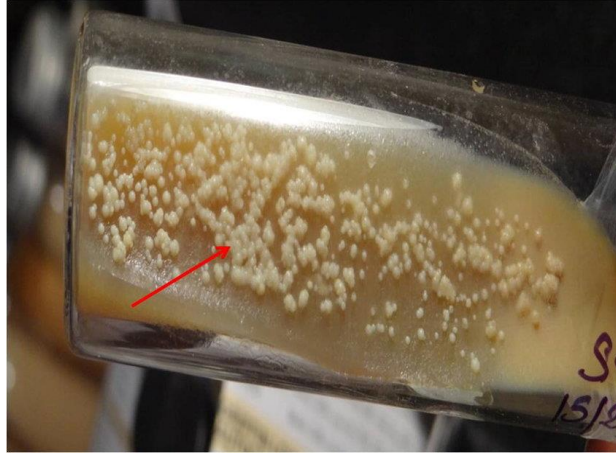


Figura 2. Colonias de MAP en medio de cultivo de yema de huevo de Herrold después de 20 semanas de incubación (Kumar et al., 2019).

La superficie rica en lípidos de las micobacterias limita la implementación de la tinción de Gram. La tinción ácido-alcohol resistente (Ziehl-Neelsen o su modificación Kinyoun) emplea el colorante rojo fucsina básica y fenol que permite teñir la pared celular y membranas de las bacterias e identificar bacilos ácido-alcohol resistentes pequeños a partir de frotis.

2.2 Transmisión de MAP

MAP tiene como reservorios principales a rumiantes, aunque también se ha logrado aislar de otras especies no rumiantes como conejos, gatos y zorros (Iowa State University, 2007). En las especies rumiantes MAP se transmite principalmente por ruta fecal-oral. Una vez ocurrida la infección, los animales comenzarán a liberar bacterias a través de las heces. El ganado bovino enfermo, expulsa bacterias con potencial infeccioso, creando focos de infección en matrices ambientales como el suelo y los afluentes de agua. Como es de esperarse, por estar clasificada como micobacteria ambiental, MAP ha desarrollado mecanismos de supervivencia en el

ambiente, siendo capaz de sobrevivir a condiciones adversas como baja disponibilidad de nutrientes y altas temperaturas, condiciones a las que pudiesen enfrentarse en zonas de escorrentía agrícola o aguas subterráneas (Whan, L y col, 2005). Se ha reportado la supervivencia de MAP en el agua después de 17 meses (Whan et al., 2005), por lo que, el agua debe considerarse como una posible ruta de transmisión del organismo, tanto a humanos como a animales. Los factores que reducen su viabilidad son: exposición a la luz solar, un pH mayor a 7.0 y un bajo contenido de hierro. Sin embargo, MAP es la micobacteria con mejor resistencia a los cambios físicos y químicos (Holzmann, Traversa, Schettino, Medina, & Bernadelli, 2004; Sevilla, 2007; Fernández B.; 2016).

Una nueva forma de estudiar la transmisión de MAP es a través de la tipificación de las cepas obtenidas de aislados *in vitro*. La bio-tipificación permite obtener datos epidemiológicos que ayudan a conocer los biotipos de MAP presentes en el área de estudio y cómo se encuentran distribuidos (Rónai et al., 2015). Estos estudios permiten identificar las fuentes de infección y los mecanismos de transmisión. La identificación de aislados de MAP se ha realizado mediante diversas técnicas moleculares como la electroforesis en gel del campo pulsado (PFGE) (Sevilla et al., 2007) y análisis de endonucleasa de restricción (PCR-REA) (Bhat et al., 2021). Además, es posible la combinación de técnicas como el análisis de unidades micobacteriales repetitivas intercaladas – número variable de repeticiones en tándem (MIRU-VNTR) y técnica de repeticiones de multilocus de secuencia corta (MLSSR) para el subtipado de MAP, con el fin de obtener una discriminación más robusta (N. Correa-Valencia et al., 2020) En América latina existe limitada información acerca de las cepas de MAP que circulan en los rebaños o fincas infectadas (Espeschit et al., 2017).

Tabla 1. Principales rutas de transmisión de MAP

Ruta de transmisión de Paratuberculosis	Tipo de contacto	Referencia
Ruta fecal - oral	Ternero-Adulto	(Eisenberg et al., 2012 ; Marcé et al., 2010)
Ingestión de leche contaminada con MAP	Ternero-Adulto Ternero-Ambiente	(Ellingson et al., 2005 ; Steuer et al., 2020)
Ingestión de calostro contaminado con MAP	Ternero-Adulto Ternero-Ambiente	(Ellingson et al., 2005 ; Steuer et al., 2021)
Otras posibles rutas de transmisión		
Ambiente (Agua, suelo, fomites)	Animal-entorno	(Ramovic et al., 2019 ; Whan et al., 2005)
Transmisión congénita	Feto-adulto	(Whittington y Windsor, 2009) (Ayele et al., 2004)

2.2.1 Transmisión oro-fecal

Actualmente se acepta la ruta oro-fecal como el principal modo de transmisión de MAP. Las bacterias MAP tienen preferencia por colonizar células específicas dentro del intestino delgado de rumiantes (Arsenault et al., 2014). El nivel de carga bacteriana en tejido intestinal se relaciona con la cantidad de MAP que pueda ser liberada y detectada a través de las heces (Mitchell et al., 2019). Con el avance del tiempo desde la infección es lógico pensar que la forma más eficiente en que la bacteria se propaga es a través de las heces. A pesar de que se considera que los principales diseminadores, hablando en términos de carga bacteriana, son los animales en etapas avanzadas de la enfermedad, animales más jóvenes también liberan cantidades importantes de bacteria al ambiente (sobre todo rebaños con alta prevalencia) (Weber et al., 2010). Esta vía de transmisión horizontal ocurre en la mayoría de los casos de animales adultos a animales jóvenes, principalmente los recién nacidos.

La transmisión fecal oral se ha descrito como el contacto directo de animales con heces contaminadas. Sin embargo, además de esta transmisión directa, existe un mecanismo indirecto en que las bacterias MAP liberadas a través de las heces pueden infectar a animales susceptibles. La supervivencia de MAP en el ambiente ha sido estudiada bajo distintas condiciones (Jorgensen, 1977) (Whittington et al., 2004). Esta capacidad de sobrevivir en el ambiente sumado a factores como el

movimiento de maquinarias y animales dentro de las fincas, promueve la formación de bioaerosoles, polvo suspendido en el aire que sirve como medio de transporte de las bacterias y promueve la transmisión de MAP dentro del entorno (Ramovic et al., 2019).

2.2.3 Transmisión congénita

Otras rutas de transmisión de MAP son la transmisión congénita y a través de la leche y el calostro. Aun cuando se ha demostrado su potencial como vía de transmisión a través de estas vías, en comparación con la ruta oro-fecal resulta ser de menor importancia (McAloon et al., 2019).

La paratuberculosis posee un componente sistémico que implica el riesgo de infección fetal (Whittington & Windsor, 2009). La transmisión congénita ocurre en casos avanzados donde es común que ocurra propagación extraintestinal de MAP desde el tracto gastrointestinal hasta otros órganos (Ayele et al., 2004). El aislamiento de MAP de porciones de plasma rico en células mononucleares (Koenig, G. J, 1993), al igual que otros hallazgos similares en tejido (Alonso-Hearn et al., 1993), sangre (Koenig et al., 1993) y leche (Ellingson et al., 2005) apoya el concepto que la infección fetal es causada por la migración extraintestinal de MAP.

La prevalencia de infección intrauterina varía según el estado de prueba de la madre y el estado clínico en que se encuentre. Existe transmisión intrauterina en vacas con resultados positivos por cultivo fecal y ELISA (Adaska, J. M., & Whitlock, R. H. (2012). El 9% y 39% de terneros nacidos de vacas con infección subclínica y clínica nacen infectados respectivamente, de acuerdo con un metanálisis realizado sobre la literatura para estimar la incidencia de infección intrauterina (Whittington & Windsor, (2009).

2.2.4 Transmisión por lactancia

El calostro, además de ser la primera fuente de nutrientes, que incluyen vitaminas, proteínas y grasa, es una sustancia rica en anticuerpos, y, por tanto, es comúnmente utilizado para la alimentación y aporte de inmunidad a los terneros recién nacidos. Por otro lado, además de las ventajas y beneficios que ofrece su utilización, en calostro y leche se ha reportado por diversos autores (Taylor, T, 1981; Streeter, R. N., 1995) la presencia de MAP, convirtiendo esta fuente de alimentación en una ruta importante de transmisión y su utilización incrementa el riesgo de infección.

Durante las primeras 24 horas después de nacer, la barrera intestinal de los terneros es permeable a macromoléculas como inmunoglobulinas mediante pinocitosis (Fischer AJ et al., 2019). Se sospecha que dicha permeabilidad favorece la infección de los terneros con MAP a través del calostro y la leche (Sweeney, 2011). La presencia de MAP en leche y calostro muestra un comportamiento similar al que ocurre con la liberación a través de las heces, aumentando a medida que progresa la enfermedad y con la aparición de signos clínicos (Sweeney, R y col, 1992).

2.3 Proceso de infección por MAP y enfermedad

MAP ingresa al huésped a través del contacto directo con heces contaminadas. Para que ocurra una infección y posterior desarrollo de enfermedad deben existir tres factores importantes: la presencia del patógeno, el huésped y condiciones ambientales que favorezcan el proceso infeccioso. La dosis infecciosa influye en el establecimiento de la infección y posterior colonización y progreso de la enfermedad (Marquetoux et al., 2018). Se ha descrito a las células M (Momotani, E y col, 1988) y a los enterocitos en modelo murino (Sangari FJ y col, 2001) como los principales tipos celulares involucrados en la entrada e invasión de MAP en el huésped.

Se ha reportado que dosis bajas de MAP entre 10^2 (Delgado et al., 2012) a 10^4 (Reddacliff & Whittington, 2003) UFC son suficientes para el establecimiento de la infección intestinal en ovejas. Una vez en el sistema, MAP se transloca a través del epitelio del intestino delgado (Phillips IL y col, 2021). MAP puede sobrevivir a la fagocitosis gracias al mecanismo de evasión de la respuesta inmune que inhibe la

maduración del fagosoma (Stabel, 2006). MAP también evade la respuesta inmune del hospedador por otras vías como

La enfermedad se caracteriza por ser de lento desarrollo debido al largo periodo de incubación. Dependiendo del estado inmunológico de los animales, el periodo de incubación puede variar desde 2 hasta 4 (Whittington & Sergeant, 2001). También se ha reportado que el periodo de incubación puede extenderse hasta 5 (Marce et al., 2010) y 7 años (Fecteau M. E., 2018) hasta la aparición de los signos y los síntomas.

El término enfermedad de Johne generalmente se refiere al síndrome clínico caracterizado por la presencia de diarrea y pérdida de peso, producto de una infección avanzada por MAP (Fecteau M. E, 2018). La colonización micobacteriana causa el engrosamiento de la pared intestinal provocando que la absorción de nutrientes esenciales a través del intestino sea deficiente (Merkal, 1984, Cicuta *et al.*,1995) siendo común la aparición de edema submandibular a causa de la hipoproteinemia (Sweeney et al., 2012).

2.4 Signos clínicos

Los signos clínicos producto de la infección con MAP generalmente no son visibles hasta pasados 2 a 5 años (Tiwari et al., 2006). Durante este tiempo los animales infectados podrán progresar y encontrarse en distintas fases, como silenciosa, subclínica, clínica y avanzada. El tiempo que tome el avance de una fase a otra depende de la edad al momento de la infección y de la carga bacteriana ingerida. (Whitlock & Buergelt, 1996). Tomando esto en cuenta, los signos clínicos de la enfermedad están asociados a la progresión y a los diferentes estadios de la enfermedad (Castellanos, 2010; The National Academies, 2003).

Durante la infección silenciosa y subclínica, los animales no desarrollan signos y síntomas evidentes que hagan sospechar la presencia de la enfermedad, aunque estos últimos pueden ser detectados con las pruebas diagnósticas adecuadas (Tiwari et al., 2005), tomando en cuenta la respuesta inmunológica y que liberan MAP en heces de manera intermitente (Merkal et al., 1966).

Generalmente la fase clínica comienza a evidenciarse por una disminución gradual de peso, sin que haya pérdida de apetito (Tiwari et al., 2006), cuadros de diarrea intermitente que no responde a medicación, así como, una disminución en la producción de leche, aumento del consumo de agua y mayor susceptibilidad a otras infecciones (Wu et al., 2007).

La afección que produce la infección de MAP en las células epiteliales del intestino delgado conduce a un síndrome de mala absorción de nutrientes, producto del engrosamiento de la mucosa intestinal del íleon, con múltiples levantamientos y depresiones que no desaparecen al estirar el tejido (Nicolás Ramírez et al., 2011). Esto se ve reflejado en estados avanzados cuando los animales presentan un edema submandibular producto de la hipoproteinemia (Sweeney, 2011)

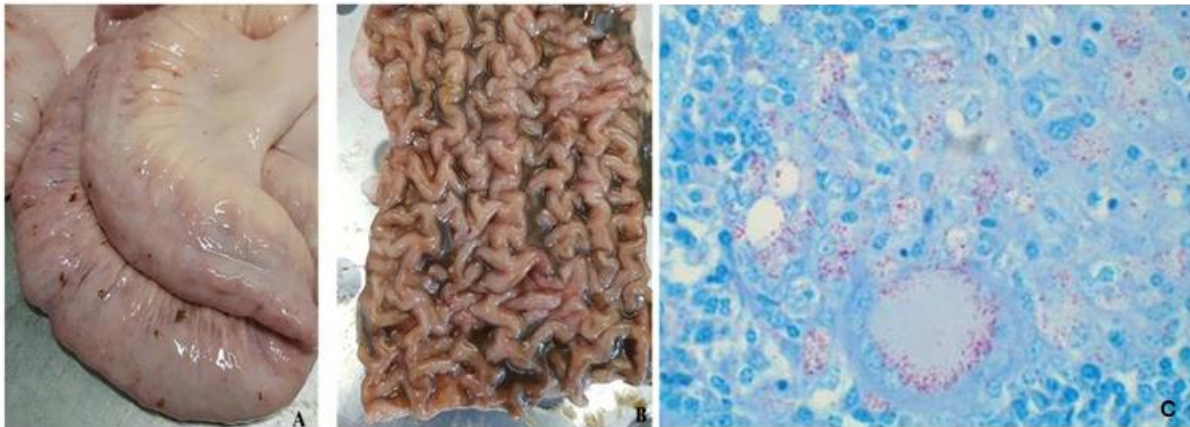


Figura 1. Lesiones macro y microscópicas causadas por infección por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. (A y B) Engrosamiento de la mucosa intestinal y aspecto cerebroide. (C) Lesiones microscópicas en el intestino delgado, con desarrollo de granulomas conteniendo numerosos bacilos (BAAR), (La Paratuberculosis Bovina. Diagnóstico y Control. Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario, n.d.)

2.5 Diagnóstico

El diagnóstico de infección con MAP es particularmente difícil a causa del lento progreso de la enfermedad. El diagnóstico puede ser directo e indirecto, detectando la presencia de MAP o la respuesta inmune del huésped respectivamente. Para el diagnóstico ante-mortem de la paratuberculosis el método indirecto más utilizado es el ELISA en suero o leche. Entre los métodos de detección directa están el PCR que detecta ADN de MAP y el cultivo bacteriano (Collins et al., 2006). Existe variación en la sensibilidad y especificidad de cada uno de los métodos debido al complejo progreso de la enfermedad. Para la elección de la prueba a utilizar se debe considerar el estadio en que se pueda encontrarse los animales.

2.5.1 Diagnóstico clínico

El diagnóstico clínico de la paratuberculosis analiza la presencia de signos y síntomas compatibles con la enfermedad como condición corporal, estado productivo y la presencia de diarrea intermitente o crónica. El análisis histopatológico antemortem se realiza con la toma de biopsias de intestino delgado y posterior procesamiento por métodos histológicos convencionales que incluye la fijación en formol al 10%, inclusión en parafina, se cortan en microtomo a 4 µm de espesor y coloración con hematoxilina-Eosina y Ziehl-Neelsen (SENASA, 2000).

2.5.2 Diagnóstico de laboratorio

2.5.2.1 Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

Los anticuerpos también llamados inmunoglobulinas son macromoléculas producidas por el sistema inmune de organismos superiores en respuesta a la entrada de agentes externos denominados antígenos. Existe una afinidad entre anticuerpos y antígenos que es altamente específica, propiedad que es aprovechada para el diagnóstico de enfermedades. Dentro de las técnicas de diagnósticos basadas en la detección de anticuerpos anti-MAP, la prueba de ELISA es la más sensible con valores reportados de 45% y especificidad de 99% (Collins and Sockett, 1993). Este ensayo inmunológico es la prueba que más aplicación tiene para la detección de la respuesta inmune humoral del ganado. Su sensibilidad

está relacionada con el estado de la enfermedad de los animales. Su eficacia disminuye al analizar muestras de animales en estado subclínico. Las pruebas de ELISA tienen alta sensibilidad, reportadas desde 75% (Whitlock et al., 2000) hasta 87% (Sweeney et al., 1995) en casos clínicos de paratuberculosis, cuando los animales se encuentran liberando gran cantidad de bacterias en heces. En comparación con otras pruebas, el ELISA resulta menos costosa, menos laboriosa y más rápida tomando de 2 a 3 días hasta la obtención de resultados (Colgrove et al., 1989).

2.5.2.2 PCR en tiempo real (qPCR)

La reacción en cadena de la polimerasa es actualmente el método directo que se utiliza con mayor frecuencia para la detección de material genético de MAP. La PCR en tiempo real permite obtener datos cuantificables de la carga bacteriana en las muestras a partir del análisis del ciclo umbral (Ct) (Sweeney et al., 2012). En comparación con otras técnicas de diagnóstico como el cultivo bacteriológico, la PCR permite la obtención de resultados en menos tiempo y con valores de sensibilidad y especificidad comparables al cultivo de muestras fecales (Alinovi et al., 2009; Pillai & Jayarao., 2002; Thirumalapura et al., 2021) y logra mayor sensibilidad en comparación con la técnica de ELISA (Clark et al., 2008).

La secuencia de inserción 900 (IS900) es comúnmente utilizada para la detección de MAP en muestras clínicas y ambientales por ser exclusivo de MAP (Tizard et al., 1992). IS900 presenta múltiples copias dentro del genoma de MAP (Vary et al., 1990), pudiendo variar el número de copias (15-20) según la cepa (Poupart et al., 1999). Estudios posteriores sobre IS900 permitieron desarrollar un nuevo par de cebadores con una especificidad mejorada basada en IS900 (Kawaji et al., 2007). Otras secuencias de inserción de copias múltiples dentro del genoma de MAP utilizadas para la detección de MAP son ISMap02 (Rani et al., 2018), IS1311 (Marsh et al., 1999), ISMav2 (Strommenger et al., 2001).

La secuencia F57 es de copia única específica de MAP, por lo que, no se encuentra en otras especies o subespecies de micobacterias (Poupart et al., 1993). También se identificó el gen hspX exclusivo de MAP con aplicabilidad diagnóstica (Ellingson

et al., 1998) y el locus del gen 251 (Sibley et al., 2007). La PCR dirigida a amplificar la secuencia de inserción IS900 es útil para detectar animales infectados en etapa subclínica y es preferido para realizar análisis cualitativos mientras que para análisis cuantitativos se hace uso del inserto F57 (Slana et al., 2008). La alta sensibilidad analítica de la técnica (Kawaji et al., 2007) permite detectar material genético de MAP en muestras negativas de cultivo fecal.

2.5.2.3 Cultivo bacteriológico

Dentro de las especies de lento crecimiento, MAP es la especie que más tiempo tarda, tomando hasta 18 semanas en crecer en el cultivo primario. El aislamiento de MAP se puede realizar a partir de heces (Whitlock et al., 2000), leche (Galiero et al., 2017), por cultivo histopatológico (Acharya et al., 2017), muestras de suelo (Salgado et al., 2011) y agua (Aboagye et al., 2018).

El cultivo bacteriológico es la prueba antemortem más sensible para el diagnóstico de MAP (Whittington, 2013). Esta técnica permite la detección de bacterias viables y la estimación de la carga bacteriana en el inóculo (Thirumalapura et al., 2021). MAP depende de la adición de micobactina a los medios de cultivo para su aislamiento, ya que, se encarga de la captación de hierro del medio (W Twort et al., 1912). La adición micobactina J, aislada de una cepa de MAP (Merkal & McCullough, 1982), reduce el tiempo de incubación tres semanas, en comparación a la micobactina p aislada de *Mycobacterium phlei* (Francis et al., 1953)

El aislamiento exitoso depende de la descontaminación de las muestras para la supresión de la microbiota irrelevante mediante descontaminación con agentes químicos como el Cloruro de Hexadecilpiridinio (Stabel, 1997). También se recomienda un periodo de incubación prolongado en medio de cultivo adecuado que contenga nutrientes esenciales y antimicrobianos, reconocimiento de las colonias de MAP y su identificación fenotípica o genotípica (Whittington, 2020).

El aislamiento de MAP se puede lograr en medio de cultivo sólido y líquido. Se sugiere tanto el uso de medios de cultivo líquido como sólidos, en donde cada uno de ellos influye en distinta forma en la tasa de aislamiento, crecimiento, morfología y desarrollo de MAP

Los medios sólidos comúnmente empleados para el aislamiento de MAP son a base de yema de huevo y enriquecidos con micobactina. En medios sólidos como el medio Yema de huevo de Herrold (HEYM) y el Löwenstein Jensen (LJ) se ha probado, además, la adición de componentes como Tween 80, ácido taurocólico, casitona, agar bacteriológico, ADC y OADC para optimizar su composición. (Aboagye & Rowe, 2018).

El cultivo en agar con yema de huevo (HEYM) es considerado la prueba diagnóstica definitiva en ganado. Sin embargo, requiere 8 a 16 semanas desde la inoculación hasta la aparición de colonias (Stabel, 1997). Otros medios de cultivo sólido empleados para aislamiento de MAP son el agar Middlebrook 7H10 (Damato & Collins, 1990), el cual se recomienda para recuperar MAP de un ambiente natural como los sedimentos de aguas (Aboagye & Rowe, 2018) y agar Middlebrook 7H11 (Whittington, 2020)

El uso de medios líquidos tiene como principal ventaja, que requieren menos tiempo de incubación para lograr el aislamiento de MAP (Tabla 2). Se ha reportado aislamientos de MAP en medios de cultivo líquidos dentro de un periodo de 4 a 8 semanas de incubación (Sweeney et al., 2012). El medio de cultivo sintético Middlebrook 7H9 es el más utilizado actualmente, aunque se le han hecho modificaciones para mejorar el aislamiento de MAP. Un ejemplo es el caldo M7H9C, el cual, se desarrolló y validó para realizar el diagnóstico de MAP y mostró tener igual eficiencia que métodos de cultivo líquido automatizados y con un menor costo (Whittington et al., 2013).

La necesidad de detección rápida de MAP ha impulsado la investigación en el desarrollo y la implementación de nuevos medios de cultivo. Dane y colaboradores en 2022 desarrollaron un medio de cultivo sólido optimizado para lograr un crecimiento más temprano de colonias. Este medio sólido está basado en Middlebrook 7H9 con adición de Tween 80 al 1,0%, Digerido pancreático de caseína (Casitona) 0,019%, agar bacteriológico 1,4%, yema de huevo al 10%, ADC al 10% y 1,65 µg/mL de Micobactina J (Dane et al en 2022). Otros estudios han reportado

que la morfología de las colonias en los medios sólidos basados en Middlebrook 7H9 se ve influenciada por la adición de Tween 80 al medio (Figura 4).

La caracterización de aislados de MAP ha permitido su clasificación en tres grupos (tipos I, II y III) (de Juan et al., 2005). Estas cepas requieren de medios distintos para su aislamiento y también distintos tiempos de incubación (de Juan et al., 2006). Los tipos de muestras utilizados para la detección de MAP como las heces o muestras ambientales con complejas en composición y se desconoce la cepa de MAP que pueda estar presente. Esto hace necesario el uso de distintos medios de cultivo. Las cepas S (tipo I y III) crecen mejor en agar LJ, mientras que las cepas C (tipo II) crecen mejor en medio HEYM. También se ha informado que los medios Middlebrook 7H9, 7H10 y 7H11 permiten el crecimiento de ambas cepas (Whittington et al., 2011).

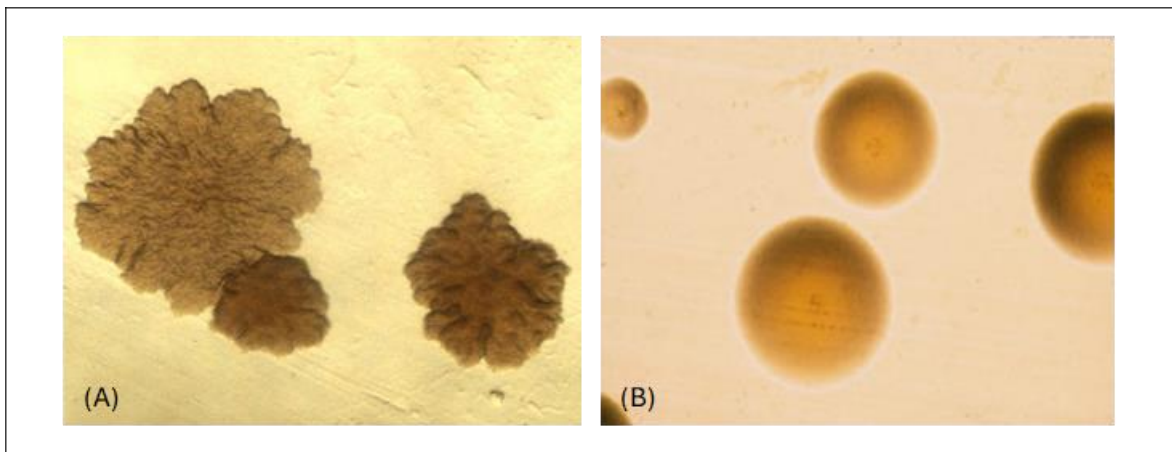


Figura 2. Morfología de colonias MAP creciendo en medio Middlebrook 7H9. **(A)** Colonias MAP en medio 7H9 sin Tween 80. **(B)** Colonias MAP en medio 7H9 con Tween 80.

Tabla 2. Ventajas y desventajas de los principales medios de cultivo utilizados para la detección de MAP.

Medios de cultivo	Ventajas	Desventajas
Sólido		
A base de huevo: Yema de Huevo de Herrold Löwenstein-Jensen A base de suero: Medio Dubos Sintéticos: Middlebrook 7H10 Middlebrook 7H11 Middlebrook 7H9 optimizado*	-Identificación morfológica de colonias MAP. -Cuantificación y enumeración de carga bacteriana más sencilla. -Facilidad de almacenar colonias para posteriores estudios. -Bajo precio en comparación con medios líquidos.	-Largo tiempo de incubación (12-20 semanas). -Desecación del agar. -Sensibilidad analítica baja en comparación con medios líquidos.
Líquido		
Sintéticos/basados en Middlebrook 7H9 Middlebrook 7H9 M7H9C Radiométricos/Automatizados BACTEC 460 BACTEC 7H12 BACTEC 12B modificado VersaTREK MGIT 960	- Mayor sensibilidad analítica. - Menos tiempo de incubación (6-12 semanas). -Compatibles con cepas S y C.	-La identificación de MAP es difícil. -Costo elevado de equipos especializados para los sistemas líquidos automatizados.

2.6 MAP en el ambiente

El MAP es un patógeno ubicuo de distribución global, persistente en el ambiente. Probablemente uno de los mecanismos utilizados por esta bacteria para sobrevivir en el ambiente sería en el interior de protozoos, específicamente las amebas de vida libre que se comportan como reservorios ambientales de bacterias patógenas y no patógenas (Samba-Louaka A et al., 2018). MAP tiene predilección por especies ruminantes y ha sido ampliamente estudiada en especies mayores, centrándose la mayoría en bovinos de leche y en especies menores como ovejas y cabras (Windsor., 2015). Su presencia se ha reportado en otros hospedadores que incluyen ciervos (Raizman et al., 2015), bisontes (Leid et al., 2002) y búfalo (Sivakumar et al., 2006).

La presencia de animales con infección asintomática representa un problema en el control de la diseminación de la enfermedad, a pesar de la ausencia de un cuadro clínico puede haber liberación de bacterias en el ambiente que infectarán a animales sanos.

2.7 Implicaciones de MAP en salud pública

Actualmente existe mucha evidencia de transmisión zoonótica de enfermedades, lo que implica un importante riesgo de salud pública. A nivel mundial es conocida la distribución de casos de enfermedades en humanos causadas por micobacterias. Entre las más reconocidas se encuentran la tuberculosis causada por *Mycobacterium tuberculosis* (Koch; 1882) y la lepra por *Mycobacterium leprae* (Britton & Lockwood, 2004). En los últimos años se ha dado importancia a las infecciones causadas por micobacterias no tuberculosas (NTM). Un importante grupo de NTM relacionada con humanos son las bacterias pertenecientes al complejo *Mycobacterium avium* (MAC: *Mycobacterium avium* Complex) como causantes de enfermedad pulmonar crónica (Wolinsky, 1992). Al tratarse MAP de una subespecie de *Mycobacterium avium* queda abierta la posibilidad que produzca infecciones en humanos.

La enfermedad de Crohn (EC) es una enfermedad inflamatoria crónica del tracto gastrointestinal en humanos. Hasta el año 2010 se han realizado estudios que plantean un origen genético de la EC como un trastorno autoinmune. Estos estudios realizados con paciente afectados y sanos (controles) han identificado hasta 71 sitios dentro del genoma relacionados con la susceptibilidad a la EC (Franke et al., 2010). Sin embargo, ya antes se había propuesto una relación entre EC y la paratuberculosis en base a similitudes clínico-patológicas entre ambas enfermedades (Dalziel., 1913.). Esta idea se vio reforzada con el aislamiento de una micobacteria similar a MAP en tres pacientes con EC (Chiodini et al., 1984).

Estudios moleculares sobre muestras de pacientes con EC han reportado la detección mediante PCR de la secuencia de inserción IS900 específica de MAP en 47% (14/30) de muestras de biopsias (Zarei-Kordshouli et al., 2019). Otro estudio

realizado en 40 muestras de intestino de pacientes con EC confirmó presencia de ADN de MAP en un 65% (26/40) (Sanderson et al., 1992). En ambos estudios se analizaron también muestras de pacientes sin EC como control. A pesar de también haber detectado ADN de MAP en controles, el mayor porcentaje de detección fue siempre en personas con EC.

MAP es liberado en el medio ambiente a través de las heces de animales infectados, lo que puede contaminar el entorno y exponer a las personas a infecciones. Desde el enfoque de Una Salud (One Health), se han llevado a cabo estudios de detección de MAP para analizar los riesgos potenciales de transmisión. Estos estudios incluyen el análisis de muestras de agua, suelo y alimentos para evaluar posibles fuentes de contagio (Gill et al., 2011).

2.8 Impacto económico de la infección con MAP

La paratuberculosis es considerada una enfermedad de importancia económica en los sistemas de producción de leche, y el principal foco de atención es sobre el efecto en la producción. Las repercusiones económicas se dan en función de la cantidad de animales afectados, infectados, infecciosos que presenten signos clínicos o en etapa subclínica (García & Shalloo, 2015). Dependiendo del grado de resistencia a la infección, los animales que se hayan infectado con MAP avanzarán en las 4 etapas de la enfermedad generando en consecuencia pérdidas económicas importantes dentro de las fincas (Rasmussen et al., 2021).

La cuantificación de estas pérdidas económicas en algunos casos es difícil de determinar debido a muchas variables como la región y sistemas de producción y el estado inmunológico del rebaño. Indiscutiblemente la producción de leche es el factor económico más importante, pero no se debe pasar por alto los costos relacionados al sacrificio de animales enfermos y la baja tasa de reproducción (Smith et al., 2010). Es importante resaltar que para todo estudio que busca evaluar los efectos sobre la producción de leche de la paratuberculosis lo ideal es contar con un sistema de registro de producción de leche (Richardson & More, 2009).

La disminución de la producción de leche y los costos de sacrificio de animales en estado clínico se describen como los principales efectos directos de la infección por MAP sobre la rentabilidad de las fincas lecheras y los impactos indirectos asociados al sacrificio por infertilidad (Richardson & More, 2009). Países como Argentina, Estados Unidos, Australia y Francia han analizado las pérdidas asociadas a la baja producción (Tabla 3).

Tabla 3. Estimaciones de impacto económico asociado a la paratuberculosis bovina en distintos países.

País	Pérdidas	Fuente
Argentina	6.3 millones USD/año	(Moreira and Tosi 1995)
Estados Unidos	200 -250 millones USD	(Ott et al., 1999)
	1,644 USD/100 vacas/año	Bhattarai et al, (2013)
	4,400 USD/rebaño	(Johnson-Ifearegulu et al., 1999)
Australia	276 USD/vaca/año	(Raizman et al., 2009)
	7,946 USD/rebaño/año	(Shephard et al., 2016)
Reino Unido	47 USD/Vaca/año	(Gunn, G. J et al., 2015)
Francia	2,386 USD/caso clínico	(Dufour et al., 2004)

y el aumento de la susceptibilidad a otras infecciones como la mastitis (Pritchard et al., 2017). Las pérdidas económicas indirectas también están relacionadas a las restricciones de movilidad de animales y a la comercialización de los productos.

Dentro de un rebaño infectado con MAP se pierde hasta el 1% de los ingresos brutos de la leche, equivalente a \$33 dólares americanos por vaca anualmente, principalmente derivada del decaimiento en la producción de leche y en países como Nueva Zelanda y Estados Unidos se han estimado pérdidas desde 54 a 198 millones de dólares respectivamente (Rasmussen et al., 2021). Los animales positivos para MAP producen significativamente menos leche que las vacas no infectadas (Lombard et al., 2005)

Un análisis basado en un modelo de decisiones sugiere que mejorar las prácticas de manejo del rebaño es más rentable que aplicar las pruebas de rutina (Dorshorst et al., 2006). Otro estudio basado en un modelo de presupuesto indicó que la adopción de prácticas como incremento de la higiene en el área de maternidad y

mejoras en la infraestructura destinadas a alimentación de los terneros en un periodo de 10 años produce beneficios que oscilan entre \$439 dólares y \$2543 por granja (Roche et al., 2020).

La detección oportuna de los animales infectados y la implementación de medidas adecuadas como su exclusión del rebaño ayudan a reducir la fuga de dinero directamente relacionadas a estos animales. Por cada hembra en producción que no sea diagnosticada a tiempo y se mantenga dentro del rebaño generaría hasta \$155/vaca en pérdidas solo en una lactancia, sumándole a esto otros costos, en total estas vacas no descartadas representan \$441 en pérdidas total para vacas con cultivo fecal positivo (Raizman et al., 2009).

2.9 Manejo y control de la paratuberculosis

Se han descrito los principales mecanismos de transmisión de la paratuberculosis y es a través de materia fecal la principal vía de contaminación de los predios. La carga bacteriana en el medio o prevalencia de la bacteria depende de la cantidad de animales infectados, pero en un estadio asintomático. Estos animales en estado asintomático son el principal problema en el control de la enfermedad. La detección temprana de estos animales es importante para poder retirarlos del hato y evitar que siga diseminando la bacteria.

Las pruebas diagnósticas que actualmente se implementan en los programas de control muestran una sensibilidad que varía según el estado clínico de los individuos. La falta de sensibilidad de estas pruebas limita la detección temprana de animales en estado subclínico (Pillai et al., 2002).

Existen dos factores que impulsan el control de la enfermedad, uno es por el impacto que esta enfermedad ejerce sobre la industria láctea y otro por su potencial vínculo con una inflamación crónica del tubo digestivo de los humanos de donde se ha detectado la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) (Sechi et al., 2005).

MAP ingresa y se propaga dentro en las fincas principalmente por la introducción de ganado infectado el cual liberará bacterias en las heces (Lombard, 2011). Esto

nos lleva a pensar que una de las principales estrategias de control es limitar el movimiento de animales infectados o de estatus sanitario desconocido. Esto va de la mano con la aplicación de pruebas diagnósticas periódicas para la identificación de animales infectados, afectados e infecciosos y así evitar que estos infecten a otros y que contaminen el ambiente (Figura 5).

El ingreso o la presencia de MAP se ha relacionado con las prácticas de manejo como la compra de ganado, la fertilización de pasto con estiércol no madurado y la cría mixta con otros rumiantes con la entrada y prevalencia de MAP en rebaños de producción de leche (Villaamil et al., 2021). Las estimaciones de prevalencia generalmente se realizan utilizando las técnicas de cultivo fecal y la prueba de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA) (Collins et al., 2005). Se ha demostrado que la prevalencia de la paratuberculosis disminuye al implementar buenas prácticas de manejo orientadas a reducir la exposición a MAP (Konboon et al., 2018)

El enfoque de control de la enfermedad se basa desde la prevención de la infección hasta la interrupción de la cadena de transmisión. Algunas medidas más extremas pero eficaces en el tiempo incluyen la prueba y sacrificio, tomando el enfoque de sacrificio inteligente. En casos extremos se suele recurrir a la eliminación total del rebaño desinfección de la finca y una repoblación del ganado. Las opciones de tratamiento para animales afectados clínicamente de paratuberculosis son ineficaces debido a la respuesta nula del organismo del huésped a la medicación.

Es decir, entonces que el tratamiento clínico es económicamente inviable. Uno de los puntos clave para el control de la paratuberculosis es la identificación de animales infectados mediante la aplicación periódica de pruebas diagnósticas.

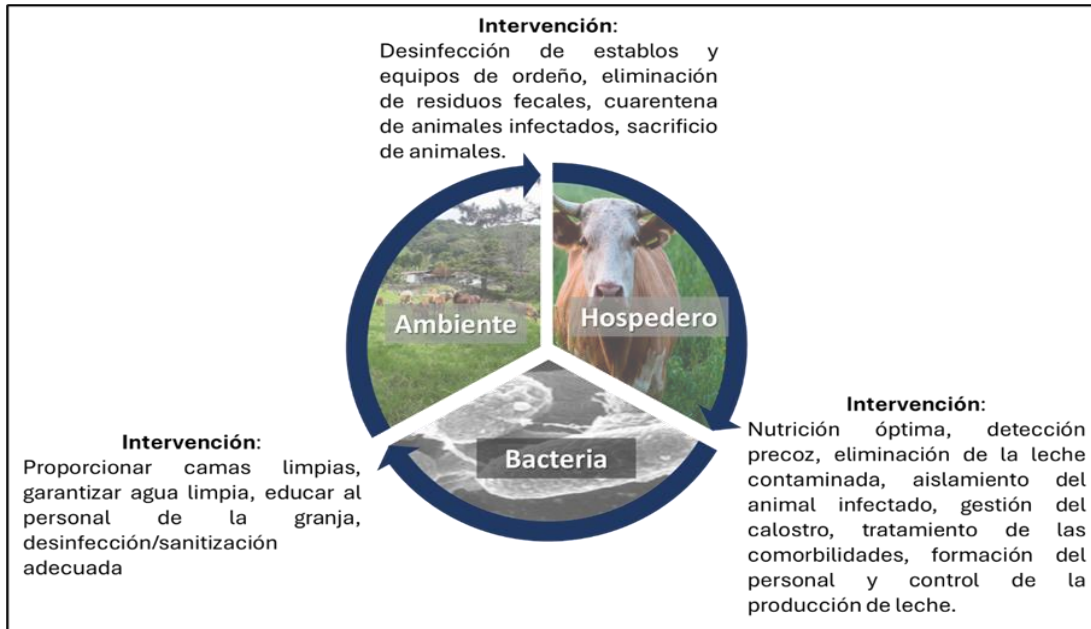


Figura 3. Interacción entre MAP, huésped y ambiente y medidas de intervención.

2.10 Cuestionarios epidemiológicos y evaluación de prácticas de manejo

La recopilación de información a través de herramientas como los cuestionarios, permite una caracterización epidemiológica de las enfermedades, identificando los factores asociados a su ocurrencia y cómo se comporta según la región de estudio y en el tiempo (Astudillo & Salud, 1979). Las preguntas incluidas deben ser formuladas en base a una previa identificación de las posibles causas del problema (Stehr-Green et al., n.d.).

El uso de cuestionarios como instrumentos de investigación ha permitido identificar prácticas de manejo asociadas a la prevalencia de la paratuberculosis. Esta relación ha sido estudiada por distintos investigadores. Un análisis basado en ELISA aplicado a ciento cincuenta y ocho fincas para determinar la prevalencia de infección por MAP y su posterior correlación con distintas prácticas de manejo determinó que la única variable que estuvo significativamente ($P=0.03$) asociada con la prevalencia fue el alojamiento de los terneros después del destete (Sockett et al., 1994)

Otras prácticas de manejo potencialmente riesgosas identificadas al analizar la prevalencia de infección mediante ELISA y aplicando cuestionarios son la compra de ganado, es decir un manejo de hato abierto (Villamil et al., 2020). Un análisis de PCR aplicado a muestras ambientales y evaluación de los factores de riesgo determinó que la crianza mixta de ganado bovino con otros rumiantes aumenta la probabilidad de infección del ambiente de las fincas con MAP (N. M. Correa-Valencia et al., 2019).

2.11 Estado actual de la ganadería y producción de leche en panamá

La actividad ganadera en Panamá es una actividad predominante y extensiva. Según datos del Instituto Nacional de Estadística y Censo para el año 2023 la existencia de ganado vacuno en el país era de 1,447,400 en donde Chiriquí representaba el 21.7%, con 314,100 cabezas de las cuales 68,800 cabezas estaban destinadas a la producción de leche (INEC, 2023) y para este mismo año se registró 178,975,039 litros de leche en el país. El rendimiento promedio de las vacas lecheras en Panamá está en 3.8 L por vaca al día según un artículo publicado en el periódico La Estrella de Panamá (Lasso, 2024.). Un valor muy similar se encontró en una evaluación realizada en la provincia de Darién en Panamá, donde a partir de 86 fincas se estimó una producción de 4.29 L por vaca al día (Chang, 2020).

La prevalencia real de MAP en América latina aún no está completamente descrita. Algunos de los países que han realizado estudios son Brasil, Argentina, Chile, Colombia, México, Venezuela, Perú, Bolivia y Panamá (Espeschit et al., 2017). En Costa Rica, el análisis mediante ELISA de 654 muestras de sueros bovinos procedentes del banco de suero del Ministerio de Agricultura de Costa Rica reveló que un 11.9 % (78/654) de las muestras tenía anticuerpos contra MAP (Dolz et al., 1999). En Colombia, Correa et al. (2019) reportaron una prevalencia a nivel de rebaño de 4.1% mediante PCR cuantitativo. Mientras que, en Panamá, el primer reporte de la enfermedad reportada por Goodridge et al. (2013) fue de una seroprevalencia de 49% utilizando muestras de suero de ganado de raza Gyr y Jersey.

CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA

3.1 Estandarización y evaluación del cultivo en medio líquido de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

Realizamos una revisión de literatura para identificar los medios de cultivo que hubiesen reportado un crecimiento más rápido de MAP. Seleccionamos los medios de cultivo líquido M7H9C y 7H9 con ADC y micobactina, este último lo codificamos como A7H9J. Se utilizó una cepa MAP de referencia identificada como tipo C. La cepa de referencia se encontraba preservada en medio LB con suero fetal equino y suplemento nutritivo ADC (albúmina, dextrosa y catalasa). La cepa cultivo en caldo 7H9 con ADC al 10% v/v y micobactina J por un periodo de 5 semanas para su reactivación. Pasada esta incubación el medio se centrifugó y el pellet se utilizó para inocular los medios de cultivo. La cepa se inoculó por triplicado en los medios líquidos M7H9C y A7H9J en botellas de cultivo de celular de 50 mL de capacidad (Nunc™ EasYFlask Cell Culture Flasks, Thermo Fisher), con 10 mL de medio de cultivo y se incubaron a 37°C por 8 semanas. La evaluación del crecimiento de MAP se realizó semanalmente. Se prepararon frotis con 20 µL de medio de cultivo de cada réplica y se tiñeron con ZN. Se realizó conteo de formaciones de cúmulos de micobacterias por microscopía directa observados a 100X en 100 campos y se registraron los valores promedios obtenidos.

3.2 Evaluación de medio de cultivo sólidos para el crecimiento de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

En este ensayo buscamos comparar la capacidad de tres medios de cultivo sólidos para promover el crecimiento temprano de MAP en un periodo de 8 semanas. Todos los medios de cultivo sólido fueron preparados “in house” y los mismos fueron: Medio de yema de huevo de Herrold con adición de piruvato de sodio (HEYM-PS) (Hernández-Reyes et al., 2022), medio Middlebrook 7H11 modificado con adición de yema de huevo (7H11-M) (Whittington et al., 1999) y un medio de cultivo sólido optimizado basado en Middlebrook 7H9 (Dane et al., 2022). Se utilizó MAP en fase de crecimiento logarítmica en medio líquido en la quinta semana de incubación a 37°C.

3.3 Análisis de muestras clínicas y ambientales

Luego de haber identificado a los medios de cultivo líquido M7H9C y sólido 7H9 el cual denominamos 7H9-OP como óptimos para un crecimiento más rápido, decidimos probarlos evaluando muestras clínicas y ambientales de 23 fincas ganaderas. Debido a la naturaleza del MAP y la complejidad de la presentación clínica de la paratuberculosis decidimos aplicar distintas pruebas para detectar la presencia de MAP en las muestras clínicas y ambientales obtenidas de las fincas ganaderas.

3.4 Área de estudio

El estudio se llevó a cabo en la provincia de Chiriquí, por ser la principal zona de producción de leche y carne. La actividad lechera cuenta con 68, 800 cabezas en producción de leche, repartidos en aproximadamente 1,716 productores de leche, representando un 25% del total de productores nacionales.

Se realizaron sesiones informativas donde se amplió sobre la importancia y el impacto que tiene la paratuberculosis en las fincas lecheras y se invitó a productores a participar del estudio. El presente estudio fue de tipo experimental y se analizaron muestras individuales de heces y muestras ambientales (suelo y agua) de 23 fincas de producción de leche en la provincia de Chiriquí (Figura 6). Se le asignó un código a cada una desde F1 hasta F23.

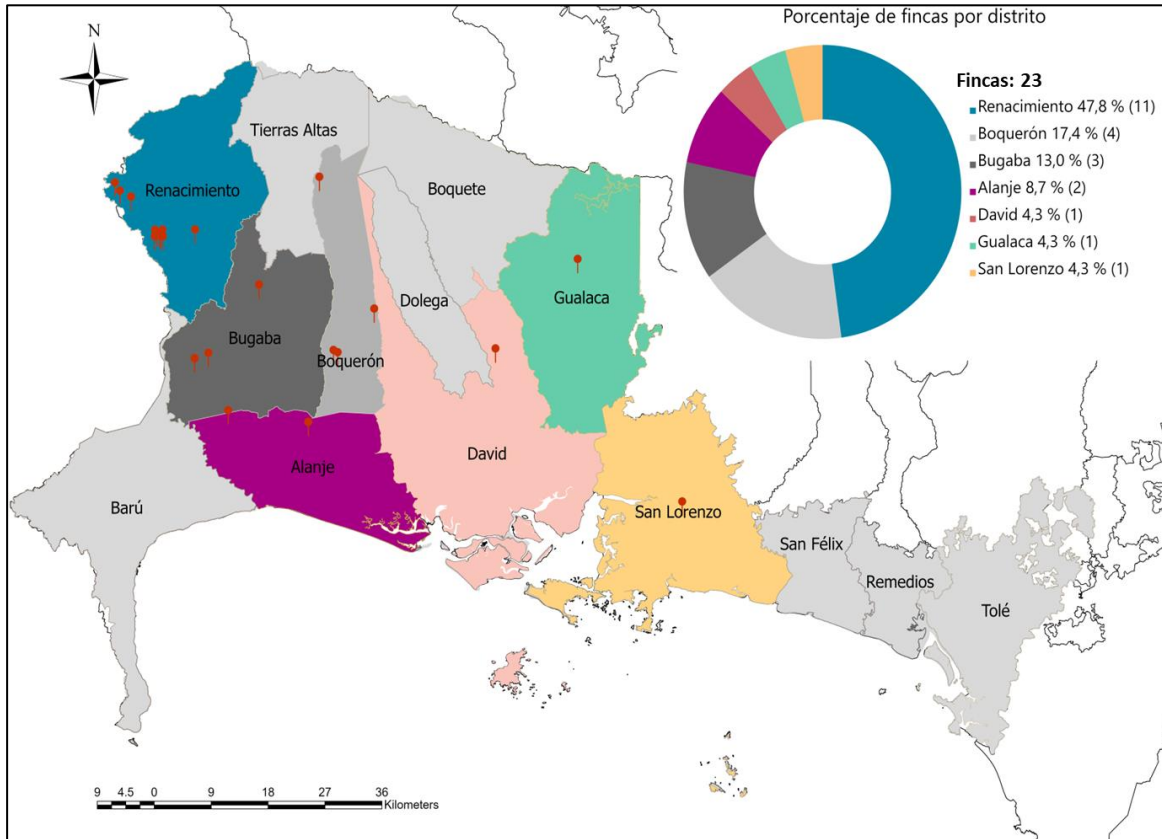


Figura 6. Fincas de producción de leche muestreadas y analizadas para la detección de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Las fincas se encontraban dentro de los distritos de Renacimiento, Boquerón, Bugaba, Alanje, David, Gualaca y San Lorenzo.

3.5 Cuestionario de evaluación de riesgos

Se realizó una revisión de literatura donde se evaluaron e identificaron prácticas de manejo ganadero relacionados con la infección con MAP (Tabla 4). Se diseñó un cuestionario georeferenciado en la plataforma Survey 123 del software ArcGIS para la recolección de datos sobre ubicación de las fincas, y prácticas de manejo ganadero. Se realizó una prueba piloto con un grupo de productores para identificar problemas en las preguntas.

Tabla 4. Preguntas incluidas en el cuestionario aplicado a productores.

Pregunta
Asistencia veterinaria
Compra de animales
Aplica cuarentena a animales nuevos
Realiza pruebas de laboratorio a los animales nuevos
Presencia de otros rumiantes: ovejas o cabras
Alquila sus pastos para animales de otras fincas
Alquila pastos de otras fincas para sus animales
Los terneros permanecen con sus madres después del parto
Separa los terneros de bovinos adultos
Utiliza el estiércol de las vacas para fertilizar los pastos
El estiércol recibe algún tratamiento antes de usarlo para fertilizar los pastos
Esperó al menos 3 meses en introducir animales en el pasto fertilizado con estiércol
Utiliza leche de descarte para alimentar terneros
Retira las camas de estiércol y realiza saneamiento de las instalaciones
Cuenta la finca con tinas para tratamiento de aguas residuales
Utiliza vehículo para el transporte de animales
El vehículo es propio o alquilado
Utiliza vehículos para transporte de estiércol
El vehículo es propio o alquilado
Utiliza vehículos para el transporte de alimentos
El vehículo es propio o alquilado
El o los vehículos utilizados son limpiados y desinfectados después de su uso
Existen empleados externos que puedan trabajar en otra finca ganadera
Usan los empleados ropa de protección exclusiva para la finca
Los visitantes que tiene contacto con el ganado utilizan ropa protectora adecuada
Presencia de animales con diarrea
Observa Pérdida de peso progresivo sin pérdida de apetito
Percibe Reducción en la producción de leche

3.6 Muestras

Se realizó la recolección de muestras individuales de heces, donde se tomó en cuenta a hembras bovinas en producción mayores a dos años, así como, muestras ambientales. El muestreo ambiental incluyó la toma de muestras de suelo y agua. Las muestras de suelo se tomaron en sala de ordeño, áreas de concentración de ganado adulto, pasillo hacia sala de ordeño, zona de escorrentía de agua y área de brete. Las muestras de agua fueron tomadas de las principales fuentes utilizada por el ganado, según indicaciones de los productores. Se tomó muestras de quebradas, bebederos. También se recolectó solo en algunas fincas agua de escorrentía (lixiviados) producto del proceso de limpieza de la sala de ordeño. Las muestras fueron recolectadas y enviadas al laboratorio iniciar su procesamiento. A todas las muestras se le asignó un código alfanumérico para control interno.

3.7 Recolección de muestras fecales

La toma de muestras se realizó entre los meses de abril 2023 y febrero de 2024. Las muestras fecales se tomaron directamente del recto de hembras bovinas con dos años o más que estuviesen en producción. Se vigiló aquellas con presencia de signos clínicos compatibles con la enfermedad. Se utilizó guantes obstétricos desechables para la obtención de aproximadamente 10 gramos de muestra que serán colocadas en envases estériles rotulados con fecha de recolección e identificación del individuo y finca. El transporte de las muestras se realizó en frío dentro de una nevera de hielo seco. Para el cultivo fecal, las muestras se almacenaron a 4°C durante la noche para su posterior procesamiento dentro 24 horas.

3.8 Recolección y transporte de muestras de agua

Las muestras de agua se tomaron en bebederos, zonas de recolecta de escorrentía utilizando botellas estériles. Se tomó un volumen de 1L de muestra de agua de cada punto de muestreo.

3.9 Recolección y transporte de muestras de suelo

Las muestras de suelo fueron tomadas a una profundidad entre 10 y 20 centímetros utilizando una pala. De cada área de interés se tomaron 4 submuestras las cuales se mezclaron para formar una muestra compuesta y se recolectaron en bolsas ziploc limpias. La descontaminación de las muestras de suelo se hizo igual que con las muestras fecales para PCR y cultivo.

3.10 Análisis de muestras

Todas las muestras se procesaron para análisis directo con tinción ZN (ZN directo) y PCR (PCR directo) y por cultivo bacteriológico. El crecimiento de BAAR en cultivo se confirmó con tinción ZN (ZN cultivo) y el crecimiento de MAP en cultivo se confirmó con PCR (PCR cultivo).

3.10.1 Descontaminación de muestras de heces y suelo para cultivo bacteriano

La descontaminación de las muestras fecales y de suelo para cultivo se hizo con el método de doble incubación de Whitlock y Rosenberger, 1990 con algunas modificaciones como se describe a continuación. Se colocaron 2 a 5 gramos de heces en un tubo cónico para centrifuga Falcon de 15 mL, se añadió de 10 mL de solución salina estéril (0.9%), se mezcló rigurosamente en vórtex y se dejó sedimentar por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se tomó una alícuota de 5 mL del sobrenadante y se sirvió en un nuevo tubo cónico Falcon de 50 mL. Se agregó 25 mL de HPC 0.9% y se dejó reposar a 37°C por 24 horas. Luego de 24 horas los tubos se centrifugaron a 900 rcf por 30 minutos y se descartó el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 1 mL de solución ANV preparada

con agua inyectable estéril, Anfotericina B (50 µg/mL), Ácido nalidíxico (100 µg/mL) y Vancomicina (100 µg/mL). Las suspensiones fecales se incubaron a 37°C por 72 horas.

3.10.2 Siembra en medios de cultivo y tiempo de incubación

Realizamos una revisión de literatura para identificar los medios de cultivo que hubiesen reportado un crecimiento más rápido de MAP. Decidimos evaluar este medio de cultivo y otra formulación basada en 7H9 con adición de ADC y Micobactina J que denominamos A7H9J.

La composición de los medios se muestra en la tabla 5. Se usó 100 µL de las suspensiones fecales y se inocularon por duplicado en botellas de cultivo celular sin filtro (Nunc™ EasYFlask Cell Culture Flasks, Thermo Fisher) que contenían 10 mL de medio de cultivo líquido M7H9C. Para el medio de cultivo sólido 7H9-OP se sirvió en platos Petri a razón de 20 mL de medio por plato. Se utilizó 200 µL de la suspensión para inocular en medio sólido por duplicado. Se incluyó una muestra como control positivo para cada medio de cultivo. Ambos medios de cultivos se incubaron a 37°C. Los medios líquidos y sólidos se incubaron durante 6 y 8 semanas respectivamente a 37°C. Los medios sólidos fueron sellados con doble capa de Parafilm y dentro de envases de plástico sellados para evitar la temprana deshidratación de los medios. Se incubaron en humedad a 37°C y se monitoreará el crecimiento semanalmente.

Tabla 5. Composición por litro de medios de cultivo para el aislamiento de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

Ingredientes	Medios líquidos		Medio Sólido		
	M7H9C	A7H9J	HEYM-PS	7H9-OP	7H11-M
Middlebrook base 7H9	3.1 g	5.22 g	-	4.7 g	-
Middlebrook 7H11	-	-	-	-	14.3 g
Triptona	667 mg	-	-	190 mg	-
NaCl	-	-	4.5 g	-	-
Extracto de carne	-	-	2.7 g	-	-
Peptona	-	-	22.5 g	-	-
Bacto Agar	-	-	15.3 g	14 g	-
Homogenizado de huevo	-	-	-	-	-
Yema de huevo	167 mL	-	350 mL	100 mL	200 mL
Verde de malaquita [2%]	-	-	5 mL	-	-
Glicerol	-	5.5 mL	25 mL	-	-
Piruvato de sodio	-	-	4 g	-	-
Enriquecimiento y aditivos	-	-	-	-	-
ADC	26.7 mL	133 mL	-	100 mL	200 mL
Tween 80	-	-	-	10 mL	-
Micobactina j	0.83 mg	2 mg	2 mg	1.6 mg	1 mg
Antimicrobianos	-	-	-	-	-
PANTA	33.3 mL	-	-	25 mL	40 mL
Cloranfenicol	-	-	[100 µg/mL]	-	-
Anfotericina B	-	-	[50 µg/mL]	-	-

3.10.3 Tinción ZN en frotis de muestras directas y de cultivo

Se realizó frotis de muestras de heces, suelo y agua. También se prepararon frotis con 20 µL de medio de cultivo líquido luego de la incubación y las colonias sospechosas de MAP en medio sólido también se tiñeron con tinción ZN para la detección de BAAR en las muestras.

3.10.4 Extracción de ADN de muestras fecales para PCR

Las muestras de heces y suelo se procesaron de igual manera para la extracción de ADN con el método de CTAB (Tabla 6). Aproximadamente 5 g de muestra se colocó en tubos cónicos Falcon de 50 mL y se agregó 45 mL de HPC 0.75% y los tubos se mezclaron en vórtex y se dejó sedimentar al menos 48 horas. Este proceso permitió la separación de partículas de acuerdo con su densidad permitiendo la formación de 3 fases: sedimento, fase intermedia y sobrenadante. Se tomó 250 μ L de la fase intermedia y colocó en un nuevo tubo. Se agregó 50 μ L de solución de lisozima [10 mg/mL] seguido de agitación en vórtex y se incubó a 37°C por una hora. Se agregó 70 μ L de Dodecilsulfato sódico al 10% (SDS 10%) y se agitó en vortex. Se agregó 3 μ L de proteinasa K, se agitó en vortex y se incubó a 65°C por 10 minutos. Se agregó 100 μ L de NaCl 5M y se mezcló invirtiendo los tubos. Se agregó 80 μ L de CTAB/NaCl, se mezcló en vortex y se incubó a 65°C por 10 minutos. Se agregó 800 μ L de Fenol Cloroformo Isoamílico (25:24:1) y se agitó en vortex por 10 segundos. Los tubos se centrifugaron a 13,000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante se traspasó a un nuevo tubo y se agregó 500 μ L de Isopropanol. Los tubos se agitaron en vortex y se incubaron a -20°C hasta el día siguiente. Se retiraron los tubos del congelador y se centrifugaron a 13,000 rcf por 15 minutos. Se descartó el sobrenadante y los tubos se dejaron secar. Se lavó el sedimento con 1 mL de etanol frío al 70% y se centrifugaron a 13,000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante se descartó y se dejó secar los tubos antes de resuspender el ADN con 100 μ L de agua libre de nucleasas. Una vez resuspendido el ADN se incubó a 37°C por una hora. La concentración y la calidad del ADN obtenido se midió colocando 1 μ L de muestra en un espectrofotómetro de micro volumen (NanoDrop 2000).

Tabla 6. Materiales y reactivos utilizados para la extracción de ADN con el método CTAB.

	Materiales	Equipos	Reactivos
Extracción	Guantes de látex	Centrífuga	HPC 0.75%
	Espátulas de plástico	Vórtex	Lisozima
	Tubos Falcon 50 mL	Termobloque	SDS 10%
	Micropipetas	NanoDrop 2000	Proteinasa K
	Puntas estériles		NaCl 5M
	Tubos de 2 mL estériles		CTAB/NaCl
	Papel filtro		Fenol cloroformo isoamílico Isopropanol Etanol 70% frío Buffer TE 1X

3.10.5 Procesamiento de muestras de agua para PCR y cultivo

Las muestras de agua se procesaron siguiendo un protocolo previamente descrito (Whan et al., 2005) con algunas modificaciones. Todo el volumen de muestra (1 L) se centrifugó a 2,500 rcf por 20 minutos en tubos cónicos de 50 mL. Se descartaron los sobrenadantes y se recolectaron los sedimentos. Del sedimento unificado se tomó para realizar frotis, 1 mL para extracción de ADN mediante CTAB y para cultivo se tomó 1 mL de sedimento y se traspasó a un tubo cónico de 15 mL de capacidad. Se agregó 5 mL de HPC 0.75% y se incubó a temperatura ambiente en un agitador (Thermo Scientific Vari Mix Test Tube Rocker M48725) con agitación ocasional. Pasadas las 5 horas se centrifugaron los tubos a 2,500 rcf por 20 minutos, se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 1 mL de PBS-Tween 80 al 0.4% estéril. Cada muestra se inoculó por duplicado con 200 µL en los medios de cultivo M7H9C y 7H9-OP.

3.10.6 Identificación de crecimiento de MAP en medio de cultivo líquido M7H9C

La identificación del crecimiento de MAP en el medio M7H9C se hizo de la siguiente manera. Pasadas las 6 semanas de incubación las botellas de cultivo se retiraron de la incubadora. Se agitaron manualmente y se tomaron 20 μ L de medio y se realizaron frotis y tinción ZN para detectar crecimiento de BAAR. Las muestras positivas por ZN fueron procesadas para extracción de ADN y PCR.

Se evaluó el desempeño de los cebadores IS900R, F57, ISMAv-2 y Locus 255 en la detección de MAP en muestras cultivadas en medio líquido.

3.10.7 Preparación de muestra de cultivo líquido para extracción de ADN y PCR

Para evaluar la eficiencia de la extracción de ADN del medio líquido mediante el método de CTAB utilizado en nuestro laboratorio, seleccionamos inicialmente 35 muestras de cultivo líquido incluyendo controles positivos. Los experimentos se realizaron utilizando Tris-EDTA (TE) con lavados y centrifugaciones diferenciales. En el primer experimento se tomó un volumen de 200 μ L y se centrifugó a 13, 000 rpm por 10 minutos y al sedimento se agregó Lisozima de acuerdo con el protocolo de CTAB. Los siguientes experimentos se realizaron disminuyendo el volumen de medio líquido y agregando igual proporción de TE, seguido de centrifugaciones diferenciales.

El alto contenido de proteínas en el medio líquido producto de la adición de yema de huevo requirió la implementación de un pretratamiento de la muestra con etanol absoluto, siguiendo un protocolo previamente descrito (Whittington et al., 1998) con algunas modificaciones. Brevemente, de la botella de cultivo líquido con 6 semanas de incubación y con crecimiento confirmado mediante tinción ZN, se tomaron 250 μ L y se colocaron en tubos cónicos de microcentrífuga de 1.5 mL. Este volumen se centrifugó a 13,000 rpm por 10 minutos y se descartó el sobrenadante. Se agregaron 250 μ L de TE 1X y se hizo vórtex por 1 minuto. Luego se agregó 250 μ L de etanol absoluto (Alcohol etílico puro, grado biología molecular) y se dejó reposar

durante 2 minutos. Se mezcló en vórtex por 1 minuto y luego se centrifugó a 1,500 rpm por 5 minutos. Se recolectó el sobrenadante y se pasó a un nuevo tubo de microcentrífuga y se incubó a 100°C por 20 minutos en un termo bloque. Se dejó enfriar 5 minutos antes de agregar lisozima si se hacía la extracción con CTAB inmediatamente o se guardaba a -20°C hasta la extracción.

3.10.8 Identificación de MAP en medios de cultivo sólidos

Se revisó el crecimiento de colonias en medio sólido y las colonias sospechosas con características fenotípicas compatibles con MAP se tiñeron con tinción ZN para confirmar la presencia BAAR y únicamente aquellas positivas fueron sometidas a extracción de ADN utilizando el protocolo de CTAB antes descrito y a PCR. Los resultados se visualizaron en un gel de agarosa. Las colonias se colocaron en un tubo tapa rosca de 1,5 mL con 500 µL de TE 1X y se incubaron a 100°C por 20 minutos para su inactivación. La extracción de ADN de colonias se realizó con el método CTAB.

3.10.9 Reacción en cadena de la polimerasa para detección de MAP

Para la detección de ADN de MAP por PCR se utilizaron 5 genes diana que varían entre ellos en cuanto a sensibilidad y especificidad (Tabla 7). Los genes IS900 y IS900R se utilizaron en ensayos de PCR en tiempo real y PCR punto final para detección de ADN-MAP en muestras directas. La confirmación de MAP en cultivo se realizó con los cebadores IS900R, F57, ISMav-2 y Locus 255 se utilizaron en ensayos de PCR punto final.

Tabla 1. Cebadores utilizados para la detección molecular de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

Cebador	Nº de copias		Secuencias	Producto
IS900	14-18	F	GTT CGG GGC CGT CGC TTA GG	400 pb
		R	GAG GTC GAT CGC CCA CGTGA	
IS900R	16	F	ATG CGC CAC GAC TTG CAG CCT	183 pb
		R	GGC ACG GCT CTT GTT GTA GTC G	
F57	1	F	TTG GAC GAT CCG AAT ATG T	254 pb
		R	AGT GGG AGG CGT ACC A	
Locus 255	1	F	CAG TCA CCC CGC GGC CGG TA	402 pb
		R	TCT ACT GAC CCG CAG ATC GAA	
ISMAV -2	3	F	GTGTGACGGTGTTCGGTTG	72 pb
		R	TGATCATCGATGCCGGTCAG	

Para el PCR en tiempo real utilizó el cebador IS900 (Tabla 7). La reacción se realizó con un volumen final de 20 µL, luego de mezclar 10 µL de PowerUp SYBR Green PCR Máster Mix, 1 µL Primer F, 1 µL Primer R, 6 µL de H₂O libre de nucleasas (Invitrogen™) y 2 µL de muestra de ADN. Las condiciones de reacción (Tabla 8) fueron programadas en un Sistema Automatizado para PCR en tiempo real – Applied Biosystems 7500 Fast – Thermo Fisher Scientific. Fueron consideradas positivas aquellas muestras que no sobrepasen el límite de ciclo umbral (Ct). Los resultados se consideraron positivos si los valores de Ct fueron ≤ 34. Como control positivo se utilizó ADN de referencia de la cepa MAP K-10. El control negativo no llevó muestra de ADN (no template) se completó el volumen de reacción (20 µL) con agua libre de nucleasas (Invitrogen). Las condiciones de reacción de PCR punto final con los demás cebadores se muestran en la tabla 9.

Tabla 2. Condiciones de reacción PCR en tiempo real utilizando el cebador IS900.

gen IS900			
Etapas	Temp ° C	Tiempo	
Activación UDG	50°C	2 min	
Activación Polimerasa	95°C	2 min	
Desnaturalización	95°C	15 s	40 ciclos
Hibridación	55°C	15 s	
Extensión	72°C	30 s	

Tabla 3. Condiciones de reacción de PCR punto final con cebadores específicos de MAP.

	IS900R	F57	ISMAV-2	Locus 255
PCR punto final				
Hot start	95°C - 10 min	95°C - 10 min	95°C - 10 min	95°C - 10 min
Desnaturalización	95°C - 30 seg	95°C - 30 seg	95°C - 30 seg	95°C - 30 seg
Hibridación	60°C - 30 seg	62°C - 30 seg	62°C - 30 seg	63°C - 30 seg
Extensión	72°C - 30 seg	72°C - 30 seg	72°C - 30 seg	72°C - 30 seg
Extensión final	72°C - 7 min	72°C - 7 min	72°C - 7 min	72°C - 7 min
Enfriamiento	4°C ∞	4°C ∞	4°C ∞	4°C ∞
Ciclos	35	35	35	35

3.11 Análisis de datos

Se construyó una base de datos con los resultados obtenidos de los ensayos. Se utilizó estadística descriptiva para visualizar los datos. Las pruebas t de Student y U de Mann-Whitney se emplearon para comparar los valores del crecimiento de la cepa MAP de referencia y los conteos bacterianos realizados en muestras analizadas. El índice Kappa de Cohen se calculó para evaluar la concordancia entre los resultados del cultivo y análisis directo (PCR y ZN directos) La prueba exacta de Fisher se usó para comparar proporciones de los resultados de detección de MAP con cebadores específicos. La prueba de Chi-cuadrado para investigar la asociación entre las prácticas de manejo y el estado de infección por MAP en las fincas. Se calculó el valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN).

CAPÍTULO 4: RESULTADOS

4.1 Estandarización y evaluación del cultivo en medios líquido de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

El resultado de tres ensayos independientes evaluando los medios de cultivo líquido con cepa de referencia mostró que el medio M7H9C tuvo un mejor desempeño que el medio A7H9J en el crecimiento de la cepa MAP de referencia. Se observó diferencia significativa ($p=0.02$) en el crecimiento en la sexta semana de incubación (Figura 7A). El medio M7H9C tuvo en promedio 1.3 cúmulos BAAR/campo mientras que en el medio A7H9J se observó 0.2 cúmulos BAAR/campo en la sexta semana de incubación. Esta diferencia en el crecimiento de MAP en el medio M7H9C coincidió con la llegada a la fase estacionaria del cultivo. A pesar de que MAP creció en ambos medios de cultivo líquido (Figura 7B), el mayor crecimiento de MAP se observó en el medio M7H9C.

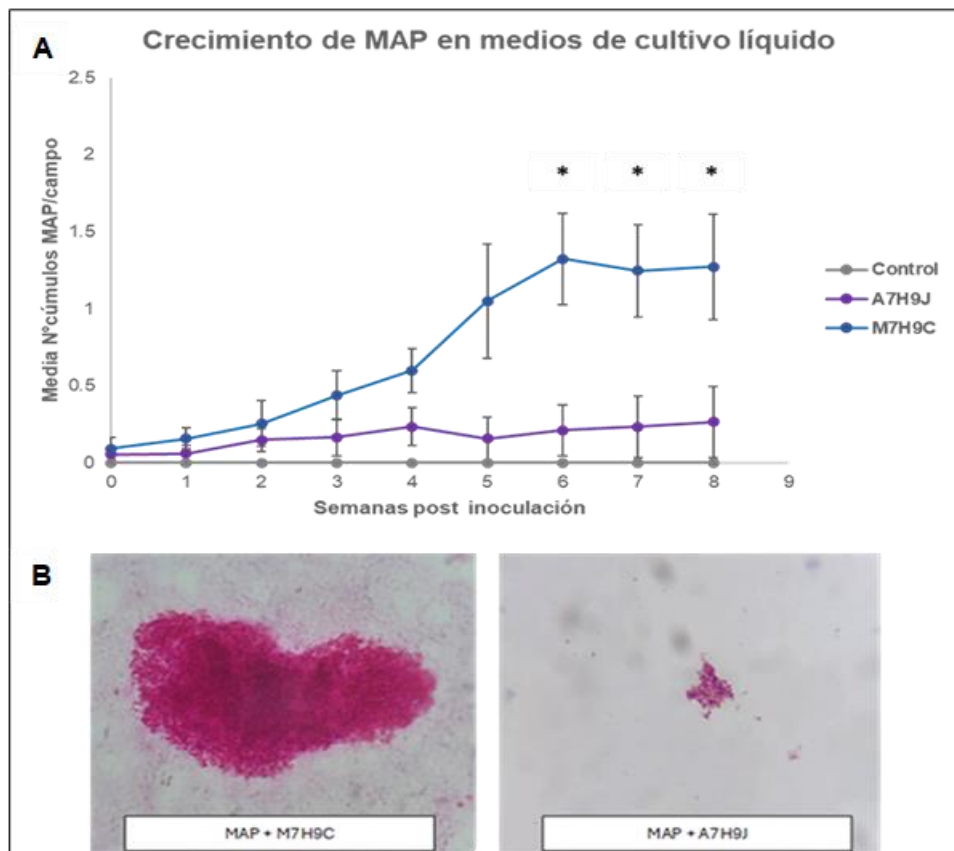


Figura 7. (A) Curva de crecimiento de MAP en medio líquidos M7H9C y A7H9J. (B) Diferencia en el crecimiento de MAP en cada medio observada al microscopio luego de tinción ZN.

4.2 Extracción de ADN de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* a partir de medio líquido M7H9C

Se obtuvieron distintas concentraciones de ADN obtenidas en los cinco experimentos con un promedio de 24 ng/μL con una desviación estándar de 15 (24 ± 15). De igual forma entre los cinco experimentos de extracción la calidad promedio del ADN en relación 260/280 fue de 1.3 con una desviación estándar de 0.2 (1.3 ± 0.2). La calidad del ADN fue mejor en el quinto experimento donde se utilizó etanol absoluto para pretratar la muestra (Figura 8A). La mayor concentración se obtuvo en el primer experimento donde se obtuvo 43 ng/μL, sin embargo, se obtuvo una calidad de ADN en relación 260/280 de 1.2. Con el ADN obtenido de esta extracción no fue posible ver amplificaciones mediante PCR IS900. El quinto experimento permitió la amplificación por PCR del control positivo (Figura 8B).

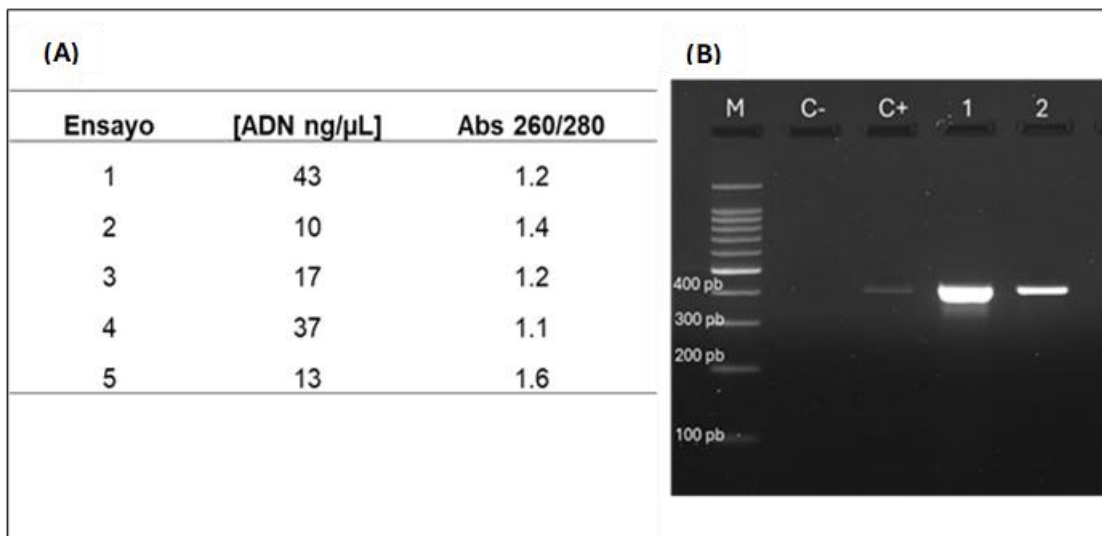


Figura 8. Resultados de ensayos de extracción de ADN a partir de medio líquido M7H9C

4.3 Evaluación de medios de cultivo sólidos para el crecimiento de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

En el ensayo en medio sólido, la aparición de colonias se observó únicamente en el medio de cultivo 7H9-OP a partir de la tercera semana de incubación. Se observó crecimiento los medio 7H9-OP inoculados con MAP crecidas en caldo A7H9J como en medio M7H9C. No hubo crecimiento de la cepa de referencia en los medios HEYM-PS y 7H11-M en las 8 semanas de incubación (Figura 9).

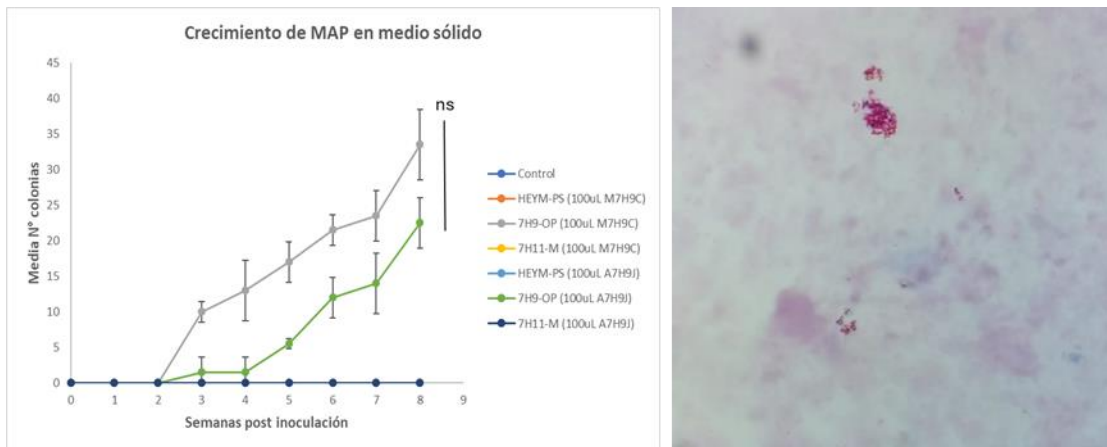


Figura 9. Curva de crecimiento de cepa MAP de referencia en medios de cultivo sólido 7H9-OP, HEYM-PS y 7H11-M.

4.4 Fincas ganaderas evaluadas en el estudio

Del total de fincas muestreadas (23), el 65% (15/23) de ellas estaba clasificado como grado C, el 26% (6/23) como grado A y el 8% (2/23) como grado B, según los estándares de calidad de la leche y el nivel de mecanización del ordeño. Las fincas de estudio se encontraban distribuidas en los distritos de Alanje (2), Boquerón (4), Bugaba (3), David (1), Gualaca (1), Renacimiento (11) y San lorenzo (1) (Figura 6). Se analizaron 462 muestras de heces, 40 muestras de suelo y 44 muestras de agua. Durante el estudio, 2 fincas (F1 y F3) se visitaron por segunda vez debido a reportes de animales con síntomas. Para el análisis de los datos solo se tomó un resultado como válido de los animales muestreados nuevamente.

4.5 Resultados de tinción ZN directo de muestras clínicas y ambientales

La tabla 10 muestra los resultados de ZN directo por cada tipo de muestra y sitio de recolección de las muestras ambientales. El análisis microscópico de las muestras fecales y ambientales permitió observar BAAR aislados, ligeramente agrupados y formando cúmulos, siendo esta última la forma más típica en que MAP suele encontrarse (Figura 10).

En el análisis microscópico de 462 frotis de heces teñidos con ZN se observó presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes en 15% (71/462) de las muestras fecales analizadas con un promedio de 0.37 BAAR/campo (0.39 ± 0.91) en 100 campos observados (Tabla 10).

Los frotis de muestras de suelo fueron evaluados igual que las muestras de heces. Sin embargo, no se observó BAAR en ninguna de las muestras de suelo evaluadas en los 5 sitios muestreados. Los frotis de muestras de agua se prepararon a partir del sedimento recolectado durante el proceso de concentración por centrifugación de las muestras. Se observó BAAR en 22% (10/44) de las muestras de agua con un promedio de 0.6 BAAR/campo (0.6 ± 0.3) en 100 campos observados.

Tabla 10. Detección de bacilos ácido-alcohol resistentes en muestras clínicas y ambientales según el tipo de muestra.

Muestra	Origen de la muestra	<i>n</i>	BAAR +%	\bar{X} Bacilos/campo
Heces	Vacas >2 años	462	15% (71/462)	0.39±0.91
	Sala de ordeño	16	0% (0/16)	-
	Concentración de ganado adulto	11	0% (0/11)	-
Suelo	Pasillo hacia sala de ordeño	7	0% (0/7)	-
	Zona de escorrentía de agua	4	0% (0/4)	-
	Brete	2	0% (0/2)	-
Agua	Quebrada	12	25% (3/12)	0.07±0.02
	Bebederos	29	14% (4/29)	0.12±0.31
	Agua de escorrentía (lixiviados)	3	100% (3/3)	2.34±0.39
Total		546	15% (81/546)	0.41±0.35

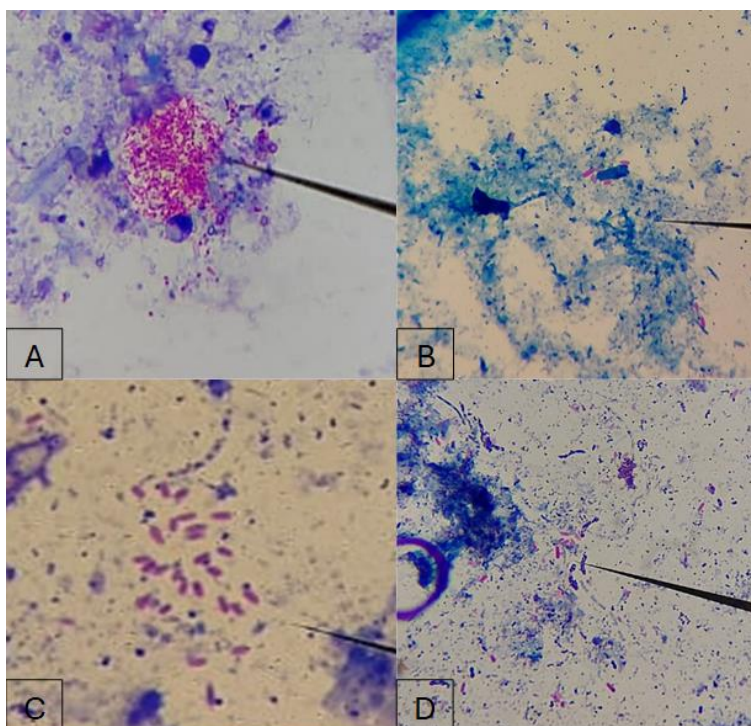


Figura 10. Bacilos ácido-alcohol resistente observados en muestras fecales y ambiental. **(A y B)** muestras de heces. **(C y D)** muestras de agua. **(A)** Bacilos agrupados formando un gran cúmulo altamente sugerente de MAP en muestra de heces; **(B)** pocos bacilos aislados; **(C)** BAAR grandes ligeramente agrupados; **(D)** BAAR observados en muestras de agua.

4.6 Cultivo de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

Se aisló MAP en el 3.1% (17/546) de muestras evaluadas por cultivo (heces, suelo y agua). Del total de aislamientos confirmados el 82.4% (14/17) fue en muestras de heces de 7 fincas, 11.8% (2/17) fue en muestras de agua y el 5.9% (1/17) fue en muestra de suelo (Tabla 11). Los aislamientos en medio sólido fueron de 1 UFC por muestra y fueron colonias pequeñas, lisas y color crema (Figura 11). Del total de fincas muestreadas y analizadas por cultivo bacteriano se aisló MAP en el 30.4% (7/23) (Figura 12). La edad promedio de los animales analizados, así como, el tamaño promedio del hato y la producción fue distinta entre las fincas positivas y negativas por cultivo (Tabla 12).

Tabla 11. Total de aislamientos de MAP por medio de cultivo

Medio de cultivo	N° de aislados confirmados			Total
	Heces	Suelo	Agua	
M7H9C (líquido)	12	1	1	14
7H9-OP (sólido)	2	0	1	3
Total	14	1	2	17

Tabla 12. Características y resultado de cultivo de 23 fincas ganaderas en la provincia de Chiriquí evaluadas para la detección de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

Características	Estatus de cultivo MAP de 23 fincas	
	Positivos (7)	Negativo (16)
Edad promedio (años)	7±2	6±1.32
Tamaño promedio del hato	97±103	55±42
Promedio de animales en ordeño	35±26	14±13
Producción promedio L/día/vaca†	4.7±2.5	8.3±5.8
Distrito		
Renacimiento (11)	2(18.1%)	9(81.8%)
Bugaba (3)	2(66%)	1(33%)
Alanje (2)	1(50%)	1(50%)
David (1)	1 (100%)	0
San Lorenzo (1)	1(100%)	0
Boquerón	0	4(100%)
Gualaca	0	1(100%)
Razas y cruces		
Cruzada (191)	8(4.1%)	183(95.8%)
Holstein (112)	3(2.6%)	109(97.3%)
Girolando (78)	2(2.5%)	76(97.4%)
Cebú (6)	1(16.6%)	5(83.3%)
Jersey (41)	0	41(100%)
Pardo suizo (19)	0	19(100%)
Senepol (7)	0	7(100%)
Siboney (1)	0	1(100%)
Normando (3)	0	3(100%)
Brahman (2)	0	2(100%)
Angus (2)	0	2(100)

†Producción de leche L/vaca/día calculado con datos de producción (L/N° animales*N° de ordeños)

4.7 Cultivo de MAP a partir de muestras de heces

El cultivo de 462 muestras de heces en medio líquido M7H9C permitió detectar crecimiento de BAAR en el 13% (62/462) con un promedio 6.7 cúmulos BAAR/campo (6.7 ± 4.4) en 100 campos observados. En total el cultivo permitió el aislamiento de MAP en 14 muestras de heces. Se confirmó MAP en medio M7H9C con PCR en el 3% (12/462) luego de seis semanas de incubación. En cultivo sólido se confirmó MAP realizando PCR de colonias en 0.4% (2/462). Las muestras positivas por cultivo pertenecían a 7 fincas (F1, F3, F4, F8, F9, F14 y F17) (Figura 13). También hubo diferencia en los porcentajes de ZN de cultivo entre las fincas positivas y fincas negativas (Tabla 13).

Tabla 13. Resultados de cultivo de MAP en medio líquido y sólido

		Análisis de cultivo					
		M7H9C (Líquido)			7H9-OP (Sólido)		
Muestra	Cultivo	N° de fincas	ZN%	\bar{X} BAAR/campo	PCR cultivo	ZN% (+/total)	PCR cultivo
Heces	Positivo	7	15% (40/262)	6.8	4.6 (12/262)	2% (5/262)	0.7% (2/262)
	Negativo	16	11% (22/200)	6.5	0	0	0
Total		23	13% (62/462)	6.7	3% (12/462)	1.0% (5/462)	0.4% (2/462)

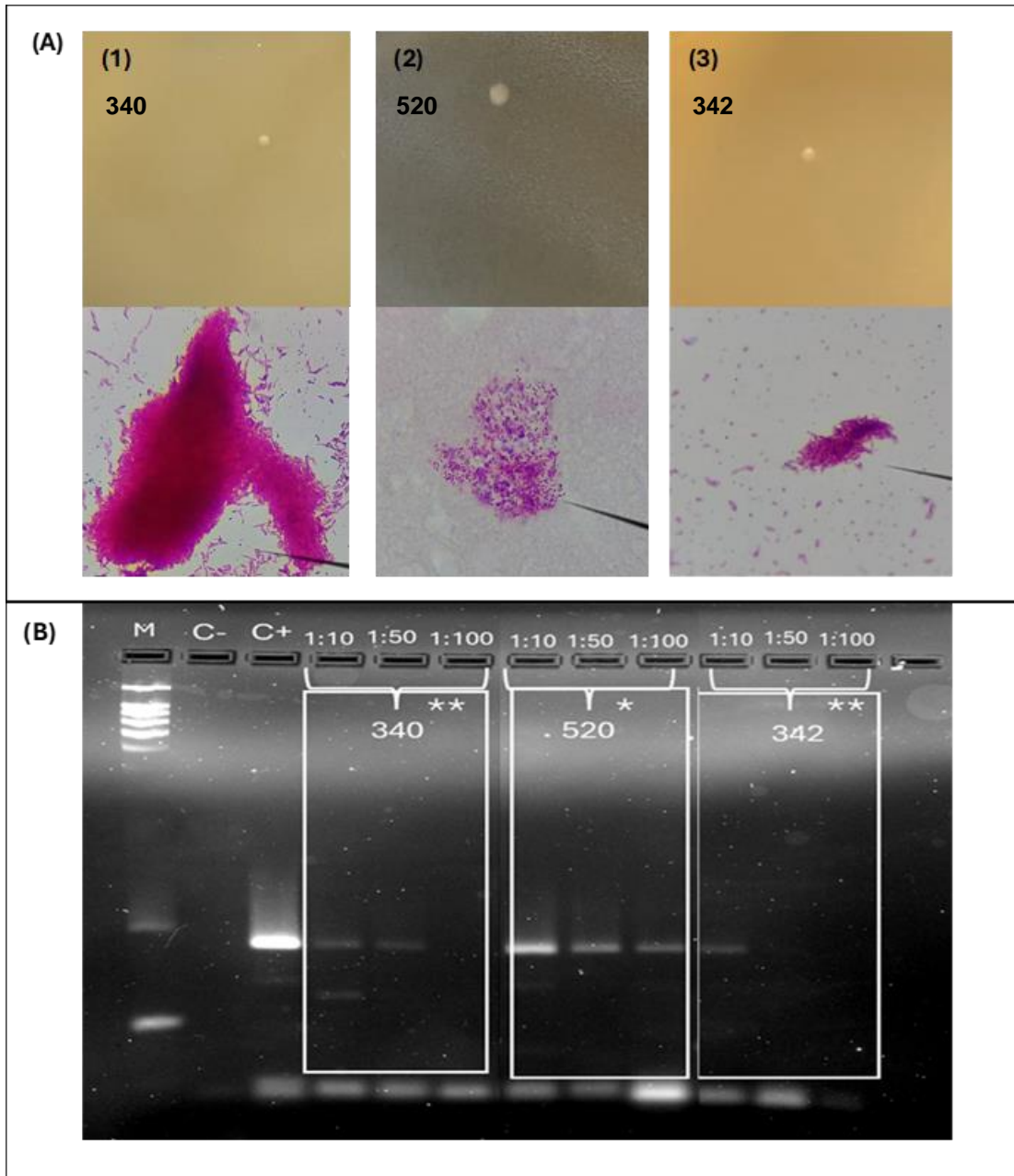


Figura 11. (A) Colonias pequeñas de aspecto liso y color crema aisladas en medio de cultivo sólido 7H9-OP en la tercera semana de incubación. En A1, A2 y A3 se muestra resultados de tinción ZN de colonias de muestras 340 (Heces **), 342 (Heces **) y 520 (Agua *) respectivamente. **(B)** Resultados de IS900R-PCR. M: Escalera 100 pb; C-: Control negativo; C+: Control positivo. En cada cuadrícula se observa el producto de amplificación de cada muestra respecto de la dilución evaluada.

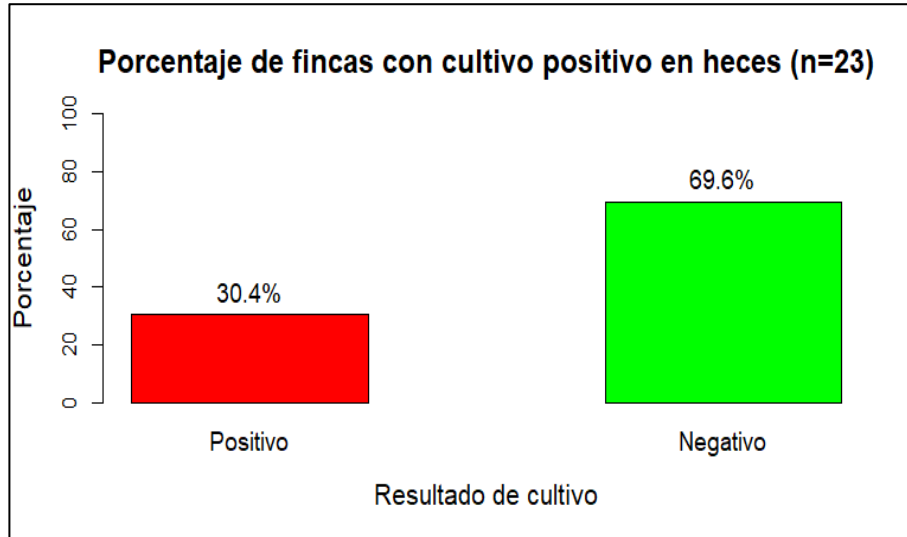


Figura 12. Porcentaje de fincas con cultivo positivo de MAP en muestras de heces.

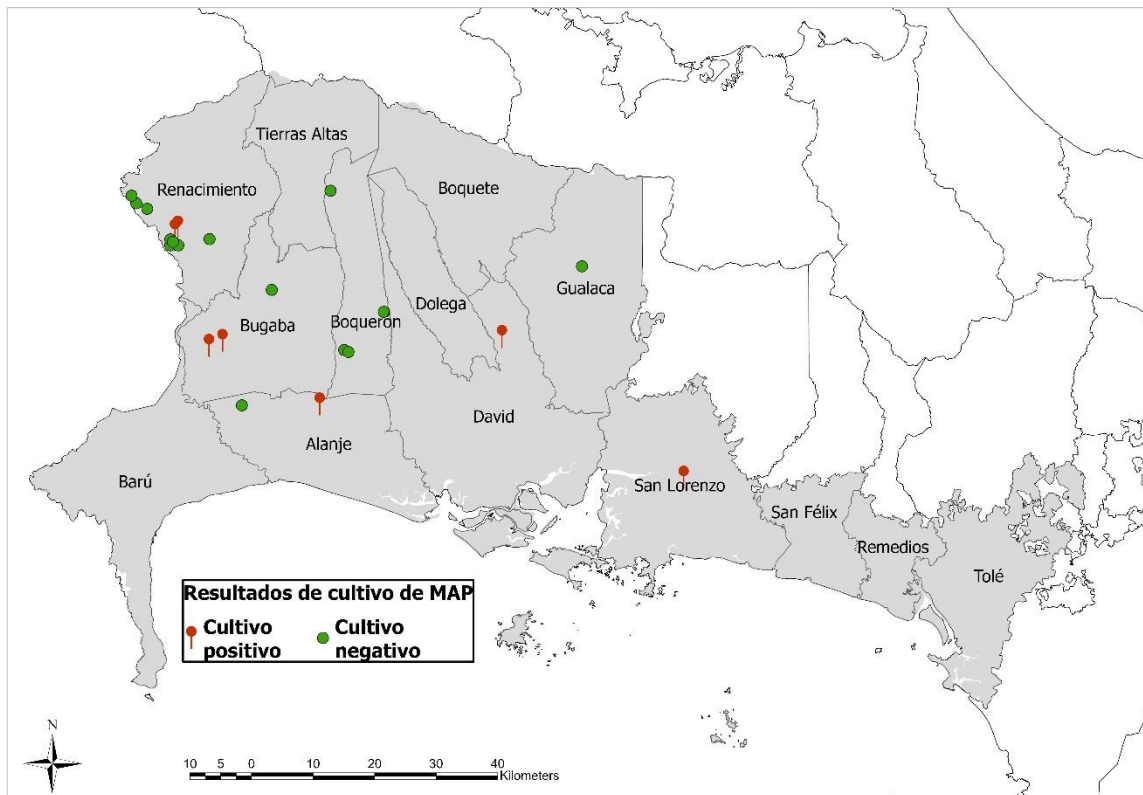


Figura 13. Distribución geográfica de 23 fincas analizadas según resultados de cultivo de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en la provincia de Chiriquí.

4.8 Detección de MAP por PCR directo en muestras de heces

La evaluación por PCR directo permitió detectar ADN de MAP en el 43.5% (10/23) de las fincas analizadas (Figura 14). El cultivo permitió separar las 23 fincas en 7 fincas positivas y 16 fincas negativas. Basado en esto resultados comparamos los resultados de PCR directo. Las fincas positivas por PCR directo estaban en los distritos de Renacimiento, Bugaba, Boquerón, Alanje, David y San Lorenzo (Figura 15). En total se detectó ADN-MAP en el 3% (14/462) de las muestras fecales analizadas. El mayor porcentaje de muestras positivas por PCR directo (4.2%) se detectó en las fincas con cultivo con cultivo positivo y un menor porcentaje (1.5%) en las fincas con cultivo negativo (Tabla 14). La media de BAAR/campo también fue mayor en fincas con cultivo positivo (0.12 BAAR/campo) que en las fincas con cultivo negativo (0.4 BAAR/campo).

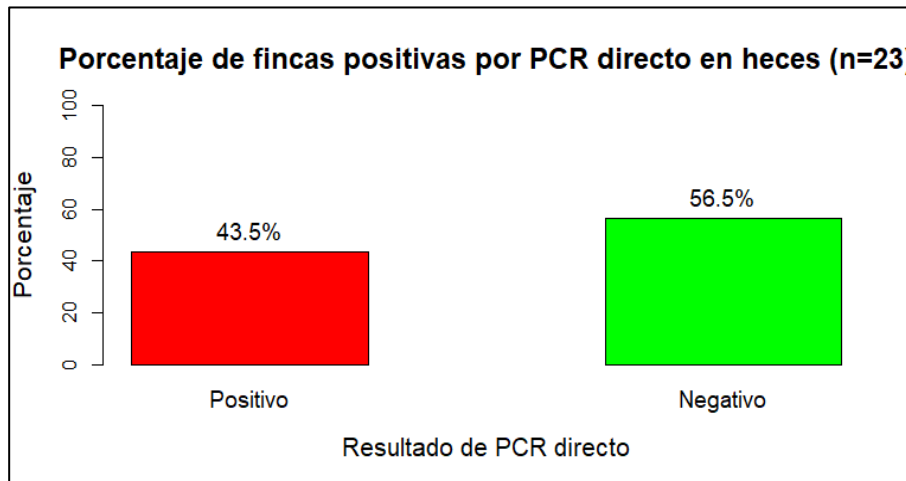


Figura 14. Porcentaje de fincas positivas por PCR directo en muestras de heces.

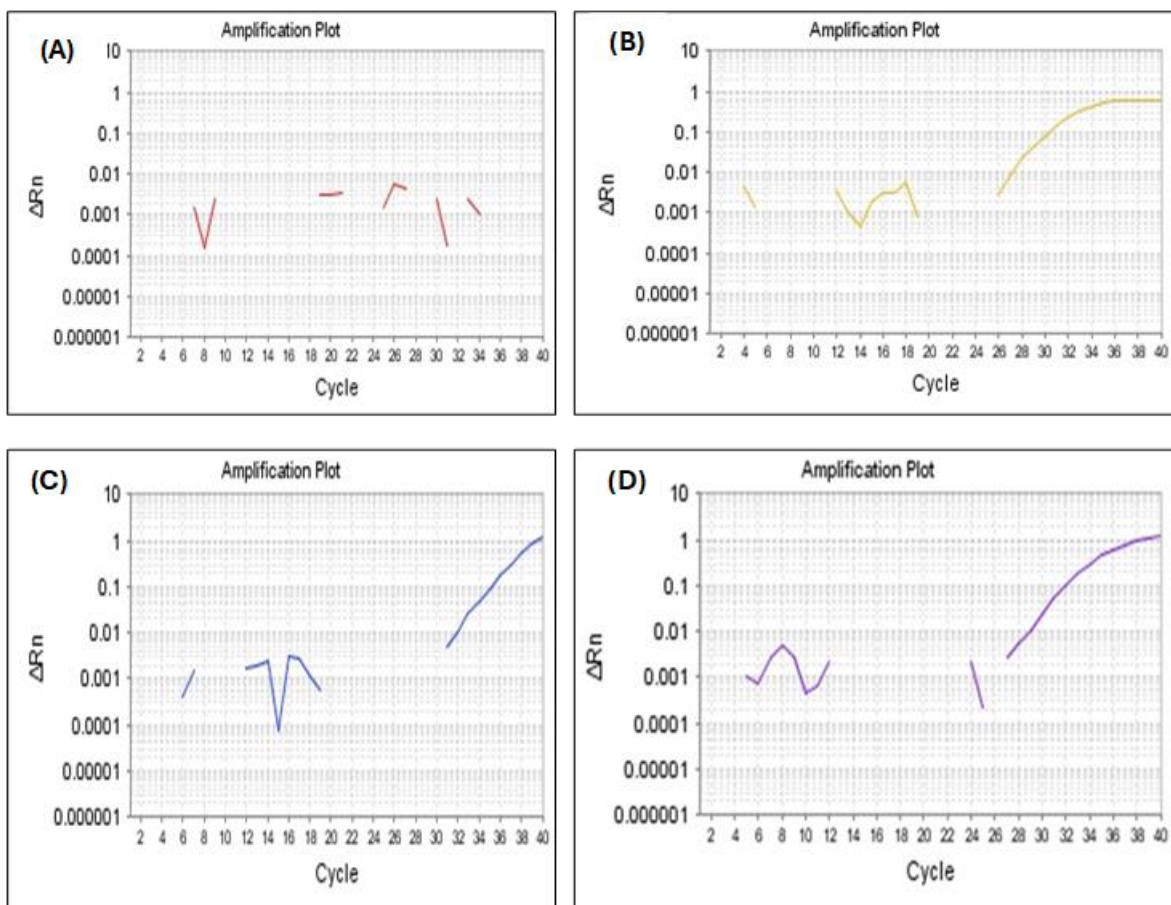


Figura 15. Curva de amplificación por PCR en tiempo real de la secuencia de inserción IS900 (IS900-qPCR) para detección de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. (A). Control negativo. (B). Amplificación de control positivo cepa MAP tipo C (Ct: 28). (C). Detección de IS900 por PCR directo en muestras de heces (Ct: 32). (D). Detección de IS900 en cultivo líquido de muestras de heces (Ct: 32).

Tabla 14. Comparación de resultados de ZN y PCR directo en muestras fecales de fincas con cultivo positivo y negativo.

			Análisis directo		
Tipo de muestra	Estatus de cultivo	N° de fincas	ZN%	\bar{X} BAAR/campo	PCR % (+/total)
Heces	Positivo	7	12% (34/262)	0.12	4.2% (11/262)
	Negativo	16	18% (37/200)	0.4	1.5% (3/200)
Total		23	15% (71/462)	0.26	3% (14/462)

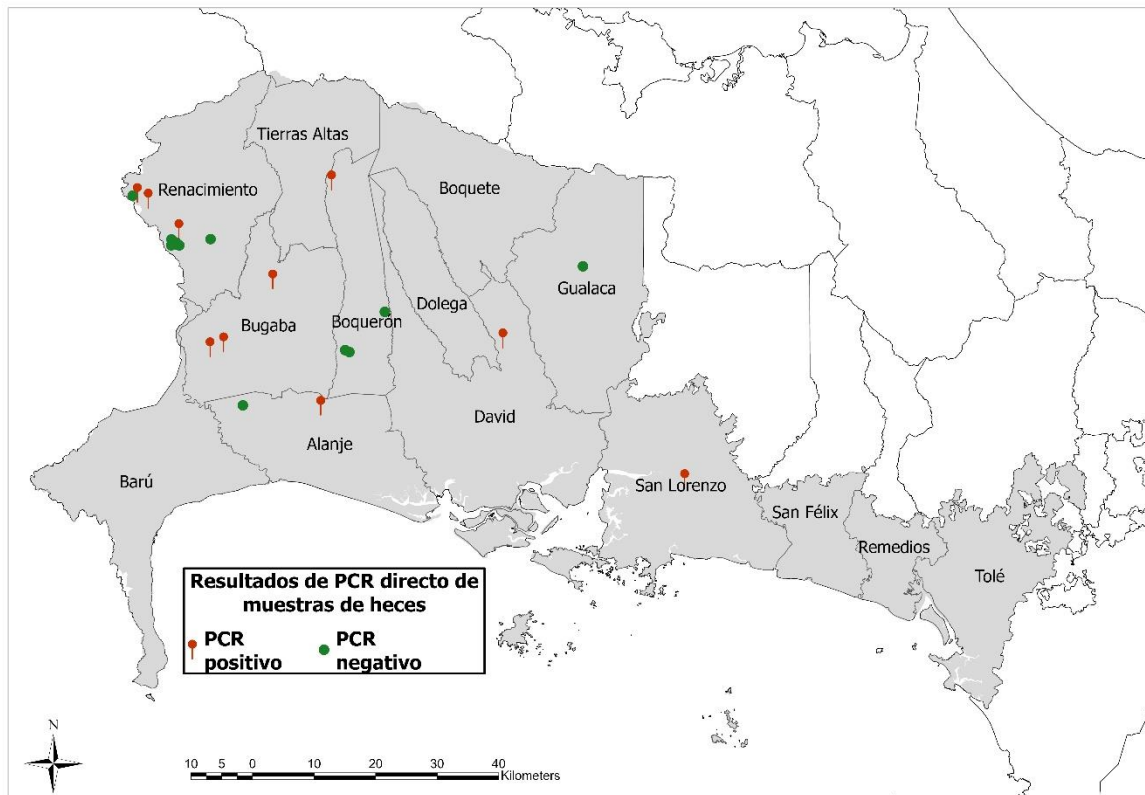


Figura 16. Distribución geográfica de 23 fincas analizadas según resultados de PCR directo de muestras de heces para detección de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en la provincia de Chiriquí.

4.9 Comparación del desempeño de cultivo líquido y PCR directo para la detección de MAP a nivel de finca

Las fincas analizadas en este estudio se clasificaron como positiva si al menos un animal fue positivo por cultivo o PCR directo de las muestras de heces. El 30% (7/23) de las fincas evaluadas fue positiva por cultivo mientras que el 43% (10/23) fue positiva por PCR directo de muestras de heces. El 85% (6/7) de las fincas positivas por cultivo también fue positiva por PCR directo (Tabla 15).

Tabla 15. Relación entre resultados de cultivo líquido y PCR directo en 23 fincas.

Tabla de contingencia de resultados de cultivo y PCR directo a nivel de finca			
Cultivo	PCR directo		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	6 (85.7%)	1 (14.3%)	7 (100%)
Negativo	4 (25%)	12 (75%)	16 (100%)
Total	10 (43.5%)	13 (56.5%)	23 (100%)

4.10 Comparación del desempeño de cultivo líquido de MAP y PCR directo aplicado a muestras de heces

Hubo diferencias en los resultados de detección de MAP en muestras de heces por cultivo y PCR directo (Tabla 16A). La concordancia entre las dos pruebas fue pobre, dado el índice Kappa calculado que fue de 0.05 (IC 95%) (Tabla 16B). El valor predictivo positivo (VPP) y negativo (VPN) calculado para el cultivo en comparación con el PCR directo fue de 8.3% y 97.1% respectivamente (Tabla 16B).

Tabla 16. Análisis de la prueba de Kappa entre los resultados obtenidos por cultivo y PCR directo a nivel de animales (n=462).

A Tabla de contingencia de resultados de cultivo y PCR directo a nivel de animales.

Cultivo	PCR directo		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	1	11	12
Negativo	13	437	450
Total	14	448	462

B Resultados de evaluación de desempeño de cultivo y PCR directo a nivel de animales.

	Índices
Kappa (IC 95%)	0.05
p	0.278
VPP	8.3 %
VPN	97.1 %

4.11 Comparación del desempeño de cultivo líquido de MAP y resultados de ZN directo aplicado a muestras de heces

El cultivo en medio líquido M7H9C permitió aislar MAP en el 3% (12/462) de las muestras de heces cultivadas. De las 12 muestras donde se confirmó aislamiento de MAP el 41% (5/12) fue positiva por ZN directo (Tabla 17A). Los resultados de cultivo bacteriológico y ZN directo aplicado a 462 muestras de heces mostraron una concordancia pobre con un índice Kappa de 0.08 (IC 95%). El valor predictivo positivo (VPP) y negativo (VPN) fueron de 41.7% y 85.3% respectivamente (Tabla 17B).

Tabla 17. Análisis de la prueba de Kappa entre los resultados obtenidos por cultivo y PCR directo a nivel de animales (n=462).

A Tabla de contingencia de resultados de cultivo en medio líquido y ZN directo a nivel de animales.

Cultivo	ZN directo		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	5	7	12
Negativo	66	384	450
Total	71	391	462

B Resultados de evaluación de desempeño de cultivo en medio líquido y ZN directo a nivel de animales.

	Índices
Kappa (IC 95%)	0.08
p	0.01
VPP	41.7%
VPN	85.3%

4.12 Comparación de resultados de cultivo líquido de MAP y conteo de BAAR en muestras directas de heces

El cultivo en medio líquido M7H9C detectó MAP en 3% (12/462) de las muestras fecales cultivadas. En promedio las muestras positivas por cultivo tuvieron 0.37 BAAR/campo (0.37 ± 1.07) en 100 campos observados. En el 15% (66/450) de las muestras con cultivo negativo se observó BAAR y tuvieron en promedio 0.05 BAAR/campo (0.05 ± 0.34) en 100 campos observados. Hubo diferencia significativa ($p = <0.01$) entre la carga de BAAR/campo entre las muestras que fueron cultivo positivo y las muestras con cultivo negativo (Figura 17).

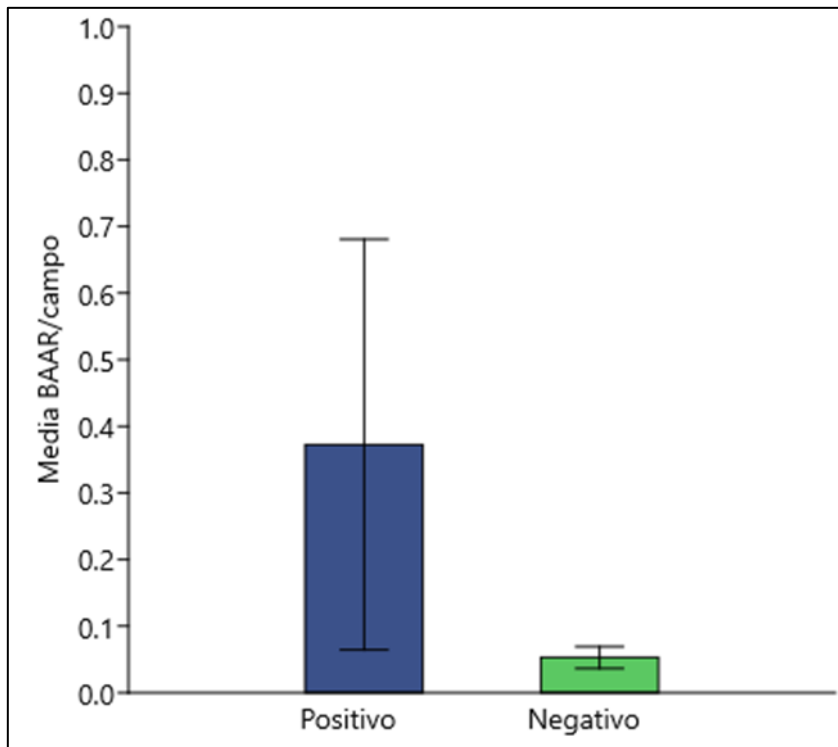


Figura 17. Comparación de la carga bacilar determinada por el conteo promedio de BAAR/campo. Muestras positivas por cultivo de MAP = 0.37 BAAR/campo. Muestras negativas por cultivo de MAP = 0.05 BAAR/campo. U de Mann-Whitney ($p = <0.01$).

4.13 Cultivo de MAP a partir de muestras de agua

En total se recolectaron 44 muestras de agua donde el 65% (29/44) de las muestras se tomaron a partir de bebederos. El 27% (12/44) se tomaron a partir de quebradas, según indicaciones de los productores, eran la fuente de agua directa de los animales y el 6.8% (3/44) fueron muestras de agua de escorrentía, que se tomaron según la disponibilidad y justo después de la limpieza del área de ordeño. Se observó crecimiento en cultivo líquido en el 23% (10/44) de las muestras de agua y en los 3 sitios de muestreo. El promedio ponderado de cúmulos de BAAR/campo observado en las 10 muestras de agua con crecimiento fue de 6.9 cúmulos de BAAR/campo (6.9 ± 6.1) en 100 campos observados (Tabla 18). En el medio de cultivo sólido hubo crecimiento en el 7% (2/29) de las muestras tomadas en bebederos y en 33% (1/3) de las muestras de aguas de escorrentía (Figura 10) Se confirmó MAP en medio líquido en el 8.3% (1/12) de las muestras de quebradas y en medio sólido en 3.4% (1/29) de muestras de bebedero (Tabla 18). Las muestras de agua donde se aisló MAP pertenecían a las fincas F1 (Bugaba) y F14 (Renacimiento), ambas fueron también positivas por cultivo de heces.

Tabla 18. Evaluación de cultivo de muestras de agua para la detección de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

Muestra	Sitio de muestreo	n	Análisis de cultivo				
			Líquido			Sólido	
			ZN% (+/total)	\bar{X} BAAR/campo	PCR Confirmado	ZN% (+/total)	PCR Confirmado
	Quebrada	12	8.3% (1/12)	11.5	8.3% (1/12)	0% (0/12)	0% (0/12)
Agua	Bebederos	29	28% (8/29)	6.1	0% (0/29)	7% (2/29)	3.4% (1/29)
	Agua de escorrentía (lixiviados)	3	33% (1/3)	9.5	0% (0/3)	33% (1/3)	0% (0/1)
Total		44	23% (10/44)	6.9	2.2% (1/44)	7% (3/44)	2.2% (1/44)

4.14 Evaluación directa de muestras de agua por ZN y PCR para detección de MAP

Los resultados por sitio de muestreo, así como, del total de muestras se muestran en la tabla 19. En el análisis directo con ZN se observó BAAR el 23% (10/44) de las muestras de agua y en los 3 sitios de muestreo. El promedio de BAAR observado por sitio de muestreo y el promedio ponderado para las 10 muestras positivas por ZN directo fue de 0.7 BAAR/campo (0.7 ± 1.4) en 100 campos observados se muestran en la tabla 14. Se detectó ADN-MAP en el 18% (8/44) de las muestras de agua analizadas. En las muestras tomadas de quebradas se detectó ADN-MAP en 25% (3/12), mientras que en muestras de agua de bebederos se detectó ADN-MAP en 17% (5/29). No se detectó ADN-MAP en muestras de agua de escorrentía (Tabla 14). Las muestras de agua positivas por PCR directo se encontraron en las fincas F1, F2, F3, F4 y F20 (Tabla 21).

Tabla 19. Resultados de análisis directo por ZN y PCR de muestras de agua para detección de MAP

Muestra	Sitio de muestreo	n	Análisis directo		
			ZN % (+/total)	\bar{X} BAAR/campo	PCR-MAP% (+/total)
Agua	Quebrada	12	25% (3/12)	0.07	25% (3/12)
	Bebederos	29	14% (4/29)	0.12	17% (5/29)
	Agua de escorrentía (lixiviados)	3	100% (3/3)	2.3	0% (0/3)
Total		44	23% (10/44)	0.7	18% (8/44)

4.15 Cultivo de MAP a partir de muestras de suelo

Se cultivaron 40 muestras de suelo en medio líquido M7H9C y medio sólido 7H9-OP. El 40% (16/40) fueron tomadas en sala de ordeño, el 27% (11/40) tomadas en corrales, el 17% (7/40) fueron tomadas en pasillo hacia sala de ordeño, el 10% (4/40) en zonas de escorrentía y el 5% (2/40) se tomó en área de brete. En total hubo crecimiento en 5% (2/40) de las muestras de suelo cultivadas. En promedio las dos muestras con crecimiento tuvieron 10.5 cúmulos BAAR/campo (10.5 ± 13.2). Se confirmó MAP en cultivo líquido en la muestra con crecimiento proveniente del área de brete (Tabla 20). Esta muestra de suelo fue tomada en la finca F9, que también fue positiva por cultivo y PCR directo de heces (Tabla 21). No hubo crecimiento en medio sólido de las muestras de suelo cultivadas.

Tabla 20. Evaluación de cultivo de muestras de suelo para la detección de MAP

Muestra	Sitio de muestreo	n	Análisis de cultivo				
			Líquido			Sólido	
			ZN% (+/total)	\bar{X} BAAR/campo	PCR confirmado	ZN% (+/total)	PCR confirmado
Suelo	Sala de ordeño	16	0	0	0	0	0
	Corrales	11	0	0	0	0	0
	Pasillo hacia sala de ordeño	7	14% (1/7)	19.8	0	0	0
	Zona de escorrentía	4	0	0	0	0	0
	Brete	2	50% (1/2)	1.1	50% (1/2)	0	0
Total		40	5% (2/40)	10.5	2.5% (1/40)	0	0

Tabla 21. Resultado de cultivo y PCR directo aplicado muestras de heces, suelo y agua para detección de MAP en 23 fincas ganaderas en la provincia de Chiriquí.

Finca	Muestra de heces		Muestra de agua		Muestra de suelo		
	Cultivo	PCR directo	Cultivo	PCR directo	Cultivo	PCR directo	
F1	+	+	+	+	-	-	
F2	-	+	-	+	-	-	
F3	+	+	-	+	-	-	
F4	+	+	-	+	-	-	
F5	-	+	-	-	-	-	
F6	-	-	-	-	-	-	
F7	-	-	-	-	-	-	
F8	+	+	-	-	-	-	
F9	+	+	-	-	+	-	
F10	-	-	-	-	-	-	
F11	-	-	-	-	-	-	
F12	-	-	-	-	-	-	
F13	-	-	-	-	-	-	
F14	+	+	+	-	-	-	
F15	-	-	-	-	-	-	
F16	-	-	-	-	-	-	
F17	+	-	-	-	-	-	
F18	-	-	-	-	-	-	
F19	-	-	-	-	-	-	
F20	-	+	-	+	-	-	
F21	-	+	-	-	-	-	
F22	-	-	-	-	-	-	
F23	-	-	-	-	-	-	
Total	23	30% (7/23)	43% (10/23)	9% (2/23)	22% (5/23)	4% (1/23)	0%

4.16 Desempeño de cebadores utilizados para la detección de MAP

Se comparó el desempeño de los cebadores IS900, F57, ISMav-2 y Locus 255 para confirmar el crecimiento de MAP en medio de cultivo líquido. El 13% (62/462) de las muestras de heces cultivadas mostró crecimiento BAAR en el medio líquido M7H9C luego de 6 semanas de incubación. En promedio se observó 6.7 ± 10.9 cúmulos BAAR/campo. Se confirmó MAP en el 19% (12/62) de las muestras con crecimiento utilizando el cebador IS900. Los cebadores F57 y Locus 255 tuvieron un porcentaje de detección de 2% (1/62) cada uno (Tabla 22). Mediante la prueba exacta de Fisher se observó que la diferencia en los porcentajes de detección de los cebadores IS900, F57 y Locus 255 fue estadísticamente significativa ($p < 0.001$). El cebador ISMav-2 utilizado en este estudio no detectó ADN-MAP en las 62 muestras evaluadas. Las muestras positivas por F57 y por Locus 255 también fueron positivas por IS900. Los resultados individuales de cada finca se muestran en la tabla 22.

Tabla 22. Desempeño de cebadores específicos para la detección de MAP en 62 muestras de cultivo en medio líquido.

Finca	n	Muestras con crecimiento	\bar{X} Cúmulos BAAR/campo	PCR punto final				
				IS900	F57	ISMav-2	Locus 255	
F1	26	27% (7/26)	2.7	57% (4/7)	0% (0/7)	0% (0/7)	14% (1/7)	
F2	16	18% (3/16)	21 ± 15	0% (0/3)	0% (0/3)	0% (0/3)	0% (0/3)	
F3	48	12% (6/48)	22 ± 23	33% (2/6)	17% (1/6)	0% (0/6)	0% (0/6)	
F4	17	41% (7/17)	8.4 ± 6.0	14% (1/7)	0% (0/7)	0% (0/7)	0% (0/7)	
F5	31	6% (2/31)	20.5 ± 7.7	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	
F6	23	0	0	NA	NA	NA	NA	
F7	14	0	0	NA	NA	NA	NA	
F8	71	3% (2/71)	4.4 ± 1.5	100% (2/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	
F9	65	22% (14/65)	3.1 ± 3.4	7.1% (1/14)	0% (0/14)	0% (0/14)	0% (0/14)	
F10	20	15% (3/20)	3.4 ± 1.7	0% (0/3)	0% (0/3)	0% (0/3)	0% (0/3)	
F11	40	17% (7/40)	0.2 ± 0.1	0% (0/7)	0% (0/7)	0% (0/7)	0% (0/7)	
F12	11	9% (1/11)	0.04	0% (0/1)	0% (0/1)	0% (0/1)	0% (0/1)	
F13	6	0	0	NA	NA	NA	NA	
F14	30	7% (2/30)	0.04 ± 0.02	50% (1/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	
F15	9	0	0	NA	NA	NA	NA	
F16	6	0	0	NA	NA	NA	NA	
F17	5	40% (2/5)	4.1 ± 3.6	50% (1/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	
F18	1	0	0	NA	NA	NA	NA	
F19	2	50% (1/2)	4.3	0% (0/1)	0% (0/1)	0% (0/1)	0% (0/1)	
F20	5	0	0	NA	NA	NA	NA	
F21	6	50% (3/6)	0.9	0% (0/3)	0% (0/3)	0% (0/3)	0% (0/3)	
F22	5	20% (1/5)	0.62	0% (0/1)	0% (0/1)	0% (0/1)	0% (0/1)	
F23	5	20% (1/5)	19.38	0% (0/1)	0% (0/1)	0% (0/1)	0% (0/1)	
Total	23	462	13% (62/462)	6.7 ± 10.9	19% (12/62)	2% (1/62)	0% (0/62)	2% (1/62)

4.17 Resultados de cuestionario

El cuestionario para la recolección de datos sobre las características de las fincas y prácticas de manejo se aplicó en entrevistas con los productores de las 23 fincas evaluadas. El análisis de la información recolectada en función del estado de cultivo de MAP permitió observar que el tamaño promedio del hato en fincas positivas (7) fue mayor con 97 ± 103 , mientras que en las fincas con cultivo negativo (16) que tuvieron un tamaño promedio de hato de 55 ± 42 (Figura 18). La diferencia del tamaño del hato entre fincas positivas y negativas no fue estadísticamente significativa según la prueba U de Mann-Whitney ($p > 0.05$).

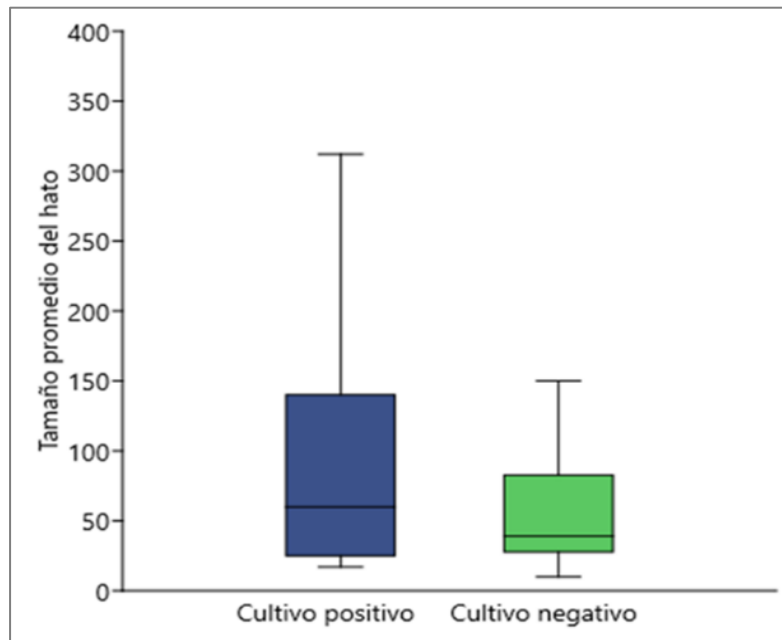


Figura 18. Tamaño promedio del hato en fincas positivas y negativas por cultivo de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Fincas con cultivo positivo (97 ± 103). Fincas con cultivo negativo (55 ± 42). U de Mann-Whitney ($p > 0.05$).

Se recolectó datos de producción de leche y se estimó un promedio de producción (L/leche/día/vaca) en base al número de animales en ordeño y se comparó la producción entre fincas con cultivo positivo y cultivo negativo para MAP. El promedio de producción de las fincas con cultivo positivo fue de 4.6 ± 2.5 L/leche/día/vaca, mientras que en las fincas con cultivo de MAP negativo fue de 8.3 ± 5.8 L/leche/día/vaca (Figura 19). La prueba U de Mann-Whitney determinó la diferencia en producción entre fincas con cultivo positivo y negativo de MAP no fue estadísticamente significativa ($p=0.07$).

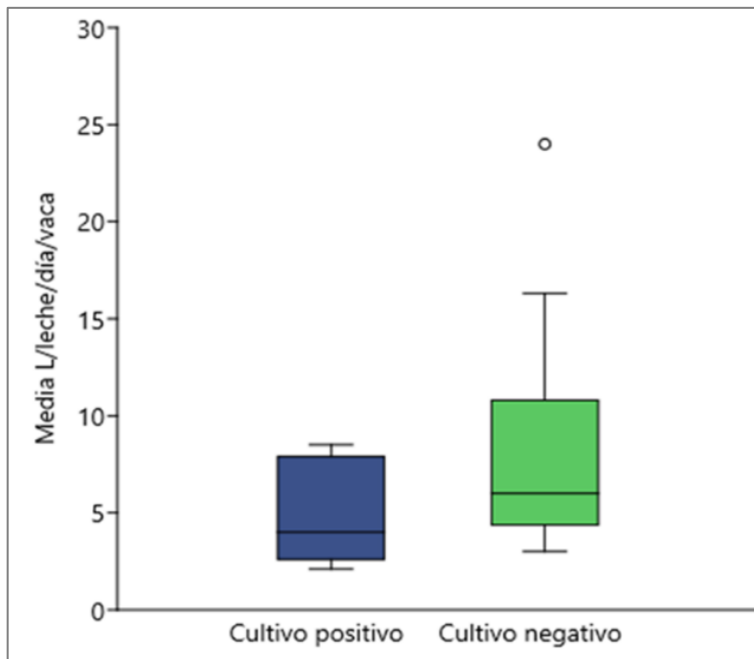


Figura 19. Media de la producción de leche (L/leche/día/vaca) en fincas positivas y negativas por cultivo de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Fincas con cultivo positivo de MAP (4.6 ± 2.5) L/leche/día/vaca. Fincas con cultivo de MAP negativo (8.3 ± 5.8) L/leche/día/vaca. U de Mann-Whitney ($p>0.05$).

4.17.1 Prácticas de manejo en fincas con cultivo positivo

Las fincas fueron clasificadas como positivas si al menos un animal resultó positivo en la prueba de cultivo, así, se identificaron siete fincas en esta categoría (F1, F3, F4, F8, F9, F14, F17). La frecuencia de respuestas de las fincas con cultivo positivo en contraste con las fincas con cultivo negativo se muestra en la tabla 18. El 71% (5/7) de las fincas con cultivo positivo realizaban la compra de animales. El 42% (3/7) aplicaba cuarentena a los animales nuevos y realizaban pruebas de laboratorio (Tabla 23). No se reportó presencia de otros rumiantes como cabras u ovejas en las fincas participantes. Respecto al alquiler de pastos, ninguna de las fincas positivas informó alquilar pastos para sus animales; sin embargo, una de ellas (F9) reportó alquilar sus pastos para animales de otras fincas. En esta finca, se detectó la presencia de MAP tanto en animales como en una de sus muestras de suelo (Tabla 21).

El 71% (5/7) de las fincas con cultivo positivo alojó a terneros con la madre después del parto y también utilizaba estiércol para fertilizar pastos sin realizar un tratamiento previo. El 57% (4/7) de fincas con cultivo positivo utilizaba leche de descarte para alimentar terneros. El 42% (3/7) de fincas positivas utilizaba transporte para transportar estiércol, de las cuales el 66% (2/3) utilizaba vehículos alquilados. Mediante el análisis de Chi-cuadrado y la prueba exacta de Fisher se encontró que la movilización de estiércol en camiones compartidos estaba significativamente ($p=0.02$) asociado con el estado de infección de las fincas (Tabla 24). El 71% (5/7) de las fincas positivas indicó haber tenido presencia de animales con diarrea y pérdida de peso al momento del muestreo y el 57% (4/7) reportó disminución en la producción de leche (Tabla 25).

Tabla 23. Respuestas afirmativas a preguntas relacionadas con el manejo de las 23 fincas lecheras evaluadas en la provincia de Chiriquí.

Factores evaluados	16 fincas negativas por cultivo	7 Fincas positivas por cultivo	p
	N° Respuestas afirmativas (%)	N° Respuestas afirmativas (%)	
Asistencia veterinaria	13 (81)	4 (80)	0.599
Compra de animales	7 (43)	5 (71)	0.221
Aplica cuarentena a animales nuevos	2 (12)	0 (0)	0.104
Realiza pruebas de laboratorio a los animales nuevos	2 (12)	3 (42)	0.104
Alquila sus pastos para animales de otras fincas	4 (25)	1 (14)	0.317
Alquila pastos de otras fincas para sus animales	2 (12)	0 (0)	0.328
Los terneros permanecen con sus madres después del parto	10 (62)	5 (71)	0.679
Separa los terneros de bovinos adultos	8 (50)	2 (28)	0.752
Utiliza estiércol para fertilizar pastos	5 (31)	5 (71)	0.074
El estiércol recibe tratamiento antes de usar	2 (12.5)	0 (0)	0.104

Tabla 24: Resultados de preguntas relacionadas al manejo de estiércol, movimiento de animales y personal dentro de las fincas.

Factores evaluados	16 fincas negativas por cultivo	7 Fincas positivas por cultivo	p
	N° Respuestas afirmativas (%)	N° Respuestas afirmativas (%)	
Utiliza leche de descarte para alimentar terneros	4 (25)	2 (29)	0.136
Retira las camas de estiércol	9 (56)	6 (85)	0.172
Cuenta con tinas para tratamiento de aguas residuales	4 (25)	2 (28)	0.858
Utiliza vehículo para el transporte de animales	14 (87.5)	7 (100)	0.136
Propio o alquilado	Propio 7(50)	4 (57)	0.554
	Alquilado 7(50%)	3 (42)	0.968
Utiliza vehículos para transporte de estiércol	3 (18)	3 (42)	0.226
Propio o alquilado	Propio 3(100)	1 (33)	0.122
	Alquilado (0)	2 (66)	0.025
Utiliza vehículos para el transporte de alimentos	14 (87.5)	7 (100)	0.328
Propio o alquilado	Propio 8(57)	6 (85)	0.106
	Alquilado 6(42)	1 (14)	0.266
El o los vehículos utilizados son limpiados y desinfectados después de su uso	10 (62)	5 (100)	0.059
Existen empleados externos que puedan trabajar en otra finca ganadera	4 (25)	2 (28)	0.858
Usan los empleados ropa de protección exclusiva para la finca	1 (6)	1 (14)	0.529

Tabla 25. Resultado de preguntas relacionadas a manifestaciones de la enfermedad

Pregunta	16 fincas negativas por cultivo	7 Fincas positivas por cultivo	p
	N° Respuestas afirmativas (%)	N° Respuestas afirmativas (%)	
Presencia de animales con diarrea	7 (43)	5 (71)	0.221
Observa pérdida de peso progresivo sin pérdida de apetito	10 (62)	5 (71)	0.679
Percibe reducción en la producción de leche	8 (50)	4 (57)	0.752

CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (MAP) es un patógeno importante desde el punto de vista productivo como para la salud pública. Es el agente causal de la paratuberculosis bovina. Una infección que se encuentra diseminada principalmente en las explotaciones ganaderas dedicadas a la producción de leche. La prevalencia de animales infectados, infecciosos y afectados por MAP dentro de las fincas representa un importante impacto económico negativo. En los últimos años se ha discutido el papel que juega en el desarrollo de colitis ulcerosa en humanos conocida como la enfermedad de Crohn. Las similitudes entre las lesiones y el aislamiento de algún caso de EC lleva a pensar en alguna relación entre MAP y esta enfermedad.

Actualmente para el diagnóstico y detección de MAP existen disponibles pruebas serológicas y se han desarrollado técnicas moleculares altamente sensibles para la detección de MAP. El cultivo sigue siendo considerado el estándar de oro para la detección de MAP. Las ventajas del cultivo sobre las otras técnicas es que permite determinar la presencia de MAP viable. El cultivo a diferencia de las otras técnicas de diagnóstico permite la detección de MAP viable tanto en animales como en muestras ambientales y a obtención de colonias para estudios genómicos para conocer el origen y distribución de MAP en un área de estudio determinado.

El cultivo de MAP se realiza en medios de cultivo selectivos para micobacterias. Sin embargo, una de las limitantes de la técnica de cultivo es el periodo de incubación necesario para que se produzca crecimiento de colonias. El tiempo de incubación en los medios de cultivo utilizados actualmente va desde 8 hasta 16 semanas para observar desarrollo de colonias. Esto conlleva a un tiempo extendido hasta la espera de resultados confirmatorios mediante cultivo.

Las investigaciones que buscan optimizar el proceso de cultivo de MAP sugieren el uso de caldos enriquecidos para un aislamiento más rápido. El cultivo en medio líquido puede tomar de 6 a 8 semanas (Sweeney et al., 2012). El medio M7H9C requiere entre seis a doce semanas de incubación (Whittington et al., 2013). Schwalm et al en 2018, reportaron cultivos positivos a la sexta semana de incubación.

El presente estudio alcanzó la estandarización del cultivo de MAP en las condiciones del país. También se evaluaron dos medios de cultivo líquidos M7H9C y Middlebrook 7H9 con adición de ADC y Micobactina J. También se evaluaron tres medios de cultivo sólidos reportados en la literatura para el crecimiento de MAP. Se utilizó una cepa MAP de referencia identificada como tipo C por PCR específico (Hernández-Reyes et al., 2022). Esta cepa es la más predominante en el ganado bovino a nivel mundial.

En el presente estudio, para el aislamiento de MAP, los medios de cultivo líquidos basados en 7H9 demostraron ser más sensibles que los medios de cultivo sólido. Con la evaluación de medios de cultivo para el crecimiento de MAP se buscaba identificar a los medios de cultivo que permitiesen un crecimiento más rápido. Esto permitiría en el contexto clínico, una detección temprana de animales infectados que diseminan MAP viable en las heces. La evaluación semanal del crecimiento de MAP los medios líquidos permitió identificar un mejor crecimiento de MAP en el medio M7H9C.

El punto máximo de crecimiento de en este medio se alcanzó a las seis semanas de incubación encontrándose diferencia significativa en el crecimiento con en el medio A7H9J. Estos resultados concuerdan con estudios que evidencian el efecto positivo de la adición de yema de huevo a los medios de cultivo (Harris et al., 2005). Este tiempo de incubación fue reportado en otros estudios donde. En otro estudio donde se ha implementado este medio líquido, se ha logrado el aislamiento exitoso de MAP con un tiempo de incubación similar (Schwalm et al., 2019).

Esta primera evaluación de medios de cultivo de MAP en Panamá permitió comprobar que la tasa de crecimiento de MAP depende directamente de la formulación del medio de cultivo. Por lo que, podemos concluir que la adición de yema de huevo al medio 7H9 influye positivamente en el crecimiento de MAP.

Los medios de cultivo sólidos para MAP tienen la ventaja que permiten observar el crecimiento de las colonias, permite la diferenciación entre cepas dependiendo de

su morfología o color. Dependiendo de la cepa, se puede cultivar MAP diversos medios de cultivo sólidos, los más utilizados son el Agar Yema de huevo de Herrold (HEYM), el medio Löwenstein Jensen (LJ) y Middlebrook (7H10 y 7H11). Es decir, las cepas tipo S crecen mejor en medio LJ mientras que las cepas tipo C crecen mejor en HEYM y en agares Middlebrook.

Debido a la lenta tasa de crecimiento de MAP y es necesario evaluar métodos más rápidos de cultivo. En este estudio evaluamos una nueva fórmula de cultivo sólido basada en Middlebrook 7H9 al cual denominamos 7H9-OP en este estudio (Dane et al., 2022). Este medio fue ensayado con cepas MAP de referencia y no hay datos previos a este estudio de su capacidad de detectar MAP a partir de muestras clínicas. Al medio se le adicionó PANTA (Polimixina B, Anfotericina B, Ácido Nalidíxico, Trimetoprima y Azlocilina) como agentes antimicrobianos.

La evaluación del crecimiento de MAP en los medios HEYM, 7H11 y 7H9-OP durante ocho semanas permitió observar que un crecimiento temprano de colonias en el medio 7H9-OP a partir de la tercera semana de incubación. Es inusual observar desarrollo de colonias MAP en un tiempo de incubación tan corto. El medio de cultivo de uso más extendido, el HEYM requiere como mínimo ocho semanas de incubación (de Moraes Pereira et al., 2020; Ristow et al., 2006). Estos estudios también han confirmado la dependencia de la cepa en función del medio de cultivo.

Los medios basados en Middlebrook permiten el crecimiento de las cepas S y C de MAP. Debido a esto se consideró al medio 7H9-OP como una buena opción a probar. El medio 7H9-OP a diferencia de los otros medios evaluados, incorpora el uso de Tween 80. El uso de Tween tienen efecto dependiente de la concentración sobre la pared celular de MAP y la morfología de las colonias (Van Boxtel et al., 1990a). En el medio de cultivo 7H9-OP se incorporó Tween 80 a una concentración de 1.0%. Esta concentración en combinación con yema de huevo al 10% es benéfica para el crecimiento de MAP (Dane et al., 2022).

Las colonias cultivadas en 7H9-OP fueron pequeñas, color crema y una morfología lisa. Esta morfología es atribuible a la adición de Tween 80 en los medios de cultivo (Van Boxtel et al., 1990). En este estudio, se estableció un periodo máximo de

incubación de ocho semanas para evaluar la capacidad del medio 7H9-OP para promover el crecimiento temprano de colonias. El medio 7H9-OP permitió el desarrollo y confirmación de MAP en solo tres semanas, aunque solo se observó una colonia por muestra confirmada. La tasa de crecimiento depende de la carga bacilar que los animales se encuentren liberando en el momento del muestreo.

Estudios previos sugieren que la presencia de Tween 80 incrementa la permeabilidad celular en bacterias del complejo *Mycobacterium avium* (Naik et al., 1988), y está relacionado con la susceptibilidad de MAP a antimicrobianos como la penicilina G y la ciprofloxacina en presencia de Tween 80 (Van Boxtel et al., 1990). Cabe destacar que dos de los antibióticos presentes en la formulación PANTA, la azlocilina y ácido nalidíxico pertenecen a las mismas familias que la penicilina G (Penicilinas) y la ciprofloxacina (quinolonas) respectivamente. Esto pudo haber tenido un efecto en el desarrollo de colonias en este medio de cultivo.

Las técnicas de diagnóstico de MAP varían en cuanto a sensibilidad y especificidad. Esto se vio reflejado en la baja concordancia en la detección vista entre la detección de BAAR por ZN directo y ADN-MAP por PCR en muestras de heces. La técnica de ZN permite identificar la presencia bacilos ácido-alcohol resistentes, sin embargo, es posible la tinción de otras micobacterias no MAP. Por la gran biodiversidad presente en muestras ambientales como las que evaluamos, es posible que otras micobacterias no MAP estuviesen presentes en las muestras. A pesar de considerarse una técnica con baja sensibilidad (Zimmer et al., 1999) y altas probabilidades de obtener resultados falsos negativos y falsos positivos (Ris et al., 1988) es útil a la hora de reconocer muestras altamente sospechosas en función de la disposición de los bacilos en la muestra (Idris et al., 2022).

El tiempo de detección depende de la carga bacteriana en la muestra, es decir, a mayor carga menor tiempo de detección. Los animales con baja cantidad de MAP en heces requieren una incubación hasta 12 semanas (Whittington et al., 2013). En base a lo anterior se puede sugerir que en aquellas muestras que detectamos a la sexta semana de incubación, la carga bacteriana era suficientemente alta para

arrojar un resultado positivo. Esta detección temprana es crucial para identificar a los animales que diseminan altas cantidades de MAP en las fincas.

Como se describió anteriormente, MAP es una bacteria con una tasa de crecimiento extremadamente lento la cual también se ve influenciada por el medio de cultivo utilizado. Decidimos evaluar la detección de MAP en muestras clínicas y ambientales con los medios de cultivo que probamos permitían un crecimiento más rápido de MAP. El cultivo es una técnica de diagnóstico altamente sensible, se trata de medios de cultivo altamente enriquecidos y selectivos para micobacterias, lo que deja abierta la posibilidad que otras micobacterias no MAP se desarrollen primero, lo que interfiere directamente con el diagnóstico.

Se pudo confirmar MAP en los ambos medios de cultivo evaluados para muestras de heces y ambientales. La mayor cantidad de muestra se logró detectar con el medio de cultivo líquido M7H9C. En las dos técnicas de cultivo evaluadas se detectó MAP, sin embargo, hubo crecimiento de otras micobacterias no MAP en ambos medios de cultivo. Esto debido a que los medios de cultivo son selectivos para micobacterias, pero no permite el cultivo diferencial de MAP. La adición de micobactina a los medios de cultivo es para permitir el crecimiento de MAP, pero otras micobacterias pueden crecer estos medios. El cultivo de MAP aumenta la sensibilidad en animales en estados avanzados de la enfermedad.

La detección de MAP en medios sólido como el medio HEYM ampliamente en muchos países, se observa crecimiento de colonias luego de ocho a 12 semanas de incubación en tubos tapa rosca inclinados. Esto hace que el tiempo de diagnóstico sea considerablemente largo, periodo en que los animales infectados puedan estar diseminando la bacteria en las fincas. El medio sólido que evaluamos permitió el crecimiento de MAP en tan solo tres semanas, en contraste con el medio HEYM. El número de UFC en los medios fue menor de 10 UFC por plato de cultivo hasta las 8 semanas. El medio 7H9-OP se realizó en platos Petri, por lo que estuvo expuesto a una deshidratación más temprana, y pudo haber afectado la tasa de crecimiento. Aun así, se comprobó que MAP puede crecer en menos tiempo en este medio, en comparación con los otros medios sólidos disponibles.

Los animales evaluados por cultivo bacteriológico para MAP tradicionalmente se han clasificado como infectado o no infectado en función del crecimiento de colonias en medio de cultivo y se categorizan como bajos diseminadores si el crecimiento en medio sólido es menos de 10 UFC, diseminadores moderados si se observan de 10 a 50 UFC y en super diseminadores si se observan más de 50 UFC por tubo de muestra. Teniendo en cuenta esto podemos indicar que los animales identificados con crecimiento de MAP en medio sólido fueron animales con baja carga bacilar o bajos diseminadores, siendo que se observaron menos de 10 UFC por plato de cultivo. Una de las principales ventajas del cultivo de MAP es que permite la detección de MAP viable. En este sentido MAP puede estar presente en la muestra como se observó en los resultados de PCR directo, pero únicamente el cultivo permite determinar la presencia de bacterias viables.

El manejo y la distribución de las áreas de trabajo dentro de las fincas fue distinto entre ellas. Durante la visita se hizo una evaluación de las condiciones de las fincas y se identificaron posibles sitios y en base a la literatura que pudiesen ser posibles fuentes de infección. Es así de forma general en cada finca la toma de muestras de suelo contemplaba las áreas de sala de ordeño, áreas de concentración del ganado adulto, pasillos hacia la sala de ordeño, zonas adyacentes dónde hubiese evidencia de escorrentía y el área del brete de los animales utilizados para el ordeño o las vacunaciones y demás prácticas que impliquen inmovilizar ganado adulto. Se consideró la toma de muestras de agua de sitios que fuesen de acceso recurrente del ganado adulto. La detección de MAP en muestras de suelo dentro de las fincas depende de la prevalencia de animales infectados, así como, del estadio de infección de estos. En muestras de suelo no observamos BAAR en muestras directas y tampoco se detectó ADN. El cultivo detectó MAP viable en una muestra de suelo tomada en un área donde se suele concentrar el ganado adulto. Esta muestra de suelo con cultivo positivo se encontró en la finca 9, siendo esta la finca con más animales detectados con cultivo positivo, es decir fue la finca con más animales que liberaron MAP viable en las heces.

Por la supervivencia de MAP en el ambiente por largo tiempo se sospecha que podría estar presente en el agua dentro de las fincas, así como, moviéndose entre fincas a través de los ríos y quebradas y también llegando a los bebederos. MAP ha sobrevivido hasta por 17 meses en muestras de agua que fueron inoculadas con MAP. Esto apoya la hipótesis de que el agua sea una posible ruta de transmisión, a humanos y a animales. En las muestras de agua se detectó BAAR en todos los sitios y AND-MAP en las muestras tomadas de quebradas y bebederos. Pudimos detectar MAP viable en muestras de agua, comprobando que MAP puede estar moviéndose a través del agua entre las fincas que comparten ríos o quebradas.

Con los resultados obtenidos identificado que las prácticas de manejo ganadero deficiente promueven el ingreso y la prevalencia de MAP a las fincas. Principalmente por prácticas como la compra de animales, el uso de estiércol como fertilizante de los pastos, así como, mantener animales adultos y terneros en los mismos corrales. Entre las prácticas comunes realizadas por las fincas que detectamos como cultivo positivo se identificó a la compra de animales, al uso de estiércol y a mantener a animales jóvenes con adultos, lo que coincide con prácticas de riesgo identificadas previamente.

CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

En base a los resultados obtenidos en esta tesis podemos concluir lo siguiente:

- El medio de cultivo líquido M7H9C tuvo mejor desempeño que el medio A7H9J para el crecimiento de la cepa MAP de referencia.
- El medio de cultivo sólido 7H9-OP mostró mejor desempeño que los medios HEYM-PS y 7H11-M al permitir un crecimiento temprano (3 semanas) de la cepa MAP de referencia.
- MAP está presente en 3.1% (17 /546) de muestras evaluadas por cultivo (heces, suelo y agua). Del total de aislamientos confirmados el 82.4% (14/17) fue en muestras de heces, el 11.8% (2/17) fue en muestras de agua y el 5.9% (1/17) fue en muestra de suelo.
- El medio de cultivo líquido M7H9C detecta MAP en mayor porcentaje 82% (14/17) que el medio de cultivo sólido 7H9-OP con 17% (3/17).
- Las prácticas de manejo como la compra de animales, alojar terneros con la madre después del parto, usar estiércol para fertilizar pastos presentaron mayor incidencia en las fincas con cultivo positivo.
- Las fincas con cultivo positivo tuvieron mayor presencia de animales con diarrea, pérdida de peso progresivo y reducción en la producción.
- El utilizar vehículos compartidos para el transporte de estiércol estuvo asociado significativamente ($p = 0.02$) con el estado de infección con MAP de las fincas.
- Las fincas con cultivo positivo tuvieron un promedio de producción de L/leche/día/vaca menor (4.67 ± 2.55) que las fincas con cultivo negativo (8.28 ± 5.83).

Recomendaciones

En base a estas conclusiones de arriba, hacemos las siguientes recomendaciones:

1. Implementar la vigilancia de MAP en fincas de producción lechera ya que su presencia disminuye la productividad de Leche.
2. Un programa de control de MAP adecuado para Panamá debe incluir el uso de cultivo de MAP con medio M7H9C para maximizar la detección de MAP, ya que detecta MAP en mayor porcentaje.
3. Para un abordaje completo y tomando en cuenta todos los factores que influyen el proceso de infección con MAP y desarrollo de la paratuberculosis recomendamos el uso combinado de PCR y cultivo en medio líquido M7H9C.
4. Debido a que el medio líquido M7H9C en comparación al medio sólido M7H9C detectó MAP tanto en muestras de heces, suelo y agua, recomendamos su implementación para la detección de MAP en estas muestras.
5. Realizar trabajo de extensión para educar a los productores en mejorar sus prácticas de manejo, y evitar prácticas como el uso de estiércol y utilizar vehículos compartidos.
6. Los datos obtenidos de la encuesta en contraste con los resultados de cultivo tuvieron relación con lo reportado en otros países, sin embargo, es necesario ampliar el número de participantes, para poder obtener resultados más representativos.
7. Disminuir los costos de los programas de control de MAP mediante la combinación de pruebas moleculares y el cultivo para aislamiento de MAP.

Referencias bibliográficas

- Aboagye, G., & Rowe, M. T. (2018). Optimisation of decontamination method and influence of culture media on the recovery of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis from spiked water sediments. *Journal of Microbiological Methods*, *150*, 24–28. <https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2018.05.015>
- Alonso-Hearn, M., Molina, E., Geijo, M., Vazquez, P., Sevilla, I., Garrido, J. M., & Juste, R. A. (1993). Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from mononuclear cells in tissues, blood, and mammary glands of cows with advanced paratuberculosis. *Undefined*, *6*(4), 513–518. <https://doi.org/10.1089/FPD.2008.0226>
- Arnold, F. M., Weber, M. S., Gonda, I., Gallenito, M. J., Adenau, S., Egloff, P., Zimmermann, I., Hutter, C. A. J., Hürlimann, L. M., Peters, E. E., Piel, J., Meloni, G., Medalia, O., & Seeger, M. A. (2020). The ABC exporter IrtAB imports and reduces mycobacterial siderophores. *Nature*, *580*(7803), 413–417. <https://doi.org/10.1038/S41586-020-2136-9>
- Arsenault, R. J., Maattanen, P., Daigle, J., Potter, A., Griebel, P., & Napper, S. (2014). From mouth to macrophage: Mechanisms of innate immune subversion by *Mycobacterium avium* subsp. Paratuberculosis. *Veterinary Research*, *45*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-45-54/FIGURES/4>
- Astudillo, V., & Salud, O. P. de la. (1979). Encuestas por muestreo para estudios epidemiológicos en poblaciones animales. *Serie de Manuales Didácticos*;12. <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51123>
- Ayele, W. Y., Bartos, M., Svastova, P., & 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>
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 5: The Actinobacteria* - Google Libros. (n.d.). Retrieved October 8, 2022, from https://books.google.com.pa/books?hl=es&lr=&id=66UMS7A2KisC&oi=fnd&pg=PR10&ots=_9MTtoHtOJ5&sig=4UfMu--qbpbYmN8L89Y0Uic8uxA&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
- Berghaus, R. D., Farver, T. B., Anderson, R. J., Jaravata, C. C., & Gardner, I. A. (2006). Environmental Sampling for Detection of *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis on Large California Dairies. *Journal of Dairy Science*, *89*(3), 963–970. [https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302\(06\)72161-0](https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302(06)72161-0)
- Bhat, A. M., Malik, H. U., Chaubey, K. K., Hussain, T., Mir, A. Q., Nabi, S. U., Gupta, S., & Singh, S. V. (2021). Bio-typing of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis isolates recovered from the Himalayan sheep and goats. *Tropical Animal Health and Production* *2021* *53*:2, *53*(2), 1–9. <https://doi.org/10.1007/S11250-021-02682-7>
- Britton, W. J., & Lockwood, D. N. J. (2004). Leprosy. *The Lancet*, *363*(9416), 1209–1219. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)15952-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)15952-7)

- Chiodini, R. J., van Kruiningen, H. J., Merkal, R. S., Thayer, W. R., & Coutu, J. A. (1984). Characteristics of an unclassified Mycobacterium species isolated from patients with Crohn's disease. *Journal of Clinical Microbiology*, *20*(5), 966. <https://doi.org/10.1128/JCM.20.5.966-971.1984>
- Chronic Interstitial Enteritis on JSTOR*. (n.d.). Retrieved April 27, 2024, from <https://www.jstor.org/stable/25307529>
- Collins, D. M., Gabric, D. M., & De Lisle, G. W. (1990). Identification of two groups of Mycobacterium paratuberculosis strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*, *28*(7), 1591. <https://doi.org/10.1128/JCM.28.7.1591-1596.1990>
- Collins, M. T., Wells, S. J., Petrini, K. R., Collins, J. E., Schultz, R. D., & Whitlock, R. H. (2005). Evaluation of Five Antibody Detection Tests for Diagnosis of Bovine Paratuberculosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, *12*(6), 685. <https://doi.org/10.1128/CDLI.12.6.685-692.2005>
- Correa-Valencia, N. M., Ramírez, N. F., Arango-Sabogal, J. C., Fecteau, G., & Fernández-Silva, J. A. (2019). Prevalence of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection in dairy herds in Northern Antioquia (Colombia) and associated risk factors using environmental sampling. *Preventive Veterinary Medicine*, *170*, 104739. <https://doi.org/10.1016/J.PREVETMED.2019.104739>
- Correa-Valencia, N., Moyano, R. D., Romano, M. I., Fernández-Silva, J. A., Correa-Valencia, N., Moyano, R. D., Romano, M. I., & Fernández-Silva, J. A. (2020). Tipificación molecular de Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis en lecherías de Antioquia, Colombia. *Revista MVZ Córdoba*, *25*(3), 73–79. <https://doi.org/10.21897/RMVZ.1816>
- Damato, J. J., & Collins, M. T. (1990). Growth of Mycobacterium paratuberculosis in radiometric, middlebrook and egg-based media. *Veterinary Microbiology*, *22*(1), 31–42. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(90\)90122-C](https://doi.org/10.1016/0378-1135(90)90122-C)
- Dane, H., Koidis, A., Stewart, L. D., & Grant, I. R. (2022). Optimization of the composition of a solid culture medium for Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis using factorial design and response surface methodology. *Journal of Applied Microbiology*, *132*(6), 4252–4265. <https://doi.org/10.1111/JAM.15517>
- de Kruijf, M., Coffey, A., & O'Mahony, J. (2017). The investigation of the truncated mbtA gene within the mycobactin cluster of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis as a novel diagnostic marker for real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, *136*, 40–48. <https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2017.03.005>
- de Moraes Pereira, H., Santos, H. P., de Oliveira, E. A. A., Rocha, T. B., Araújo, Í. M. S., Soares, D. M., Junior, F. G., de Albuquerque, P. P. F., & Mota, R. A. (2020). High prevalence of subclinical paratuberculosis in buffaloes (Bubalus bubalis) in Maranhão, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, *51*(3), 1383–1390. <https://doi.org/10.1007/S42770-020-00267-4/METRICS>

Delgado, L., Juste, R. A., Muñoz, M., Morales, S., Benavides, J., Ferreras, M. C., García Marín, J. F., & Pérez, V. (2012). Differences in the peripheral immune response between lambs and adult ewes experimentally infected with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *145*(1–2), 23–31. <https://doi.org/10.1016/J.VETIMM.2011.10.005>

Diagnóstico clínico e histopatológico de paratuberculosis bovina en un hato lechero en Colombia. (n.d.). Retrieved October 8, 2022, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-02682011000300011

Ellingson, J. L. E., Anderson, J. L., Koziczkowski, J. J., Radcliff, R. P., Sloan, S. J., Allen, S. E., & Sullivan, N. M. (2005). Detection of Viable *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in Retail Pasteurized Whole Milk by Two Culture Methods and PCR. *Journal of Food Protection*, *68*(5), 966–972. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.5.966>

Ellingson, J. L. E., Bolin, C. A., & Stabel, J. R. (1998). Identification of a gene unique to *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis and application to diagnosis of paratuberculosis. *Molecular and Cellular Probes*, *12*(3), 133–142. <https://doi.org/10.1006/MCPR.1998.0167>

Espeschet, I. F., Schwarz, D. G. G., Faria, A. C. S., Souza, M. C. C., Paolicchi, F. A., Juste, R. A., Carvalho, I. A., & Moreira, M. A. S. (2017). Paratuberculosis in Latin America: a systematic review. *Tropical Animal Health and Production* *2017* *49*:8, *49*(8), 1557–1576. <https://doi.org/10.1007/S11250-017-1385-6>

FRANCIS, J., MACTURK, H. M., MADINAVEITIA, J., & SNOW, G. A. (1953). Mycobactin, a growth factor for *Mycobacterium johnei*. I. Isolation from *Mycobacterium phlei*. *The Biochemical Journal*, *55*(4), 596–607. <https://doi.org/10.1042/BJ0550596>

Franke, A., McGovern, D. P. B., Barrett, J. C., Wang, K., Radford-Smith, G. L., Ahmad, T., Lees, C. W., Balschun, T., Lee, J., Roberts, R., Anderson, C. A., Bis, J. C., Bumpstead, S., Ellinghaus, D., Festen, E. M., Georges, M., Green, T., Haritunians, T., Jostins, L., ... Parkes, M. (2010). Meta-Analysis Increases to 71 the Tally of Confirmed Crohn's Disease Susceptibility Loci. *Nature Genetics*, *42*(12), 1118. <https://doi.org/10.1038/NG.717>

Garcia, A. B., & Shalloo, L. (2015). Invited review: The economic impact and control of paratuberculosis in cattle. *Journal of Dairy Science*, *98*(8), 5019–5039. <https://doi.org/10.3168/JDS.2014-9241>

Gill, C. O., Saucier, L., & Meadus, W. J. (2011). *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in Dairy Products, Meat, and Drinking Water. *Journal of Food Protection*, *74*(3), 480–499. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-301>

Goodridge, A., Correa, R., Castro, P., Escobar, C., & de Waard, J. H. (2013). Serum samples can be substituted by plasma samples for the diagnosis of paratuberculosis. *Preventive Veterinary Medicine*, *112*(1–2), 147–149. <https://doi.org/10.1016/J.PREVETMED.2013.06.011>

- Harris, N. B., Robbe-Austerman, S., & Payeur, J. B. (2005). Effect of Egg Yolk on the Detection of Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis Using the ESP II Liquid Culture System. *https://doi.org/10.1177/104063870501700605*, 17(6), 554–560. <https://doi.org/10.1177/104063870501700605>
- Hernández-Reyes, A. L., Chávez-Gris, G., Maldonado-Castro, E., Alcaraz-Sosa, L. E., & Díaz-Negrete, M. T. (2022). First identification of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in wild ruminants in a zoo in Mexico. *Veterinary World*, 15(3), 655–661. <https://doi.org/10.14202/VETWORLD.2022.655-661>
- Idris, S. M., Ali, E. A., Elmagzoub, W. A., Okuni, J. B., Mukhtar, M. E., Ojok, L., Eltayeb, E. S., Abd El Wahed, A., Eltom, K. H., & Gameel, A. A. (2022). First Report on Ovine Paratuberculosis in the Sudan: Diagnosis Using Different Techniques. *Animals 2022*, Vol. 12, Page 3312, 12(23), 3312. <https://doi.org/10.3390/ANI12233312>
- Johnson-Ifearulundu, Y. J., & Kaneene, J. B. (1998). Management-related risk factors for M. paratuberculosis infection in Michigan, USA, dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 37(1–4), 41–54. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(98\)00110-X](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(98)00110-X)
- Johnson-Ifearulundu, Y. J., Kaneene, J. B., Sprecher, D. J., Gardiner, J. C., & Lloyd, J. W. (2000). The effect of subclinical Mycobacterium paratuberculosis infection on days open in Michigan, USA, dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine*, 46(3), 171–181. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(00\)00145-8](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(00)00145-8)
- Jorgensen, J. B. (1977). Survival of Mycobacterium paratuberculosis in slurry. *Nordisk Veterinaermedicin*, 29(6), 267–270. <https://europepmc.org/article/med/331238>
- Kaczmarkowska, A., Didkowska, A., Kwiecień, E., Stefańska, I., Rzewuska, M., & Anusz, K. (2022). The Mycobacterium avium complex – an underestimated threat to humans and animals. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 29(1), 22–27. <https://doi.org/10.26444/AAEM/136398>
- Kawaji, S., Taylor, D. L., Mori, Y., & Whittington, R. J. (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(1–2), 36–48. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2007.05.002>
- Koch, R. (n.d.). *Die Ätiologie der Tuberkulose. 1) (Nach, einem in der Physiologischen Gesellschaft zu Berlin am 24. März 1882 gehaltenen Vortrage.)*.
- Konboon, M., Bani-Yaghoub, M., Pithua, P. O., Rhee, N., & Aly, S. S. (2018). A nested compartmental model to assess the efficacy of paratuberculosis control measures on U.S. dairy farms. *PLOS ONE*, 13(10), e0203190. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0203190>
- Kudahl, A. B., Nielsen, S. S., & Østergaard, S. (2008). Economy, Efficacy, and Feasibility of a Risk-Based Control Program Against Paratuberculosis. *Journal of Dairy Science*, 91(12), 4599–4609. <https://doi.org/10.3168/JDS.2008-1257>
- Lambrecht, R. S., Carriere, J. F., & Collins', M. T. (1988). A Model for Analyzing Growth Kinetics of a Slowly Growing Mycobacterium sp. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 910–916.

- Li, L., Bannantine, J. P., Zhang, Q., Amonsin, A., May, B. J., Alt, D., Banerji, N., Kanjilal, S., & Kapur, V. (2005). The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(35), 12344–12349. https://doi.org/10.1073/PNAS.0505662102/SUPPL_FILE/05662FIG5.JPG
- Lombard, J. E. (2011). Epidemiology and Economics of Paratuberculosis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, *27*(3), 525–535. <https://doi.org/10.1016/J.CVFA.2011.07.012>
- Lombard, J. E., Garry, F. B., McCluskey, B. J., & Wagner, B. A. (2005). Risk of removal and effects on milk production associated with paratuberculosis status in dairy cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *227*(12), 1975–1981. <https://doi.org/10.2460/JAVMA.2005.227.1975>
- Ly, A., Dhand, N. K., Sergeant, E. S. G., Marsh, I., & Plain, K. M. (2019). Determining an optimal pool size for testing beef herds for Johne's disease in Australia. *PLOS ONE*, *14*(11), e0225524. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0225524>
- Marquetoux, N., Mitchell, R., Ridler, A., Heuer, C., & Wilson, P. (2018). A synthesis of the patho-physiology of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infection in sheep to inform mathematical modelling of ovine paratuberculosis. *Veterinary Research*, *49*(1). <https://doi.org/10.1186/S13567-018-0522-1>
- Marsh, I., Whittington, R., & 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. *Molecular and Cellular Probes*, *13*(2), 115–126. <https://doi.org/10.1006/MCPR.1999.0227>
- McAloon, C. G., Roche, S., Ritter, C., Barkema, H. W., Whyte, P., More, S. J., O'Grady, L., Green, M. J., & Doherty, M. L. (2019). A review of paratuberculosis in dairy herds — Part 1: Epidemiology. *The Veterinary Journal*, *246*, 59–65. <https://doi.org/10.1016/J.TVJL.2019.01.010>
- Meehan, C. J., Barco, R. A., Loh, Y. H. E., Cogneau, S., & Rigouts, L. (2021). Reconstituting the genus *Mycobacterium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *71*(9), 4922. <https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.004922>
- Merkal, R. S., & McCullough, W. G. (1982). A new mycobactin, mycobactin J, from *Mycobacterium paratuberculosis*. *Current Microbiology*, *7*(6), 333–335. <https://doi.org/10.1007/BF01572599/METRICS>
- Mitchell, R. M., Beaver, A., Knupfer, E., Pradhan, A. K., Fyock, T., Whitlock, R. H., & Schukken, Y. H. (2019). Elucidating Transmission Patterns of Endemic *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis Using Molecular Epidemiology. *Veterinary Sciences*, *6*(1). <https://doi.org/10.3390/VETSC16010032>
- Nicolás Ramírez, V., Rodríguez, B., & Jorge Fernández, S. (2011). Diagnóstico clínico e histopatológico de paratuberculosis bovina en un hato lechero en Colombia. *Revista MVZ Córdoba*, *16*(3), 2742–2753. <https://doi.org/10.21897/RMVZ.275>

- Paratuberculosis: Organism, Disease, Control* - Google Libros. (n.d.). Retrieved October 3, 2022, from https://books.google.com.pa/books?hl=es&lr=&id=koUAEAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR3&ots=6kWNneMk71&sig=53AxXLnQLCvmUCr8VRoYxrlWwy0&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
- Poupart, P., Coene, M., Van Heuverswyn, H., & Cocito, C. (1993). Preparation of a specific RNA probe for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* and diagnosis of Johne's disease. *Journal of Clinical Microbiology*, *31*(6), 1601–1605. <https://doi.org/10.1128/JCM.31.6.1601-1605.1993>
- Pritchard, T. C., Coffey, M. P., Bond, K. S., Hutchings, M. R., & Wall, E. (2017). Phenotypic effects of subclinical paratuberculosis (Johne's disease) in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, *100*(1), 679–690. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11323>
- Raizman, E. A., Fetrow, J. P., & Wells, S. J. (2009). Loss of income from cows shedding *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis prior to calving compared with cows not shedding the organism on two minnesota dairy farms. *Journal of Dairy Science*, *92*(10), 4929–4936. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2133>
- Ramovic, E., Yearsley, D., Nighallchoir, E., Quinless, E., Galligan, A., Markey, B., Johnson, A., Hogan, I., & Egan, J. (2019). *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in pooled faeces and dust from the housing environment of herds infected with Johne's disease. *Veterinary Record*, *184*(2), 65. <https://doi.org/10.1136/VR.105085>
- Rani, M., Narang, D., Kumar, D., Chandra, M., Singh, S. T., & Folia, G. (2018). ISMap02 element targeted nested polymerase chain in the detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in fecal samples of cattle and buffaloes. *Veterinary World*, *11*(3), 397–401. <https://doi.org/10.14202/VETWORLD.2018.397-401>
- Rasmussen, P., Barkema, H. W., Mason, S., Beaulieu, E., & Hall, D. C. (2021). Economic losses due to Johne's disease (paratuberculosis) in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, *104*(3), 3123–3143. <https://doi.org/10.3168/JDS.2020-19381>
- Reddacliff, L. A., & Whittington, R. J. (2003). Experimental infection of weaner sheep with S strain *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Veterinary Microbiology*, *96*(3), 247–258. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2003.07.004>
- Richardson, E. K. B., & More, S. J. (2009). Direct and indirect effects of Johne's disease on farm and animal productivity in an Irish dairy herd. *Irish Veterinary Journal*, *62*(8), 526–532. <https://doi.org/10.1186/2046-0481-62-8-526/TABLES/3>
- Ris, D. R., Hamel, K. L., & Ayling, J. M. (1988). The detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine faeces by isolation and the comparison of isolation with the examination of stained smears by light microscopy. *New Zealand Veterinary Journal*, *36*(3), 112–114. <https://doi.org/10.1080/00480169.1988.35503>
- Ristow, P., Silva, M. G., De Souza Fonseca, L., & Lilenbaum, W. (2006). Evaluation of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis faecal culture protocols and media.

Pesquisa Veterinaria Brasileira, 26(1), 1–4. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2006000100001>

- Roche, S. M., von Massow, M., Renaud, D., Shock, D. A., Jones-Bitton, A., & Kelton, D. F. (2020). Cost-benefit of implementing a participatory extension model for improving on-farm adoption of Johne's disease control recommendations. *Journal of Dairy Science*, 103(1), 451–472. <https://doi.org/10.3168/JDS.2019-16708>
- Sanderson, J. D., Moss, M. T., Tizard, M. L. V., & Hermon-Taylor, J. (1992). Mycobacterium paratuberculosis DNA in Crohn's disease tissue. *Gut*, 33(7), 890–896. <https://doi.org/10.1136/GUT.33.7.890>
- Schwalm, A. K., Metzger-Boddien, C., Seemann, G., Mandl, J., Obiegala, A., Pfeffer, M., & Sting, R. (2019). Field study on bovine paratuberculosis using real-time PCR and liquid culture for testing environmental and individual fecal samples implemented in dairy cow management. *Journal of Dairy Science*, 102(12), 11260–11267. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15649>
- Sechi, L. A., Scanu, A. M., Molicotti, P., Cannas, S., Mura, M., Dettori, G., Fadda, G., & Zanetti, S. (2005). Detection and Isolation of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis from intestinal mucosal biopsies of patients with and without Crohn's disease in Sardinia. *The American Journal of Gastroenterology*, 100(7), 1529–1536. <https://doi.org/10.1111/J.1572-0241.2005.41415.X>
- SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERIA, PESCA Y ALIMENTACION SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA. (n.d.).
- Sevilla, I., Garrido, J. M., Geijo, M., & Juste, R. A. (2007). Pulsed-field gel electrophoresis profile homogeneity of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis isolates from cattle and heterogeneity of those from sheep and goats. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-18>
- Sibley, J. A., Woodbury, M. R., Appleyard, G. D., & Elkin, B. (2007). Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in Bison (Bison bison) from Northern Canada. *Journal of Wildlife Diseases*, 43(4), 775–779. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-43.4.775>
- Smith, R. L., Strawderman, R. L., Schukken, Y. H., Wells, S. J., Pradhan, A. K., Espejo, L. A., Whitlock, R. H., van Kessel, J. S., Smith, J. M., Wolfgang, D. R., & Gröhn, Y. T. (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>
- Socketk, D., Goodger, W., & Thomas, C. (1994). Herd prevalence and geographic distribution of, and risk factors for, bovine paratuberculosis in Wisconsin. *Article in Journal of the American Veterinary Medical Association*. <https://www.researchgate.net/publication/15036679>
- Stabel, J. R. (1997). An improved method for cultivation of Mycobacterium paratuberculosis from bovine fecal samples and comparison to three other methods. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 9(4), 375–380. <https://doi.org/10.1177/104063879700900406>

- Stabel, J. R. (2006). Host responses to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a complex arsenal. *Animal Health Research Reviews*, 7(1–2), 61–70. <https://doi.org/10.1017/S1466252307001168>
- Steck, P. A., Schwartz, B. A., Rosendahl, M. S., & Gray, G. R. (1978). Mycolic acids. A reinvestigation. *Journal of Biological Chemistry*, 253(16), 5625–5629. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)30312-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)30312-5)
- Stehr-Green, P. A., Stehr-Green, J. K., Nelson, A., Mejia, G. C., Alexander, L., de Edición, J., & Macdonald, P. D. M. (n.d.). *Desarrollo de un Cuestionario Críticos: FOCUS Workgroup***. Retrieved September 17, 2022, from <http://www.cdc.gov/foodborneoutbreaks/standard>
- Strommenger, B., Stevenson, K., & Gerlach, G.-F. (2001). Isolation and diagnostic potential of ISMav2, a novel insertion sequence-like element from *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *FEMS Microbiology Letters*, 196(1), 31–37. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.2001.TB10536.X>
- Sweeney, R. W. (2011). Pathogenesis of Paratuberculosis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 27(3), 537–546. <https://doi.org/10.1016/J.CVFA.2011.07.001>
- Sweeney, R. W., Collins, M. T., Koets, A. P., Mcguirk, S. M., & Roussel, A. J. (2012). Paratuberculosis (Johne's Disease) in Cattle and Other Susceptible Species. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 26(6), 1239–1250. <https://doi.org/10.1111/J.1939-1676.2012.01019.X>
- Sweeney, R. W., Whitlock, R. H., Buckley, C. L., & Spencer, P. A. (1995). Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation : Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 7(4), 488–493. <https://doi.org/10.1177/104063879500700411>
- Tiwari, A., VanLeeuwen, J. A., Dohoo, I. R., Keefe, G. P., & Weersink, A. (2008). Estimate of the direct production losses in Canadian dairy herds with subclinical *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection. *The Canadian Veterinary Journal*, 49(6), 569. [/pmc/articles/PMC2387260/](https://doi.org/10.1139/V080601)
- Tiwari, A., VanLeeuwen, J. A., Dohoo, I. R., Stryhn, H., Keefe, G. P., & Haddad, J. P. (2005). Effects of seropositivity for bovine leukemia virus, bovine viral diarrhoea virus, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, and *Neospora caninum* on culling in dairy cattle in four Canadian provinces. *Veterinary Microbiology*, 109(3–4), 147–158. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2005.05.011>
- Tiwari, A., VanLeeuwen, J. A., McKenna, S. L. B., Keefe, G. P., & Barkema, H. W. (2006a). Johne's disease in Canada: Part I: Clinical symptoms, pathophysiology, diagnosis, and prevalence in dairy herds. *The Canadian Veterinary Journal*, 47(9), 874. [/pmc/articles/PMC1555680/](https://doi.org/10.1139/V060901)
- Tiwari, A., VanLeeuwen, J. A., McKenna, S. L. B., Keefe, G. P., & Barkema, H. W. (2006b). Johne's disease in Canada: Part I: Clinical symptoms, pathophysiology,

- diagnosis, and prevalence in dairy herds. *The Canadian Veterinary Journal*, 47(9), 874. /pmc/articles/PMC1555680/
- Tizard, M. L. V., Moss, M. T., Sanderson, J. D., Austen, B. M., & Hermon-Taylor, J. (1992). p43, the protein product of the atypical insertion sequence IS900, is expressed in *Mycobacterium paratuberculosis*. *Journal of General Microbiology*, 138 Pt 8(8), 1729–1736. <https://doi.org/10.1099/00221287-138-8-1729>
- Van Boxtel, R. M., Lambrecht, R. S., & Collins, M. T. (1990a). Effect of polyoxyethylene sorbate compounds (Tweens) on colonial morphology, growth, and ultrastructure of *Mycobacterium paratuberculosis*. *APMIS*, 98(7–12), 901–908. <https://doi.org/10.1111/J.1699-0463.1990.TB05013.X>
- Van Boxtel, R. M., Lambrecht, R. S., & Collins, M. T. (1990b). Effects of colonial morphology and Tween 80 on antimicrobial susceptibility of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34(12), 2300–2303. <https://doi.org/10.1128/AAC.34.12.2300>
- Viale, M. N., Zumárraga, M. J., Araújo, F. R., Zarraga, A. M., Cataldi, A. A., Romano, M. I., & Bigi, F. (n.d.). *La genómica de las micobacterias*. <https://doi.org/10.20506/rst.35.1.2429>
- Villamil, F. J., Yus, E., Benavides, B., Casal, J., Moya, S. J., Allepuz, A., & Diéguez, F. J. (2020). Short communication: Risk factors associated with *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* introduction into dairy herds in Galicia, northwestern Spain. *Journal of Dairy Science*, 103(8), 7411–7415. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18210>
- W Twort, B. F., Loud, L., & Y I ngram, G. L. (1912). A method for isolating and cultivating the mycobacterium enteritidis chronicæ pseudotuberculosisæ bovis, Jöhne, and some experiments on the preparation of a diagnostic vaccine for pseudo-tuberculous enteritis of bovines. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 84(575), 517–542. <https://doi.org/10.1098/RSPB.1912.0011>
- Wang, J., Moolji, J., Dufort, A., Staffa, A., Domenech, P., Reed, M. B., & Behr, M. A. (2016). Iron Acquisition in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Journal of Bacteriology*, 198(5), 857. <https://doi.org/10.1128/JB.00922-15>
- Weber, M. F., Kogut, J., de Bree, J., van Schaik, G., & Nielen, M. (2010). Age at which dairy cattle become *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* faecal culture positive. *Preventive Veterinary Medicine*, 97(1), 29–36. <https://doi.org/10.1016/J.PREVETMED.2010.07.004>
- Whan, L., Ball, H. J., Grant, I. R., & Rowe, M. T. (2005a). Occurrence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Untreated Water in Northern Ireland. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 7107. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7107-7112.2005>
- Whan, L., Ball, H. J., Grant, I. R., & Rowe, M. T. (2005b). Occurrence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Untreated Water in Northern Ireland. *Applied and*

Environmental Microbiology, 71(11), 7107. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7107-7112.2005>

- Whitlock, R. H., & Buergelt, C. (1996). Preclinical and Clinical Manifestations of Paratuberculosis (Including Pathology). *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 12(2), 345–356. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30410-2](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30410-2)
- Whitlock, R. H., Wells, S. J., Sweeney, R. W., & Van Tiem, J. (2000). ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. *Veterinary Microbiology*, 77(3–4), 387–398. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00324-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00324-2)
- Whittington, R. J., Marsh, I. B., Saunders, V., Grant, I. R., Juste, R., Sevilla, I. A., Manning, E. J. B., & Whitlock, R. H. (2011). Culture Phenotypes of Genomically and Geographically Diverse *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis Isolates from Different Hosts. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 49(5), 1822–1830. <https://doi.org/10.1128/JCM.00210-11>
- Whittington, R. J., Marsh, I., Turner, M. J., McAllister, S., Choy, E., Eamens, G. J., Marshall, D. J., & Ottaway, S. (1998). Rapid detection of *Mycobacterium* paratuberculosis in clinical samples from ruminants and in spiked environmental samples by modified BACTEC 12B radiometric culture and direct confirmation by IS900 PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(3), 701–707. <https://doi.org/10.1128/JCM.36.3.701-707.1998/ASSET/34CDA681-CD39-404A-934E-F414EBC6BA98/ASSETS/GRAPHIC/JM0380815001.JPEG>
- Whittington, R. J., & Sergeant, E. (2001). Progress towards understanding the spread, detection and control of *Mycobacterium avium* subsp. para-tuberculosis in animal populations. *Australian Veterinary Journal*, 79(4), 267–278. <https://doi.org/10.1111/J.1751-0813.2001.TB11980.X>
- Whittington, R. J., Whittington, A. M., Waldron, A., Begg, D. J., De Silva, K., Purdie, A. C., & Plain, K. M. (2013). Development and validation of a liquid medium (M7H9C) for routine culture of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis to replace modified Bactec 12B medium. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(12), 3993–4000. <https://doi.org/10.1128/JCM.01373-13>
- Whittington, R. J., & Windsor, P. A. (2009). In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis: a critical review and meta-analysis. *Veterinary Journal (London, England : 1997)*, 179(1), 60–69. <https://doi.org/10.1016/J.TVJL.2007.08.023>
- Wichert, A., Einax, E., Hahn, N., Klassen, A., & Donat, K. (2021). Detection of *Mycobacterium avium* Subspecies Paratuberculosis in Pooled Fecal Samples by Fecal Culture and Real-Time PCR in Relation to Bacterial Density. *Animals : An Open Access Journal from MDPI*, 11(6). <https://doi.org/10.3390/ANI11061605>
- Wolinsky, E. (1992). Mycobacterial Diseases Other Than Tuberculosis. *Clinical Infectious Diseases*, 15(1), 1–12. <https://doi.org/10.1093/CLINIDS/15.1.1>
- Wu, C. W., Livesey, M., Schmoller, S. K., Manning, E. J. B., Steinberg, H., Davis, W. C., Hamilton, M. J., & 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/ASSET/ECF8EEFA-3C90-43DA-8AF6-AC696546ADAC/ASSETS/GRAPHIC/ZII0050766160006.JPEG>

Zarei-Kordshouli, F., Geramizadeh, B., & Khodakaram-Tafti, A. (2019). Prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis IS 900 DNA in biopsy tissues from patients with Crohn's disease: histopathological and molecular comparison with Johne's disease in Fars province of Iran. *BMC Infectious Diseases*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/S12879-018-3619-2>

Zimmer, K., Dräger, K. G., Klawonn, W., & Hess, R. G. (1999). Contribution to the diagnosis of Johne's disease in cattle. Comparative studies on the validity of Ziehl-Neelsen staining, faecal culture and a commercially available DNA-Probe test in detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in faeces from cattle. *Zentralblatt Fur Veterinarmedizin. Reihe B. Journal of Veterinary Medicine. Series B*, 46(2), 137–140. <https://doi.org/10.1111/J.0931-1793.1999.00214.X>