



Determinación de la prevalencia, distribución geográfica y factores de riesgo de paratuberculosis bovina, de una sub muestra de sueros bovinos del banco de biológicos del proyecto BruTryp, proveniente de 5 provincias de Ecuador, mediante la aplicación del kit ELISA – paratuberculosis Screening

Villalta Gavilanes, Nycole Eshtefania

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera Agropecuaria

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniera Agropecuaria

Dr. Ron Román, Jorge Washington, MSc.

01 de septiembre de 2023



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera Agropecuaria

Certificación:

Certifico que el trabajo de integración curricular: **Determinación de la prevalencia, distribución geográfica y factores de riesgo de paratuberculosis bovina, de una sub muestra de sueros bovinos del banco de biológicos del proyecto BruTryp, proveniente de 5 provincias de Ecuador, mediante la aplicación del kit ELISA – paratuberculosis Screening**, fue realizado por la señorita: **Villalta Gavilanes, Nycole Eshtefania**; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta para verificación y/o análisis de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 01 de septiembre del 2023



**VERIFICADO DIGITALMENTE POR:
JORGE WASHINGTON
RON ROMAN**

Dr. Ron Román, Jorge Washington. MSc.

C.I. 1709505125

Resultados de la herramienta para verificación y/o análisis de similitud de contenidos



Tesis_Villalta_Nycole_VF.docx

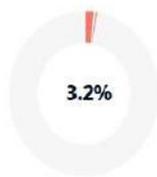
Scan details

Scan time:
September 1th, 2023 at 2:58 UTC

Total Pages:
78

Total Words:
19430

Plagiarism Detection



Types of plagiarism		Words
● Identical	2.2%	430
● Minor Changes	0.8%	161
● Paraphrased	0%	0
● Omitted Words	3.7%	710

AI Content Detection



Text coverage
● AI text
○ Human text



Dr. Ron Román, Jorge Washington, MSc.
C. C: 1709505125



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera Agropecuaria

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Villalta Gavilanes, Nycole Eshtefania**, con cédula de ciudadanía No.1751469923, declaró que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **Determinación de la prevalencia, distribución geográfica y factores de riesgo de paratuberculosis bovina, de una sub muestra de sueros bovinos del banco de biológicos del proyecto BruTryp, proveniente de 5 provincias de Ecuador, mediante la aplicación del kit ELISA – paratuberculosis Screening**, es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 01 de septiembre del 2023

Villalta Gavilanes, Nycole Eshtefania

C.I.:1751469923



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera Agropecuaria

Autorización de Publicación

Yo, **Villalta Gavilanes, Nycole Eshtefania**, con cédula de ciudadanía No. 1751469923 autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **Determinación de la prevalencia, distribución geográfica y factores de riesgo de paratuberculosis bovina, de una sub muestra de sueros bovinos del banco de biológicos del proyecto BruTryp, proveniente de 5 provincias de Ecuador, mediante la aplicación del kit ELISA – paratuberculosis Screening** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios es de mi responsabilidad.

Sangolquí, 01 de septiembre del 2023

Villalta Gavilanes, Nycole Eshtefania

C.I.:1751469923

Dedicatoria

Esta tesis está dedicada a mis abuelitos Isabel Toscano y José Gavilanes, por quienes anhelo ser una gran profesional y tener los recursos económicos para devolverles todo el cariño y esfuerzo que me han dado a lo largo de mi vida. Son mi motor para seguir adelante.

Además, quiero dedicarme este trabajo a mí, este escrito es la representación de que estoy logrando los objetivos que hace algún tiempo atrás me tracé, sin duda las cosas con esfuerzo y dedicación se consiguen, que hoy esté escribiendo la tesis quiere decir que lo logramos Nycole. Felicitaciones, vas a ser una gran profesional porque sé cuánto te apasiona lo que haces. Sigue adelante.

Agradecimientos

Quiero agradecer a Dios, por acompañarme en cada paso que doy, y enseñarme siempre una salida, sin duda me ha demostrado que si me caigo me puedo levantar, por todas las puertas que me ha abierto y porque por El soy la persona que soy.

Agradezco a mi padre Douglas Villalta, por guiarme en mi camino y mostrarme mi Carrera. Papá soy Ingeniera Agropecuaria como tú lo querías. A mi mami Patricia Gavilanes por su apoyo incondicional en toda mi etapa educativa. A mis hermanos José y Douglas que sé que están orgullosos de mí.

A mis mejores amigos, Vane, Jessi, Victor y Yampool por su apoyo incondicional, por sostenerme en mis peores momentos y no dejar que me rindiera, ¡Gracias!, por ustedes aún sigo de pie.

A mi tutor de tesis el Doctor Jorge Ron Román por darme una segunda oportunidad y confiar en mí, gracias por enseñarme con disciplina y pasión la sanidad animal, sin duda ver su trabajo y dedicación me inspiró en mi trabajo y ahora es un referente de que existen profesionales que aman lo que hacen.

Al técnico de laboratorio Ing. Michelle Yugcha y al equipo de trabajo del Proyecto BruTryp, por enseñarme y guiarme durante el trabajo de laboratorio.

Al Ing. Marlon Quinapanta ¡Gracias!, sin ti, no lo hubiera logrado.

A la Academia de Investigación y Enseñanza Superior (ARES) y la Universidad de Lieja Bélgica, por el financiamiento del proyecto de investigación.

A la Unidad de Becas del Municipio de Quito, por darme las herramientas necesarias para culminar mis estudios y el desarrollo de esta tesis.

A la Carrera Agropecuaria IASA I y a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE por formarme como una gran profesional y enseñarme el amor al campo.

Índice de contenidos

Carátula.....	1
Certificación	2
Resultados de la herramienta para verificación y/o análisis de similitud de contenidos.....	3
Responsabilidad de Autoría	4
Autorización de Publicación	5
Dedicatoria	6
Agradecimientos	7
Índice de contenidos.....	8
Índice de tablas.....	12
Índice de figuras.....	14
Resumen.....	15
Abstract.....	16
CAPÍTULO I.....	17
INTRODUCCIÓN	17
Antecedentes	17
Justificación.....	18
Objetivos.....	19
Objetivo General.....	19
Objetivos específicos.....	19
Hipótesis.....	20
Hipótesis nula	20
Hipótesis de investigación.....	20
CAPÍTULO II.....	21
REVISIÓN DE LITERATURA	21
Generalidades de la Paratuberculosis bovina	21

Agente causal	21
Taxonomía.....	22
Patogenia y signos – síntomas	22
Ciclo evolutivo y vía de transmisión	24
Hospedadores y reservorios	27
Importancia.....	28
Económica	28
Salud pública	29
Restricciones de movilización de animales y/o sub productos	30
Pruebas diagnósticas.....	30
Métodos directos	32
Métodos indirectos	34
Distribución geográfica y prevalencia.....	38
Estudios realizados en el mundo	38
América Latina.....	39
Ecuador.....	40
Factores de riesgo.....	42
Medidas de prevención y control de la enfermedad.....	44
CAPÍTULO III.....	46
METODOLOGÍA.....	46
Contexto del proyecto BruTryp	46
Determinación del tamaño de la muestra y estrategia de submuestreo.....	47
Número de muestras por provincias	48
Toma de muestras sanguíneas del proyecto BruTryp	48
Obtención de suero sanguíneo dentro del proyecto BruTryp	49
Almacenamiento de las muestras del proyecto BruTryp.....	49

Verificación de la existencia de los sueros sanguíneos en el banco de muestras.....	49
Ensayo inmunoenzimático indirecto (iELISA)	49
Diseño de la placa	50
Preparación de los reactivos	50
Preparación de las muestras.....	51
Interpretación de resultados.....	53
Análisis estadístico.....	54
Diseño no experimental.....	54
Determinación de la prevalencia.....	54
Operatividad de las variables	55
Categorización de las fincas	55
Encuestas epidemiológicas.....	55
Estadística descriptiva.....	56
Estadística inferencial.....	56
Determinación de factores de riesgo	56
Medidas epidemiológicas	57
Determinación de la distribución geográfica.....	59
CAPÍTULO IV	60
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
Estadística descriptiva de la muestra	60
Distribución de animales y hatos analizados en base a la zona geográfica	60
Distribución de animales y hatos analizados en base al tamaño de la finca	61
Distribución de los animales muestreados en base al sexo.....	62
Distribución de los animales muestreados por edad y sexo	63
Distribución de animales por raza.....	64
Prevalencias.....	65

Prevalencia general de Paratuberculosis bovina en Ecuador	65
Prevalencia por zona geográfica.....	67
Prevalencia por tamaño de finca.....	71
Prevalencia por sexo del animal	72
Prevalencia por la edad del animal.....	73
Prevalencia por la raza del animal.....	75
Factores de riesgo.....	76
Dependencia de variables.....	76
Medidas epidemiológicas.....	77
Georreferenciación.....	78
CAPÍTULO V	85
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	85
Conclusiones.....	85
Recomendaciones	86
Bibliografía	87

Índice de tablas

Tabla 1 Descripción de la taxonomía de <i>Mycobacterium avium</i> subespecie <i>paratuberculosis</i>	22
Tabla 2 Estadios clínicos de la <i>paratuberculosis</i>	24
Tabla 3 Supervivencia de <i>Mycobacterium avium</i> subesp, <i>paratuberculosis</i> en el medio <i>ambiente</i>	25
Tabla 4 Pruebas diagnósticas para identificar <i>Mycobacterium avium</i> subesp. <i>paratuberculosis</i> en bovinos.....	37
Tabla 5 Sensibilización y especificidad de pruebas diagnósticas para identificar <i>Mycobacterium avium</i> subesp. <i>paratuberculosis</i> utilizadas en bovinos	37
Tabla 6 Prevalencia de <i>Paratuberculosis</i> bovina en Latinoamérica	40
Tabla 7 Prevalencia de <i>Paratuberculosis</i> bovina en Ecuador.....	41
Tabla 8 Constantes necesarias para el cálculo de la submuestra.....	47
Tabla 9 Tabla resumen del número mínimo de muestras necesarias por provincia para el <i>estudio</i>	48
Tabla 10 Tabla ejemplificada del diseño de placa mantenido durante los ensayos.....	50
Tabla 11 Interpretación de los resultados kit ELISA <i>Paratuberculosis</i> Screening.....	54
Tabla 12 Tabla de distribución de medidas y factor de exposición para cálculos.....	57
Tabla 13 Distribución de las muestras analizadas en base a la zona geográfica y tamaño <i>de la finca</i>	60
Tabla 14 Distribución de las muestras tomadas en base al tamaño de la finca.....	61
Tabla 15 Distribución de las muestras en base al sexo	63
Tabla 16 Distribución de las muestras por edad y sexo.....	63
Tabla 17 Distribución de las muestras por raza	64
Tabla 18 Prevalencia de <i>paratuberculosis</i> en sueros bovinos analizados por la prueba de <i>iELISA</i>	65

Tabla 19 <i>Prevalencia de Paratuberculosis por zona geográfica en muestras de bovinos.....</i>	67
Tabla 20 <i>Prevalencia de Paratuberculosis bovina por tamaño de finca en muestras de bovinos analizados por iELISA</i>	71
Tabla 21 <i>Prevalencia de Paratuberculosis por el sexo del animal en muestras de bovinos analizados por iELISA.....</i>	72
Tabla 22 <i>Prevalencia de Paratuberculosis por la edad del animal</i>	74
Tabla 23 <i>Prevalencia de Paratuberculosis por la raza del animal</i>	75
Tabla 24 <i>Análisis de chi-cuadrado y Odds ratio</i>	76
Tabla 25 <i>Medidas epidemiológicas para determinar factores de riesgo.....</i>	77

Índice de figuras

Figura 1 <i>Hospederos, reservorios y vías de transmisión de MAP</i>	28
Figura 2 <i>Fenómeno del iceberg de la Paratuberculosis bovina</i>	31
Figura 3 <i>Tinción Ziehl-Neelsen de Mycobacterium avium supesp. paratuberculosis</i>	32
Figura 4 <i>Distribución mundial de Mycobacterium avium supesp. paratuberculosis en el año 2018</i>	39
Figura 5 <i>Ubicación del banco de biológicos del proyecto BruTryp</i>	46
Figura 6 <i>Prevalencia de Paratuberculosis por provincia</i>	69
Figura 7 <i>Prevalencia de Paratuberculosis bovina en base al tamaño de la finca</i>	72
Figura 8 <i>Mapa con las prevalencias de paratuberculosis bovina en 5 provincias de Ecuador</i> ..	79
Figura 9 <i>Mapa de fincas positivas a Paratuberculosis bovina en la provincia de Manabí</i>	80
Figura 10 <i>Mapa de fincas positivas a Paratuberculosis bovina en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas</i>	81
Figura 11 <i>Mapa de fincas positivas a Paratuberculosis bovina en la provincia de Pichincha</i> ...	82
Figura 12 <i>Mapa de fincas positivas a Paratuberculosis bovina en la provincia de Napo</i>	83
Figura 13 <i>Mapa de fincas positivas a Paratuberculosis bovina en la provincia de Orellana</i>	84

Resumen

En el presente estudio se determinó la prevalencia, distribución geográfica y factores de riesgo de paratuberculosis bovina, causada por *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis*, en 5 provincias de Ecuador. En total se analizó 430 sueros bovinos provenientes de 170 hatos; se llevó a cabo un diagnóstico serológico mediante la aplicación del kit ELISA – paratuberculosis Screening de la casa comercial IDEXX, obteniéndose una prevalencia general de 2,33% (10/430) por animal y de 5,88% (10/170) por hato. A nivel de región, la Costa presentó la mayor prevalencia con 3,18%, seguido de la Sierra con 2,08% y la Amazonia con 1,23%. Las provincias en estudio fueron Manabí con una prevalencia de 3,03%, Santo Domingo de los Tsáchilas con 4,00%, Pichincha con 2,08% y Napo con 2,63%, en Orellana no se presentó prevalencia de la enfermedad. Además, no se determinó asociación entre las variables tamaño de la finca, zona de muestreo (región y provincia) con la presencia de la enfermedad ($p > 0,05$), mediante un análisis estadístico: Chi-cuadrado y Odds Ratio (OR), también, se calculó las medidas epidemiológicas de: riesgo relativo (RR), riesgo atribuible (RA) y fracción etiológica de la población (FEP) de la raza, edad y sexo del animal; determinando como factores de riesgo a la raza y edad con valores de RR de 1,5 y 1,44, RA de 2% y 0,8% para cada variable respectivamente, y un FEP de 27% para la edad. Por último, se realizó mapas de georreferenciación de los casos positivos a paratuberculosis, donde se observó que la enfermedad se encuentra distribuida en las 3 regiones del país.

Palabras clave: BOVINOS, PARATUBERCULOSIS, MAP, iELISA

Abstract

In the present study, the prevalence, geographical distribution and risk factors of bovine paratuberculosis, caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, in 5 provinces of Ecuador. In total, 430 bovine sera from 170 herds were analyzed; A serological diagnosis was carried out by applying the ELISA – paratuberculosis Screening kit from the commercial company IDEXX, obtaining a general prevalence of 2,33% (10/430) per animal and 5,88% (10/170) per herd. At the regional level, the Coast had the highest prevalence with 3,18%, followed by the Sierra with 2,08% and the Amazon with 1,23%. The provinces under study were Manabí with a prevalence of 3,03%, Santo Domingo de los Tsáchilas with 4,00%, Pichincha with 2,08% and Napo with 2,63%; in Orellana there was no prevalence of the disease. Furthermore, no association was determined between the variables farm size, sampling area (region and province) with the presence of the disease ($p>0,05$), through a statistical analysis: Chi-square and Odds Ratio (OR). Also, the epidemiological measures of: relative risk (RR), attributable risk (AR) and etiological fraction of the population (FEP) of the breed, age and sex of the animal were calculated; determining race and age as risk factors with RR values of 1,5 and 1,44, RA of 2% and 0,8% for each variable respectively, and an FEP of 27% for age. Finally, georeferencing maps of positive paratuberculosis cases were made, where it was observed that the disease is distributed in the 3 regions of the country.

Keywords: BOVINE, PARATUBERCULOSIS, MAP, iELISA

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Antecedentes

La paratuberculosis o enfermedad de Johne, es una enfermedad que afecta al tracto intestinal de los rumiantes, causada por *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis* (MAP) (Cocito *et al.*, 1994). MAP es una bacteria Gram positiva, alcohol ácido-resistente, que posee resistencia térmica, y puede sobrevivir en superficies hasta por un año (Oña *et al.*, 2015).

Existen varias cepas de MAP de las cuales la cepa C se encuentra principalmente en bovinos, mientras que, la cepa S se presenta en ovejas y cabras (Escobar, 2018). La transmisión se produce comúnmente por vía fecal-oral, lactancia o intrauterina (Sweeney, 2011). La enfermedad en su fase clínica se manifiesta con una baja en la producción de leche, pérdida de peso, edema intermandibular, caquexia y diarrea crónica (Oña *et al.*, 2015).

En América Latina, la presencia de paratuberculosis ha sido reportada en varios países como Brasil, Argentina, Chile, Colombia, México, Perú, Venezuela, Panamá y Bolivia; detectando el agente causal en bovinos, caprinos, ovinos y búfalos (Espescht *et al.*, 2017). La paratuberculosis representa grandes pérdidas económicas a nivel mundial, debido a la baja en la producción de leche, la pérdida de peso y finalmente la muerte del animal (Escobar, 2018).

En Colombia, el estudio más reciente sobre paratuberculosis bovina realizado por Guzmán *et al.* (2023), determinaron una prevalencia de 52,4% por animal y 100% por hato, mediante la prueba de Ensayo por inmunoadsorción indirecto (iELISA). Otras investigaciones realizadas en Boyaca (Bulla Castañeda *et al.*, 2020) y Antioquia (Correa Valencia *et al.*, 2022) determinaron prevalencias de 10,9% y 14,9% respectivamente, con el uso de técnicas iELISA y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

En Ecuador, la prevalencia de paratuberculosis bovina a nivel nacional es de 1,75% por animal y 9,5% por hato, siendo la región Litoral la zona con mayor prevalencia 2,05%, seguido de la región Sierra con 1,64%, región Insular con 1,32% y región Amazónica con 1,00%,

prevalencias determinadas a través de la prueba iELISA (Guamán, 2017). Aunque en el país *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis* fue aislada e identificada por Escobar (2018), en el país no existen medidas de control y/o prevención para la enfermedad.

Justificación

En Ecuador, la ganadería tiene un rol importante en la economía del país, en el año 2021 se estimó un total de 4 millones de cabezas de ganado del total nacional. La región Sierra es la que mayor número de animales presenta, con 2´110.973 bovinos, seguida de la región Costa con 1´591.390 bovinos y la región Amazónica con 364.567 bovinos. Las principales provincias ganaderas son: Manabí con 862.482 animales, seguido de Azuay con 349.817 animales, Chimborazo con 282.085 bovinos, Pichincha con 279.929 animales y Esmeraldas con 272.110 animales (Estadísticas Agropecuarias [ESPAC], 2021).

La producción de leche en el 2021 fue de 5´699.046 litros diarios, de los cuales 4´262.896 litros son destinados a venta líquida, y 385.079 litros para el consumo en los terneros (ESPAC, 2021). Para el año 2023, el precio de la leche para el productor se sitúa en \$0,42 el litro, lo que representa grandes ganancias en la economía del sector rural (Ministerio de Agricultura y Ganadería [MAG], 2023).

La paratuberculosis bovina es una enfermedad de gran impacto económico, ya que, genera un descenso en la producción de leche, enflaquecimiento de los animales y finalmente la muerte del mismo, lo que repercute en grandes pérdidas económicas. Además, se asocia a la enfermedad como una posible zoonosis por su relación con la enfermedad de Crohn en humanos (Organización Mundial de Sanidad Animal [OMSA], 2023).

Actualmente, no se dispone de información actualizada de la prevalencia y factores de riesgo de la paratuberculosis bovina en las 3 regiones del Ecuador continental.

Debido a que la paratuberculosis es una enfermedad de declaración obligatoria en el Ecuador (Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario [AGROCALIDAD], 2022), y a la importancia de establecer estrategias de control y prevención de esta enfermedad, es

fundamental ampliar las investigaciones sobre paratuberculosis bovina, por lo que en el presente proyecto se encaminó a determinar la prevalencia, distribución geográfica y los factores de riesgo en una sub muestra de sueros bovinos del banco de biológicos del proyecto BruTryp, proveniente de 5 provincias de Ecuador (Manabí, Santo Domingo de los Tsáchilas, Pichincha, Napo y Orellana).

Objetivos

Objetivo General

Determinar la prevalencia, distribución geográfica y factores de riesgo de la paratuberculosis bovina, de una sub muestra del banco de biológicos de proyecto BruTryp, proveniente de 5 provincias de Ecuador.

Objetivos específicos

Establecer la prevalencia de paratuberculosis bovina de una sub muestra del banco de biológicos del proyecto de vinculación BruTryp, proveniente de las provincias de Manabí, Santo Domingo de los Tsáchilas, Pichincha, Napo y Orellana, mediante la aplicación del kit ELISA – Paratuberculosis Screening, de la casa comercial IDEXX.

Determinar la distribución geográfica de paratuberculosis bovina, mediante la generación de mapas en el programa Qgis, de puntos GPS recolectadas en el Proyecto BruTryp mediante la aplicación Epicollect5.

Determinar los factores de riesgo de paratuberculosis bovina, mediante el análisis de encuestas epidemiológicas aplicadas a productores agropecuarios, durante la ejecución del proyecto BruTryp.

Hipótesis

Hipótesis nula

La prevalencia de paratuberculosis en bovinos es nula o baja en la zona de muestreo construida por las provincias de Manabí, Santo Domingo de los Tsáchilas, Pichincha, Napo y Orellana.

Hipótesis de investigación

La prevalencia de paratuberculosis en bovinos es alta en la zona de muestreo construida por las provincias de Manabí, Santo Domingo de los Tsáchilas, Pichincha, Napo y Orellana.

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

Generalidades de la Paratuberculosis bovina

Agente causal

La paratuberculosis bovina es una enfermedad causada por *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (MAP), una bacteria ácido-alcohol resistente conocida anteriormente como *M. johnei* (Center for Food Security y Public Health [CFSPH], 2007) MAP fue descrita por primera vez en 1894 en Alemania por el Dr. H.A. Johne, que aisló e identificó el organismo (OMSA, 2023).

Mycobacterium avium subespecie *paratuberculosis* es una micobacteria obligada, Gram positiva, cuyo tamaño oscila entre 0,5 y 1,5 μm , fenotípicamente se caracteriza por la formación de colonias rugosas y no pigmentadas (Castellanos *et al.*, 2010).

MAP pertenece al género *Mycobacterium*, grupo que se caracteriza por presentar una pared celular con un alto porcentaje de lípidos (40%), porcentaje mayor al que se presenta en otras bacterias Gram positivas (5%) e incluso mayor al de las Gram negativas (10%); además, tiene alto contenido de G + C en su genoma, esto le confiere al grupo la propiedad de ácido-alcohol resistencia (Castellanos *et al.*, 2010).

MAP también forma parte del complejo *Mycobacterium avium* (MAC), este grupo de micobacterias presentan un crecimiento lento (mayor a 7 días), son capaces de crecer a temperaturas de 20°C hasta 37°C, en amplios rangos de pH, desde 4 a 7,5 (Castellanos *et al.*, 2010). Sin embargo, esta subespecie a diferencia del resto de miembros del complejo presenta genes únicos como IS900 y hspX (Lavers, 2013).

Se distinguen 2 tipos principales de MAP, el tipo II o cepa C que infecta a bovinos, rumiantes silvestres y no rumiantes y el tipo I o cepa S, que se encuentra principalmente en ovinos y otros rumiantes pequeños; estas cepas se distinguen por polimorfismo de longitud de fragmentos (CFSPH, 2007).

Taxonomía

Tabla 1

Descripción de la taxonomía de Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis

Reino	Bacteria
Phylum	Actinomycetota
Clase	Actinomycetes
Orden	Mycobacteriales
Familia	Mycobacteriaceae
Género	<i>Mycobacterium</i>
Especie	<i>Mycobacterium avium</i>
Subespecie	<i>paratuberculosis</i>

Nota. Clasificación ordenada y jerarquizada de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*. Recuperado de (National Center for Biotechnology Information [NCBI], 2023).

Patogenia y signos – síntomas

La paratuberculosis es una enfermedad crónica en los rumiantes, los principales síntomas son diarrea, debilitamiento y finalmente muerte por caquexia, sin embargo, solo algunos portadores llegan a presentar síntomas visibles después de varios años, la mayoría de animales son solo portadores y no presentan sintomatología; generalmente la temperatura y apetito suelen ser normales y los animales están alerta (CFSPH, 2007).

MAP tiene periodos de incubación extensos que oscilan entre 4 meses a 15 años. Los signos clínicos se presentan en animales de 2 a 6 años de edad, los síntomas iniciales son leves como pérdida de peso, disminución de la producción de leche y pelaje áspero (CFSPH, 2007). Sin embargo, Sweeney (2011) menciona que los animales jóvenes son más susceptibles a infectarse, generalmente en los primeros meses o incluso en los primeros días de vida, debido a que el intestino permanece abierto (permeable) en las primeras 24 horas de vida, facilitando el ingreso de MAP.

Cuando la bacteria ingresa al organismo del animal por ingestión, es absorbida por las células M ubicadas sobre las placas intestinales de Peyer, lo que genera atrofia de las vellosidades y el engrosamiento de la pared intestinal, causando 2 tipos de lesiones; 1) multibacilar y 2) paucibacilar, que provocan pérdidas de proteínas plasmáticas, y alteraciones en la absorción de nutrientes (Guamán, 2017). Como resultado de las lesiones, se observa una enteritis granulomatosa crónica y linfadenitis en los rumiantes (Bulla *et al.*, 2020).

Al inicio de la infección se da una respuesta inmune mediada por células (linfocitos Th); cuando la inmunidad celular disminuye, se inicia la inmunidad humoral (entre 10 a 17 meses posts-infección) con producción de anticuerpos; en bovinos el anticuerpo producido por la infección es la inmunoglobulina G (IgG) (Guamán, 2017). En la fase clínica de la enfermedad se presentan concentraciones detectables de anticuerpos en Ensayo por inmunoadsorción ligado a una enzima (ELISA) comercial (Escobar, 2018).

El principal síntoma de la paratuberculosis es la diarrea, que en una fase leve es intermitente, sin embargo, elimina al patógeno en las heces; conforme va avanzando la enfermedad la diarrea es más constante; se caracteriza por ser espesa, mucosa o con restos epiteliales y sin sangre, lo que hace que los animales infectados se vuelvan cada vez más delgados y finalmente mueran por deshidratación y caquexia (CFSPH, 2007).

Se distinguen 4 fases o etapas del desarrollo de la enfermedad:

Fase I. Infección siliente. Esta fase se presenta en animales jóvenes (terneros y novillas) no se muestran signos clínicos, los animales son portadores de la enfermedad, pero no hay detección del patógeno en heces (Castellanos *et al.*, 2010).

Fase II. Fase subclínica. Se presenta generalmente en animales adultos que son portadores de MAP, pero no presentan sintomatología; sin embargo, presentan anticuerpos circulantes y los animales excretan el patógeno en bajas cantidades y de manera intermitente (Castellanos *et al.*, 2010).

Fase III. Fase clínica. Los animales presentan signos clínicos como pérdida de peso, baja en la producción, pelo áspero y diarrea, los cuales se presentan tras varios años de infección por MAP (Castellanos *et al.*, 2010).

Fase IV. Fase clínica avanzada. Los animales se presentan en estado de letargo, enflaquecimiento y diarrea severa. Además, se observa un edema ventral y submandibular debido a la hipoproteinemia (Castellanos *et al.*, 2010).

Tabla 2

Estadios clínicos de la paratuberculosis

Etapa	Desprendimiento de Micobacterias	Reactividad inmune		Síntomas clínicos
		Humoral	Celular	
I	Indetectable	Bajo	Alto	Ausente
II	Medio	Medio	Medio	Ausente
III	Alto	Alto	Bajo	Presente*

Nota. I, asintomático, no excretor; II, asintomático, excretor; III, sintomático, excretor; *, deterioro de la lactancia, del aumento de peso y de la reproducción; diarrea; anorexia, caquexia y muerte. Recuperado de (Cocito *et al.*, 1994) .

Los animales pueden pasar de la fase II (fase subclínica) a la fase IV (fase clínica avanzada) en tan solo pocas semanas, esto se debe a que MAP puede estar presente en el tracto gastrointestinal de animales infectados durante años sin causar síntomas, hasta que llegan factores de estrés como la lactancia o una elevada carga animal que hacen que los signos se manifiesten (Castellanos *et al.*, 2010).

Ciclo evolutivo y vía de transmisión

Mycobacterium avium subesp. *paratuberculosis* se transmite comúnmente por vía oral-fecal, los animales infectados eliminan la bacteria a través de las heces, que sobrevive en el medio ambiente durante largos periodos (Sweeney, 2011). MAP permanece en estado latente en las pasturas y otras superficies, representando un riesgo por ingestión para los animales en pastoreo (Lavers, 2013).

Cuando el animal ingiere MAP, la bacteria entra al organismo a través de las tonsilas (amígdalas), dentro del organismo, atraviesa la pared intestinal y es fagocitada por los

macrófagos, lugar en donde sobrevive a la degradación y empieza a replicarse. Finalmente, los macrófagos migran hacia los nódulos linfáticos regionales, desencadenando una inflamación del intestino (Lavers, 2013). Conforme avanza la enfermedad, los fagocitos infectados se extienden a otras partes del cuerpo, siendo detectados en sangre, hígado, nódulos retrofaríngeos, riñones, bazo, pulmones, ubres, útero, testículos, epidídimo y semen (Escobar Chamba, 2018), también se ha aislado MAP del calostro, leche, ubres y tracto reproductivo de machos y hembras (CFSPH, 2007).

MAP es un patógeno intracelular obligado y no puede replicarse fuera del huésped, sin embargo, puede sobrevivir en el ambiente por largos periodos de tiempo, hasta más de un año en el medio ambiente si está protegido de la luz solar (Lavers, 2013). Se ha encontrado a la bacteria viable hasta por una semana en la orina y hasta por 8 -11 meses en las heces bovinas (CFSPH, 2007). De igual manera, esta micobacteria se puede mantener durante un año en el agua, y se ha detectado MAP viable en polvo sedimentado en establos lecheros (Lavers, 2013).

Tabla 3

Supervivencia de Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis en el medio ambiente

Lugar	Tiempo
Orina	1 semana
Heces	8 – 11 meses
Agua	12 meses
Ambientes secos y sombríos	14 meses

Nota. Tiempo y lugares de supervivencia de *Mycobacterium avium* subesp, *paratuberculosis* en el medio ambiente. Adaptado de (Escobar, 2018).

Las micobacterias son resistentes al calor, congelación o desecación, pH ácidos o alcalinos, y agentes químicos; sin embargo, son sensibles a la luz ultravioleta (Lavers, 2013).

Los animales jóvenes, son los más susceptibles a contraer la enfermedad, cuando se encuentran en corrales contaminados, cuando se amamantan de una ubre sucia con heces o por ingestión de alimentos o agua con heces (Sweeney, 2011); incluso, se pueden infectar cuando beben leche o calostro contaminados, y por transmisión horizontal entre terneros

alojados en el mismo corral (CFSPH, 2007). También, se ha presentado transmisión vertical vía intrauterina, de la vaca infectada al feto (Sweeney, 2011).

A continuación, se presentan las vías de transmisión de MAP:

Transmisión fecal-oral. La vía de transmisión más común para la infección por MAP, es mediante la ingestión de la bacteria en alimentos, leche, calostros o agua contaminados con heces. Los ambientes contaminados como pasturas y corrales también son fuente en donde el animal puede ingerir la bacteria (Lavers, 2013). Los animales infectados excretan la bacteria en sus heces, hasta 10^{12} UFC (unidades formadoras de colonias) por gramo de materia fecal, lo que genera mayor contaminación del ambiente (Fernández, 2016).

Transmisión intrauterina. Se puede dar una transmisión vertical de MAP, las vacas infectadas transmiten la bacteria al feto a través del útero y placenta, cuando la bacteria se dispersa en los tejidos del cuerpo penetra la placenta e infecta a los fetos (Cárdenas y Peñaloza, 2017). Se ha aislado MAP del endometrio de hembras gestantes, sin embargo, no provoca abortos (Zapata *et al.*, 2008).

Generalmente las infecciones intrauterinas se producen de animales en la fase clínica avanzada, que tienen grandes cargas bacterianas de MAP, por lo que la posibilidad de una infección congénita es de 20% a 40% (Cárdenas y Peñaloza, 2017).

Transmisión por lactancia. A medida que avanza la infección por MAP, el animal excreta la bacteria directamente en la leche o el calostro (Collins y Manning, 2023). Se ha aislado MAP de la glándula mamaria, el 35% de vacas con signos clínicos elimina la bacteria en la leche (CFSPH, 2007).

Transmisión por semen. Ayele *et al.* (2004) en su estudio, determinaron que toros infectados con MAP en etapa subclínica, liberaron a la micobacteria en el semen, siendo esta otra vía de transmisión de la enfermedad. La diseminación se puede dar a través de monta natural o por la inseminación artificial, ya que, la bacteria es muy resistente a los antibióticos y la temperatura, afectando al entorno uterino de las vacas (Fernández, 2016).

Transmisión por vectores. Otras vías de transmisión puede ser los insectos que actúan como vectores mecánicos (CFSPH, 2007). Además, el comercio de animales infectados es la principal forma de diseminación de la enfermedad (Cárdenas y Peñaloza, 2017).

Se conoce poco sobre la transmisión de MAP en especies no rumiantes, sin embargo, la depredación es una posible vía de propagación en los animales silvestres (Castellanos *et al.*, 2010). Es importante indicar que es posible la transmisión entre especies rumiantes y no rumiantes, por lo que, la fauna silvestre puede propagar MAP entre granjas (CFSPH, 2007).

Hospedadores y reservorios

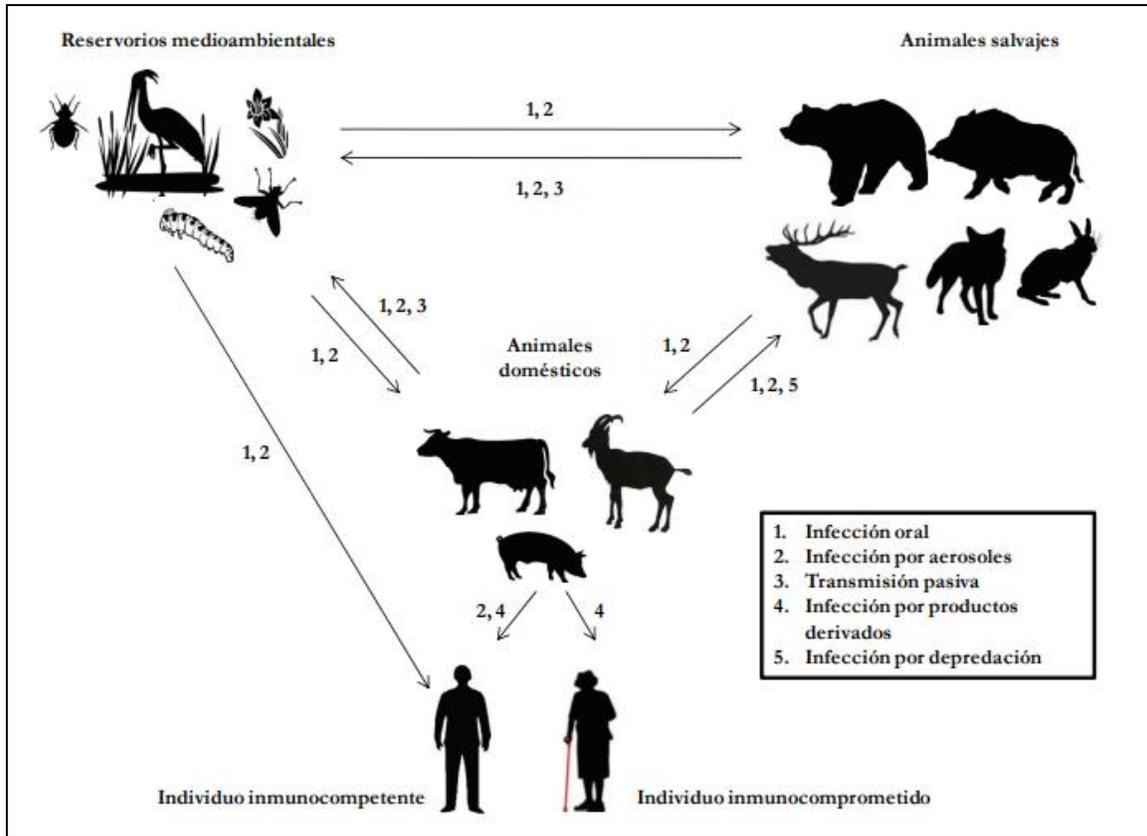
Mycobacterium avium subespecie *paratuberculosis* afecta generalmente a especies rumiantes principalmente a bovinos y ovinos, dentro de los animales infectados vive en los macrófagos alojándose en el intestino (Quinn *et al.*, 2011).

MAP también puede infectar a una amplia variedad de especies animales rumiantes y no rumiantes como: caprinos, camélidos, lagomorfos, búfalos, ciervos, renos, primates y carnívoros silvestres (Retamal *et al.*, 2011). De igual manera, se ha aislado MAP de gatos, zorros, armiños, comadreja, tejón europeo, osos, mapaches, armadillos, zarigüeyas, ratones y ratas e incluso en aves (CFSPH, 2007)

Los reservorios naturales de MAP pueden ser animales silvestres o domesticados como: conejos silvestres, ovejas y cerdos que mediante sus excretas pueden diseminar la bacteria (Zapata Restrepo *et al.*, 2008). También se ha aislado MAP de protozoos, lombrices de tierra, dípteros, cucarachas, en estos organismos lleva a cabo un estado de vida intracelular con iguales mecanismos de virulencia de infección del macrófago hasta llegar a la célula objetivo del hospedero animal (Retamal *et al.*, 2011).

Figura 1

Hospederos, reservorios y vías de trasmisión de MAP



Nota. Detalle de vías de trasmisión, hospederos y reservorios de MAP. Recuperado de (Castellanos *et al.*, 2010).

Importancia

Económica

La paratuberculosis genera grandes pérdidas económicas directas desde el descenso en la producción de leche, bajo rendimiento a la canal y finalmente la muerte del animal (Jorge *et al.*, 2005).

En un estudio realizado por Kudahl y Nielsen (2009), en donde se diagnosticó bovinos positivos para paratuberculosis por medio de la prueba de cultivo fecal, se observó que los animales infectados con MAP presentaron disminución de peso del 15%, por ende, el valor al sacrificio se redujo en un 31%, en comparación con animales que no se encontraban

infectados. En el mismo estudio, los animales que presentaron signos histológicos como enteritis o edemas, redujeron su peso en un 20% y su valor al sacrificio en 48%.

Los animales infectados de forma asintomática, también presentan pérdidas en la producción, CFSPH (2007) calcula que los portadores asintomáticos producen 15-16% menos de leche, con pérdidas aproximadas de 590 a 1270 kg de leche por lactancia. También, se ha presentado hasta un 25% de reducción en la producción de leche en vacas asintomáticas en la primera lactación (Jorge *et al.*, 2005). Este descenso productivo de la leche, representa pérdidas económicas anuales del 1% en los ingresos brutos por leche en hatos infectados con paratuberculosis, es decir, una pérdida económica de US\$ 33 por vaca infectada; en Estados Unidos se calcula pérdidas de US\$ 198 millones anuales, US\$ 75 millones en Alemania, US\$ 56 millones en Francia, US\$ 54 millones en Nueva Zelanda y US\$ 28 millones en Canadá (Rasmussen *et al.*, 2021).

También se registran pérdidas económicas en el consumo de alimento por parte de los animales, ya que, esta enfermedad afecta la absorción de nutrientes, el alimento no es aprovechado por el animal, por lo que, hay una disminución de la condición corporal a medida que la enfermedad avanza (Jorge *et al.*, 2005).

Salud pública

La paratuberculosis bovina es vista como una enfermedad zoonótica, debido a que, se la relaciona con la Enfermedad de Crohn (EC) en los humanos; el agente causal de la paratuberculosis *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis* ha sido detectado en algunos pacientes con la enfermedad de Crohn (OMSA, 2023), siendo, la sintomatología y la fisiopatología similar entre ambas enfermedades (Retamal *et al.*, 2011).

La enfermedad de Crohn es una enteritis crónica de los humanos, que se caracteriza por periodos de malestar, dolor abdominal, pérdida de peso y diarreas crónicas, que generalmente comienza entre los 16 y 25 años, que persiste toda la vida (CFSPH, 2007),

observándose lesiones granulomatosas, por la proliferación de las células endoteliales y una obstrucción de los vasos sanguíneos linfáticos (Retamal *et al.*, 2011).

No se ha demostrado que MAP sea el agente causal de la enfermedad de Crohn (OMSA, 2023), por lo que, aún se desconoce la causa de la enfermedad; puede ser el resultado de varios factores como la genética, la respuesta inmunológica anormal y factores ambientales que predisponen a la enfermedad (CFSPH, 2007).

Restricciones de movilización de animales y/o sub productos

Debido a que MAP podría afectar al humano, se ha profundizado en el control de la leche y los derivados lácteos que pueden ser fuente de contaminación para las personas, esto con el fin de minimizar la exposición humana a la micobacteria y proteger a los consumidores contra el posible riesgo de infección (Benavides *et al.*, 2015).

Algunas fuentes de infección de la paratuberculosis en humanos es el consumo de leche cruda o de subproductos como queso hecho con leche sin pasteurizar, también la ingesta de agua contamina con heces de bovinos infectados (De Waard, 2010).

Un estudio realizado por Cirone *et al.*, (2022) en donde analiza la calidad de 384 muestras de leche pasteurizada a la venta, identificó a la micobacteria en 1,56% de las muestras analizadas que resultaron positivo para MAP en la prueba IS900-PCR. También se analizó la calidad del yogurt y de queso, sin que se haya encontrado la presencia de MAP en los subproductos, por lo que, se determinó que la leche pasteurizada y los subproductos no son fuentes significativas de transmisión del patógeno a los humanos.

Pruebas diagnósticas

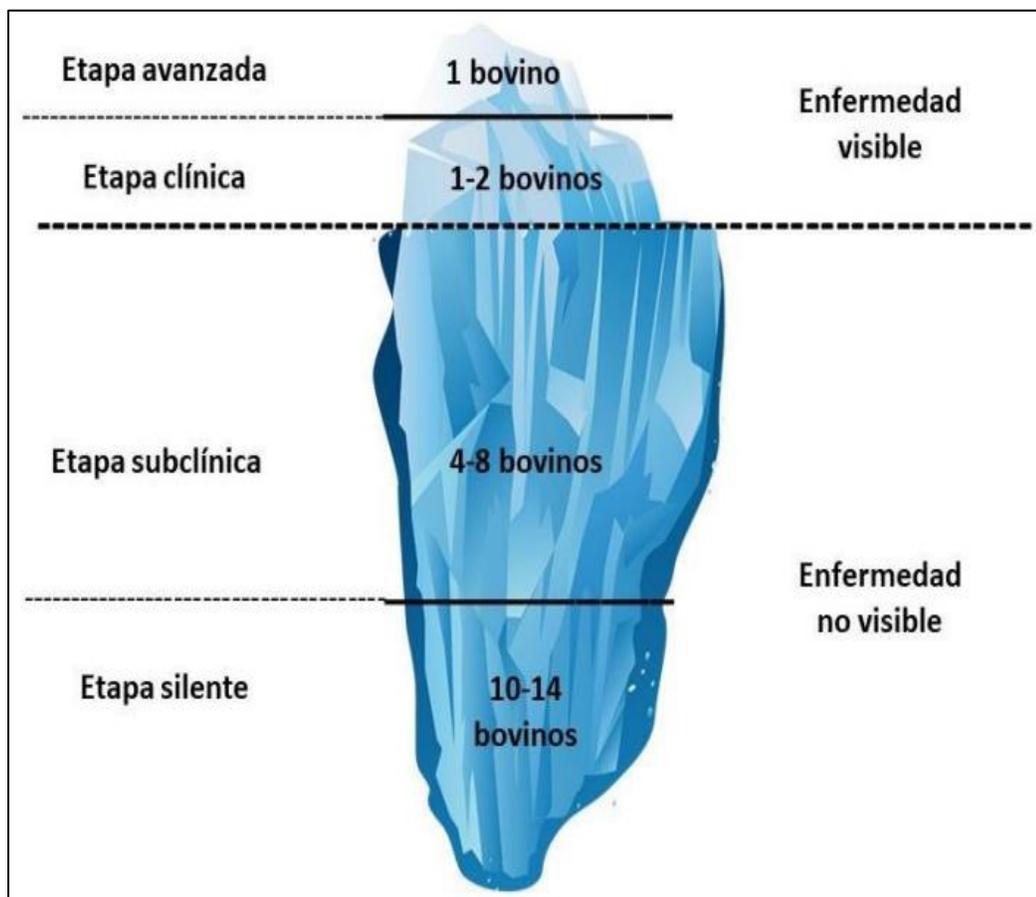
La infección por MAP puede estar presente en un predio sin ser detectado durante años, generalmente la infección se produce en los primeros años de vida del animal, pero se manifiesta a partir de los 2 a 4 años de edad (CFSPH, 2007) . La identificación de bovinos infectados con MAP es un desafío completo, ya que, solo el 25 al 30% de animales infectados

son detectados mediante las pruebas diagnósticas presentándose el fenómeno “iceberg” (Fernández, 2016).

El fenómeno iceberg consiste en que solo los animales infectados que se encuentran en la etapa clínica de la enfermedad son diagnosticados mediante métodos tradicionales, formando la punta del iceberg, mientras que, la mayoría de animales que tienen la enfermedad y no son identificados se encuentran en la base del iceberg (Fernández, 2016).

Figura 2

Fenómeno del iceberg de la Paratuberculosis bovina



Nota. Enfermedad visible (punta del iceberg), enfermedad no visible (base del iceberg). Recuperado de (Sánchez, 2019).

Los métodos de diagnóstico se clasifican en métodos directos, aquellos que detectan el organismo; y como métodos indirectos, aquellos que evalúan la respuesta inmune del huésped a la infección (Escobar, 2018).

Métodos directos

Entre los métodos directos para la detección de paratuberculosis bovina se encuentran:

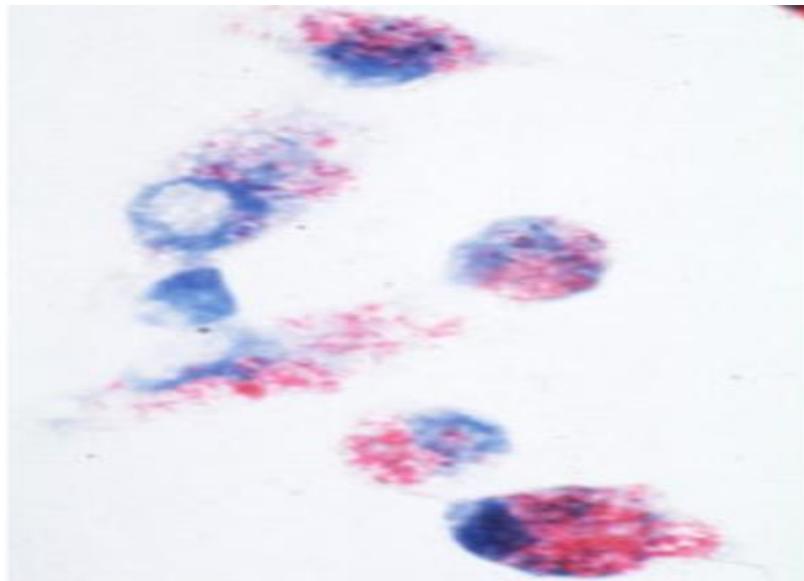
Diagnóstico histopatológico. Es un método post-mortem para la detección de paratuberculosis, en donde se inspecciona la mucosa del íleon terminal, en donde se observa plegamiento y engrosamiento de los vasos linfáticos, además se puede visualizar las placas discontinuas y ganglios calcificados (OMSA, 2018).

Tinción Ziehl-Neelsen. La tinción se realiza en un frotis obtenido de la mucosa intestinal o de las heces, en donde se observa agregados bacterianos (de tres a más microorganismo) de bacterias ácido-alcohol resistentes, sin embargo, esta prueba no es específica, ya que, se puede confundir con otras micobacterias (Lavers, 2013).

MAP resulta positivo a la tinción de Ziehl-Neelsen (ácido-alcohol resistente) debido a que en su pared contiene gran cantidad de ácidos micólicos que se colorean con fuscina y resisten la decoloración con alcohol ácido (Cocito *et al.*, 1994).

Figura 3

Tinción Ziehl-Neelsen de Mycobacterium avium supesp. paratuberculosis



Nota. Bacterias MAP (teñidas de rojo) que crecen dentro de los glóbulos blancos del huésped (teñidas de azul). Recuperado de (Collins y Manning, 2023).

Cultivo de material fecal. El cultivo fecal es la prueba diagnóstica más sensible y específica ante-mortem para detectar paratuberculosis, se usa como prueba de referencia (gold standard) (Lavers, 2013); sin embargo, este método es de crecimiento lento, debido a que, las colonias primarias de MAP suelen aparecer entre 5 a 6 meses después de la inoculación, y resulta una técnica muy costosa (OMSA, 2018).

Este método es capaz de detectar entre 30 – 40% de animales con la enfermedad, ya que, detecta solo a animales infectados en etapa clínica avanzada, los animales en esta etapa excretan más de 100 UFC/ gramo de heces, y detecta muy pocos animales en los estadios iniciales (Castellanos *et al.*, 2010). La OMSA (2018) menciona que, mediante el cultivo de heces se puede detectar animales infectados 6 meses antes de que presenten signos clínicos.

El crecimiento de MAP se caracteriza por ser lento, ya que su tiempo de duplicación va entre 22 y 26 horas; esta micobacteria no produce micobactina quelante de hierro, por lo que requiere de medios enriquecidos con piruvato de sodio y micobactina J para su desarrollo (Lavers, 2013). Los medios adecuados para el crecimiento de MAP son el de yema de huevo de Herrold (HEYM), medio Lowenstein-Jensen y los medios Middlebrook 7H9, 7H10 y 7H11 (Castellanos *et al.*, 2010). En el medio de Herrold, las colonias inicialmente son muy pequeñas, incoloras, semiesféricas y translúcidas, con márgenes redondos parejos y una superficie lisa y brillante. Con el tiempo, las colonias se vuelven más grandes, más opacas y ásperas (CFSPH, 2007) . Además, se debe realizar un pretratamiento de las muestras, con el uso de ácido oxálico y NaOH o el uso de cloruro de hexadecilpiridinio (HPC) para la descontaminación de otras bacterias y hongos (OMSA, 2018).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Es un método mucho más rápido y fácil que el cultivo (Lavers, 2013). Las sondas de PCR pueden detectar a MAP e incluso diferenciarlo de otras especies de mycobacterium (CFSPH, 2007). La PCR está dirigida a fragmentos específicos de la secuencia de MAP siendo la más utilizada IS900, por lo que esta prueba tiene 100% de sensibilidad y especificidad (Escobar, 2018).

Actualmente, esta técnica ha sido muy empleada para detectar MAP, por lo que, se dispone de PCR comerciales para muestras de leche y heces, que permiten identificar rápidamente las cepas aisladas (OMSA, 2018). También se ha utilizado electroforesis de campo y polimorfismo de longitud de fragmentos para diferenciar las cepas C y S de MAP (CFSPH, 2007).

Métodos indirectos

Entre los métodos indirectos para la detección de paratuberculosis bovina se encuentran:

Prueba de intradermoreacción. Esta técnica detecta la respuesta celular *in vivo*, y consiste en la inoculación de un derivado proteico purificado (PPD) aviar o johnina intradérmica en la tabla de cuello del animal, a las 48 horas después se observa si existe una respuesta local de hipersensibilidad retardada (Escobar, 2018). Esta respuesta se observa en el aumento en tamaño de la inflamación dejada por la prueba, es así que si esta inflamación aumenta en 2 mm a las 48 horas el resultado es positivo (Buitrago *et al.*, 2021). Sin embargo, la especificidad y sensibilidad de esta prueba son bajas, debido a que se puede producir reacciones cruzadas con otras micobacterias, resultando en falsos positivos (Escobar, 2018).

Prueba de liberación de interferón gama (IFN- γ). Esta prueba se basa en la detección cuantitativa del interferón gama (IFN- γ) en plasma de bovinos, la liberación de IFN- γ se da a partir de linfocitos sensibilizados con antígeno específico, ya sea, derivado proteico purificado (PPD) aviar o johnina. La cuantificación del IFN- γ se la realiza a través de un Ensayo de inmunoadsorción (ELISA) tipo sándwich, con el uso de anticuerpos monoclonales (OMSA, 2018). La sensibilidad de esta prueba es de 85%, mientras que, la especificidad es de 94% para el diagnóstico en ganado bovino (Nielsen y Toft, 2008).

Fijación del complemento (CF). Esta técnica consiste en la activación del complemento, dado por la unión antígeno-anticuerpo, si el complemento se une a eritrocitos se produce complejos de ataque de membrana provocando hemólisis, si esta se presenta el animal es negativo, mientras que, si no se presenta hemólisis el animal es positivo, debido a la fijación del complemento (OMSA, 2018). Generalmente se usa esta prueba diagnóstica para detectar animales altamente infectados, sin embargo, esta prueba presenta baja sensibilidad y produce falsos positivos (Whitlock *et al.*, 2000).

Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA). La técnica ELISA (en inglés Enzyme linked inmunosorbente assay) es la prueba más sensible y específica para la detección de anticuerpos contra MAP en el ganado bovino (OMSA, 2018); además, tiene un tiempo de respuesta rápido 1 día y es de costo aceptable (Lavers, 2013).

Esta prueba mide los niveles de anticuerpos (IgG) presentes en suero o en leche usando enzimas ligadas, cuantifica la presencia de estos anticuerpos a través de la densidad óptica (Lavers, 2013). El color desarrollado, medido por espectrofotometría, a una longitud de onda específica, es proporcional a la cantidad de anticuerpo presente en la muestra (OMSA, 2018).

Actualmente, los kits comerciales han descrito nuevos antígenos y anticuerpos para aumentar la sensibilidad y especificidad de la prueba (Castellanos *et al.*, 2010), es así que, como primer paso se usa un extracto de *Mycobacterium phlei* para neutralizar posibles reacciones cruzadas con otras micobacterias, lo que hace a la prueba más específica (Lavers, 2013).

Se ha determinado que la sensibilidad del ELISA depende de la fase de la enfermedad y la edad del animal (OMSA, 2018). Jubb *et al.*, (2004) determinaron una sensibilidad entre 20 y 30% en grupos con animales adultos, mientras que, la sensibilidad para animales de 2, 3 y 4 años fue de 1,2, 8,9 y 11,6% respectivamente. Por lo contrario, Nielsen y Toft, (2008)

mencionan que las sensibilidades del ELISA en el ganado bovino están entre el 24 y 94%, y la especificidad entre el 40 y 100%.

También se ha probado el diagnóstico de paratuberculosis, mediante la aplicación del test ELISA con muestras de leche, es así que, Collins *et al.* (2005) determinó 60-70% de muestras de leche positivas para ELISA, cuando el animal se encuentra en la fase clínica y elimina grandes cantidades de la micobacteria en las heces, mientras que, determinó 5-30% de leche con prueba ELISA positiva en animales que eliminan la bacteria de forma intermitente. Los valores antes indicados se deben a que la respuesta de anticuerpos y la eliminación de la bacteria no se dan de manera simultánea, por lo que un resultado positivo ELISA en leche puede ocurrir antes o después de la excreción de MAP (Lavers, 2013), por lo que, Nielsen y Toft, (2008) en su estudio presentan una sensibilidad del ELISA para leche, en ganado bovino, entre 21-61%, y las especificidades en el 83-100%.

Inmunodifusión en gel de agar (AGID). Se usa generalmente para la confirmación de paratuberculosis en ganado caprino, ovino y en bovinos, esta prueba identifica a animales en fase clínica que presentan anticuerpos, por lo que su aplicación en el diagnóstico de animales subclínicos es reducida, sin embargo, presenta mayor sensibilidad y especificidad en comparación con el test de fijación del complemento (FC) (Castellanos *et al.*, 2010).

Esta técnica se basa en la reacción antígeno-anticuerpo en geles de agarosa, el antígeno empleado es un extracto protoplásmico de la cepa de *M. avium* 18, el antígeno se añade en el centro de los pocillos, mientras que los sueros, el control positivo y el control negativo se añaden en los pocillos periféricos alternos. Después de 24 y 48 horas se examinan los geles para comprobar la presencia de líneas de precipitación, la aparición de una o más líneas de precipitación claramente definidas se interpreta como un resultado positivo, mientras que, la ausencia de líneas de precipitación es considerado como un resultado negativo (OMSA, 2018).

La capacidad de detección de las pruebas diagnósticas depende de la etapa de la enfermedad en la que se encuentra el animal Tabla 4.

Tabla 4

Pruebas diagnósticas para identificar Mycobacterium avium subesp. paratuberculosis en bovinos

Tipo de ensayo	Fase I	Fase II	Fases III y IV
Signos clínicos de la enfermedad	No	No	Si
Cultivo de heces	No	En ocasiones	Si
PCR	No	En ocasiones	Si
Tinción de ácido -alcohol resistencia	No	En ocasiones	Si
IFN- γ	En ocasiones	Si	En ocasiones
Serología	No	En ocasiones	Si

Nota. PCR: Reacción en cadena de la polimerasa, IFN- γ : Prueba de liberación de interferón gama. Recuperado de (Castellanos *et al.*, 2010).

Tabla 5

Sensibilización y especificidad de pruebas diagnósticas para identificar Mycobacterium avium subesp. paratuberculosis utilizadas en bovinos

Prueba	Estado de la enfermedad que diagnostica	Sensibilidad potencial	Especificidad potencial
ELISA en suero	Subclínica, clínica	<40% - >70%	40% - >70%
Reacción intradérmica	Silente, Subclínica	40% - >70%	40% - 70%
Interferón gamma	Silente, Subclínica	Desconocida	Desconocida
Frotis fecal	Subclínica, clínica	<40%	<40% - 70%
Cultivo fecal	Todas las etapas	<40% - >70%	>70%
PCR fecal	Todas las etapas	40% - >70%	>70%
Cultivo tisular	Todas las etapas	>70%	>70%
Patología	Clínica	<40% - 70%	<40% - >70%
Histopatología	Subclínica, clínica	<40% - >70%	<40% - >70%
Signos clínicos	Clínica	<40% - >70%	<40% - >70%

Nota. ELISA: Ensayo de inmunoabsorción ligado a una enzima, PCR: Reacción en cadena de la polimerasa, <: menor, >: mayor, %: porcentaje. Recuperado de (Sánchez, 2019).

Distribución geográfica y prevalencia

Estudios realizados en el mundo

La paratuberculosis bovina (PTB) se distribuye a nivel mundial, se encuentra presente en Europa, Norteamérica, Sudamérica, Asia, Australia y África (OMSA, 2023); se ha indicado que solamente Suecia y algunos estados de Australia están libres de la enfermedad (CFSPH, 2007). Las herramientas de diagnóstico más empleadas para determinar la prevalencia de paratuberculosis bovina comúnmente son ELISA indirecto y PCR (Zambrano, 2020).

En Europa, se determinó una prevalencia entre 0,08 - 8,8%, en 20.379 animales muestreados, en América del norte se determinó una prevalencia de 2,6 - 9,4% en 61.504 animales, en Asia se determinó una prevalencia de 11,7%, en 1.038 animales, en los tres estudios se utilizó ELISA como método diagnóstico, en África se determinó una prevalencia de 9,5% mediante PCR, de una población de estudio de 138 animales (Zambrano, 2020).

En un estudio realizado por Fanelli *et al.* (2020), mencionan que la enfermedad se encuentra presente en 41 de 47 países europeos analizados, de los cuales 27 países (57,4%) fueron clasificados como enzoóticos, es decir, países en donde la enfermedad se encuentra presente de manera periódica, 14 países (29,7%) como epizoóticos en donde la enfermedad es transitoria y en solo 6 países (12,7%) no se ha reportado la presencia de paratuberculosis bovina, Alemania y España presentan una alta prevalencia de la enfermedad.

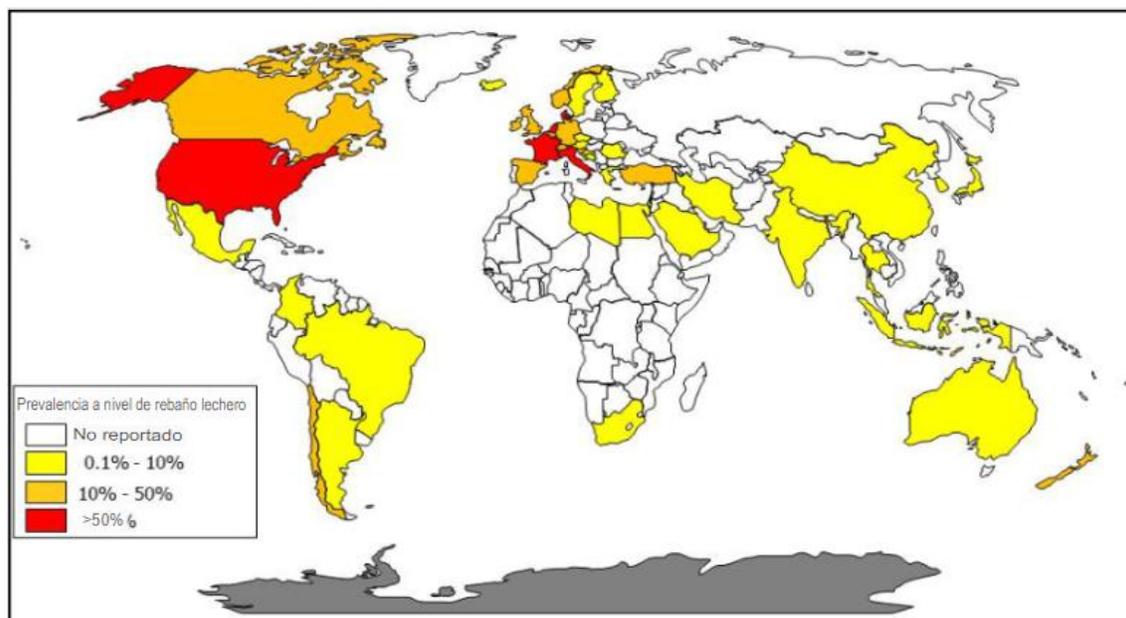
En Estados Unidos, se determinó una prevalencia aparente de paratuberculosis bovina de 70,4% a nivel de rebaño, es decir, que de 524 animales muestreados 369 resultaron positivos en el cultivo fecal; sin embargo, se estimó una prevalencia real de 91,1% (Lombard *et al.*, 2013). Se ha informado que el índice de infección en este país, es más común en el ganado bovino lechero presentándose 24,2% en el medio Oeste, 23,5% en el Oeste, 17,2% en el Sudeste y 16,1% en el Noreste, sin embargo la prevalencia es menor en el ganado bovino de carne presentándose hasta en un 8% (CFSPH, 2007). Estudios más recientes realizados por

Machado *et al.*, (2018) en el medio Oeste, determinó una prevalencia de 4,9%, en donde se analizó 45.652 muestras de leche mediante diagnóstico ELISA, de las cuales 2.222 resultaron seropositivas.

En Canadá, se reportó una seroprevalencia a por animal entre 1,3 y 7,0%, y a nivel de hato de 9,8 a 40,0% (Tiwari *et al.*, 2006). Estudios más recientes realizados por Corbett *et al.* (2018), se diagnosticó paratuberculosis bovina mediante la técnica de cultivo fecal de MAP en 362 granjas pertenecientes a 4 regiones de Canadá, determinando así una prevalencia de 66% correspondiente al oeste, 54% en Ontario, 24% en Quebec y 47% en el Atlántico.

Figura 4

Distribución mundial de Mycobacterium avium supesp. paratuberculosis en el año 2018



Nota. Mapa detallado de la distribución y prevalencia de *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis* en el año 2018. Recuperado de (Collins y Manning, 2023).

América Latina

En América Latina, la presencia de paratuberculosis ha sido reportada en varios países como Brasil, Argentina, Chile, Colombia, México, Perú, Venezuela y Panamá; detectando el agente causal en bovinos, caprinos, ovinos y búfalos, también, en algunos animales salvajes como ovinos, lagomorfos y guanacos (Espescht *et al.*, 2017).

Tabla 6*Prevalencia de Paratuberculosis bovina en Latinoamérica*

Año	Autor	País	Muestras	Casos positivos	Técnica diagnóstica	Prevalencia
2006	Alfaro <i>et al.</i>	Venezuela	240	10	Intradérmica	4,16%
				173	ELISA	72,1%
2009	Sánchez <i>et al.</i>	Venezuela	207	3	ELISA suero	1,45%
			77	3	ELISA leche	5,19%
2010	Retamal <i>et al.</i>	Chile	775	104	ELISA	13,4
			60	22	Serológica	36,7%
2011	Bustamante <i>et al.</i>	Perú	18	5	Cultivo fecal	27,7%
			18	2	PCR	11,1%
2013	Goodridge <i>et al.</i>	Panamá	45	19	ELISA	42%
2015	Vilar <i>et al.</i>	Brasil	2504	252	ELISA	Animal 10,7% Hato 34,5%
2015	Benavides <i>et al.</i>	Nariño, Colombia	958	77	iELISA	Animal 8% Hato 94%
2018	Verdugo <i>et al.</i>	Chile	4963	313	ELISA	6,3%
			1500	32		Animal 2,1% Hato 35,6%
2019	Abdala <i>et al.</i>	Argentina	1400	130	ELISA	Animal 9% Hato 66%
2020	Bulla <i>et al.</i>	Boyaca, Colombia	604	66	iELISA	10,9%
2021	Osuna <i>et al.</i>	México	385	8	ELISA	2,08%
2021	Correa <i>et al.</i>	Antioquia, Colombia	94	14	PCR	14,9%
2022	Naranjo <i>et al.</i>	Colombia	840	35	iELISA	4,17%
2023	Setim <i>et al.</i>	Sur, Brasil	362	20	ELISA	17%
2023	Guzmán <i>et al.</i>	Colombia	1000	524	iELISA	Animal 52% Hato 100%

Nota. Recopilación de prevalencias en diferentes países de Latinoamérica. PCR: Reacción en cadena de la polimerasa, iELISA: Ensayo de inmunoabsorción ligado a un enzima indirecto. Autoría Propia.

Ecuador

En Ecuador, según un estudio realizado en 2017 por Guamán, (2017), en base a una muestra de 5.047 bovinos provenientes de 716 hatos, de las 4 regiones de Ecuador, se determinó que la prevalencia de paratuberculosis bovina a nivel nacional es de 1,75% por animal y 9,5% por hato, siendo la región Litoral la zona con mayor prevalencia 2,05%, seguido

de la región Sierra con 1,64%, región Insular con 1.32% y región Amazónica con 1,00%. Para el 2020 en un estudio realizado por Echeverria *et al.* (2020), determinó una prevalencia de 25%, mediante el método de iELISA en 600 vacas muestreadas, de las cuales 150 resultaron seropositivas ha paratuberculosis.

Se identificó a *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis*, por primera vez en el Ecuador por Echeverria *et al.* (2020), mediante una prueba molecular de PCR, con la amplificación del fragmento IS-900, ya que, antes no se había reportado a la micobacteria en el país; sin embargo, también se idéntico otras cepas del género *Mycobacterium*, *M. fortuitum* y *M. avium*, que generaban una reacción cruzada en la prueba ELISA.

Tabla 7

Prevalencia de Paratuberculosis bovina en Ecuador

Año	Autor	Provincia	Muestras	Casos positivos	Técnica Diagnostica	Prevalencia
2015	Oña <i>et al.</i>	Pichincha	384	28	iELISA	7,29%
2017	Cárdenas y Peñaloza	Azuay	251	10	iELISA	3,98%
		Cañar	149	13		8,72%
2020	Aldás	Santo Domingo	1130	59	iELISA	5,2%
		Pichincha	200	109	iELISA	54,5%
			109	20	CF	18,3%
			109	5	PCR	4,6%
		Santo Domingo	200	14	iELISA	7%
14	7		CF	50%		
14	2		PCR	14,3%		
2020	Echeverria <i>et al.</i>	Azuay	200	27	iELISA	13,5%
			27	3	CF	11,1%
			27	0	PCR	0%
			27	0	PCR	0%
2020	Maldonado y Pérez	Cañar Azuay	180	39	iELISA	22%
2021	Maldonado y Pérez	Cañar Azuay	109	30	iELISA	28%
2022	Maldonado y Pérez	Cañar Azuay	150	24	iELISA	16%
2023	Ronquillo y Veléz	Camal,	63	12	ZN	19%
		Guayas		3	Histopatología	4,8%

Nota. Recopilación de prevalencias en diferentes provincias del Ecuador. PCR: Reacción en cadena de la polimerasa, iELISA: Ensayo de inmunoabsorción ligado a un enzima indirecto, ZN: Tinción Ziehl Neelsen, CF: cultivo fecal. Autoría Propia.

Factores de riesgo

Se considera como factores de riesgo, a aquellas condiciones o situaciones que predisponen al animal a presentar la enfermedad. Algunos de los factores que se asocian a la infección de *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis* son: diferencias regionales, tamaño del hato, edad y raza del animal, manejo de terneros y dinámica del hato (Tiwari *et al.*, 2009).

La edad del animal es el principal factor de riesgo para paratuberculosis bovina, debido a que, los animales jóvenes son los más susceptibles a la enfermedad, mientras que, los animales adultos generan cierta resistencia a MAP. Bulla *et al.*, (2020) determinaron una asociación significativa entre la edad de los animales y la presentación de la enfermedad, determinando que en bovinos de 2 a 3 años se presenta altas prevalencias de paratuberculosis 18,7% (20/107), mientras que, se presentó prevalencias de 9,4% (38/406) en bovinos de 3 a 4 años y 8,8% (8/91) en animales mayores de 4 años. Además, en el estudio se estableció que la edad de 3 a 4 años, puede considerarse como un factor de protección ($RR < 1$) contra la enfermedad.

La raza del animal no se encuentra asociada con la presentación de la enfermedad, sin embargo, Bulla *et al.*, (2020) encontró una mayor prevalencia de paratuberculosis en bovinos de la raza Jersey 16% (26/162), seguido de la raza Holstein 10,6% (23/218), Ayrshire 8,8% (12/137) y Normando 5,7% (5/87); esto debido a que puede existir predisposición genética de ciertas razas de ganado y líneas familiares para contraer la enfermedad.

El tamaño del hato, es un factor que no tiene asociación con la presentación de la enfermedad, Cárdenas y Peñaloza, (2017) mediante la prueba de chi-cuadrado determinaron que tanto vacas de hatos pequeños como de hatos grandes tienen la misma oportunidad de presentar o no anticuerpos para MAP.

La presencia de diarrea también ha sido analizada como posible factor de riesgo, Cárdenas y Peñaloza, (2017) establecieron que existe asociación entre el estado de salud del

animal y la presentación de la enfermedad, por lo que, en vacas con diarrea es más frecuente encontrar anticuerpos para MAP.

La condición corporal del animal, también puede ser un factor de riesgo en la paratuberculosis, ya que, MAP afecta principalmente a animales bien acondicionados para asegurar su establecimiento y posterior multiplicación en el organismo, lo que desembocan la pérdida de peso. Benavides *et al.*, (2015) determinaron asociación significativa entre la condición corporal y el estadio clínico de la enfermedad, ya que, a medida que la enfermedad progresa el animal pierde peso.

El número de lactancias por animal no tiene relación con la presentación de la enfermedad, por lo que, Benavides *et al.*, (2015) sugirieron que, tanto el número como la duración de la lactancia no es un factor que predispone a la presencia de signos clínicos.

La etapa reproductiva y el número de inseminaciones son considerados también factores de riesgo, Aldás, (2020) determinó una prevalencia de paratuberculosis de 28,9% en vacas recién inseminadas, 25,5% en vacas preñadas, 22% en vacas secas y 10,2% en vacas frescas; según el número de inseminaciones la prevalencia más alta se presentó en vacas que fueron inseminadas 1 vez (38,9%), a medida que el número de inseminaciones aumentaba la prevalencia de la enfermedad bajaba, teniendo así una prevalencia de (1,7%) en vacas inseminadas 7 veces, la prevalencia en vacas sin inseminar fue de (16,9%).

Otras variables que pueden ser consideradas como factores de riesgo son la fuente de agua (acueducto, aljibe y quebrada) y la fuente de alimentación (silo, heno y concentrado), solo el suministro de concentrado presentó asociación significativa con la presentación de la enfermedad, esto debido a que MAP puede encontrarse viable en el polvo ambiental, por lo que un mal almacenamiento de los alimentos puede predisponer a la ingesta de la bacteria (Bulla Castañeda *et al.*, 2020).

El tipo de producción (carne, leche, doble propósito), sistema de manejo (intensivo, semiintensivo, extensivo), producción diaria de leche, uso de inseminación artificial, presencia

de otros animales domésticos (ovejas, cabras, caballos, cerdos, aves) también son considerados como posibles factores de riesgo (Vilar *et al.*, 2015).

Medidas de prevención y control de la enfermedad

Se han establecido programas de control de la enfermedad en varios países como Australia, Noruega, Islandia, Japón, los Países Bajos y Estados Unidos (CFSPH, 2007). Estos programas se basan en la rápida identificación y eliminación de los animales positivos, con el fin de impedir que la bacteria se disemine en el hato mediante las heces de los animales infectados (Benavides *et al.*, 2015).

Dado que no existe un tratamiento eficaz para la enfermedad se ha optado por medidas de prevención de la paratuberculosis (CFSPH, 2007). Por lo que, Benavides *et al.* (2015) recomiendan diseñar programas de sustitución de animales, los animales que van a ingresar al hato deben presentar una prueba serológica negativa, con el fin de que no representen un riesgo para el resto del hato.

La aplicación de cal en las áreas de pastoreo y el uso y limpieza de los corrales de maternidad son medidas que ayudan a reducir la prevalencia de la enfermedad en las fincas (Tiwari *et al.*, 2009). Además, se debe llevar a cabo buenas técnicas de manejo y eliminación del estiércol, se deben limpiar los comederos y bebederos para evitar que los alimentos y el agua se contaminen con heces (CFSPH, 2007) .

El manejo de terneros juega un rol importante, por lo que, se debe evitar que animales jóvenes se infecten mediante el estiércol de animales adultos, los animales deben nacer en áreas limpias sin estiércol y se debe separar a los terneros de los adultos al menos el primer año; los terneros también se pueden infectar por calostro o leche infectados con MAP, es recomendado que a los terneros se los alimente con calostro extraído de madres negativas y con ubres limpias (CFSPH, 2007) .

MAP es resistente a desinfectantes, por lo que es necesario que las superficies contaminadas se limpien con agua y con jabón, seguido de desinfectante (CFSPH, 2007).

La OMSA (2018) menciona el uso de vacunas para la prevención de casos clínicos, sin embargo, esto puede interferir en los programas de diagnóstico de la enfermedad, debido a que se generan anticuerpos para MAP que pueden ser identificados en las pruebas serológicas, resultando en falsos positivos.

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

Contexto del proyecto BruTryp

BruTryp es un proyecto de vinculación con la comunidad que tiene como objetivo general el “Establecimiento de una plataforma en apoyo a la formación y la sensibilización, al diagnóstico y desarrollo de una estrategia de control de la brucelosis y de la tripanosomosis en Ecuador”, financiado por la Academia de Investigación y Enseñanza Superior (ARES) y la Universidad de Lieja Bélgica, siendo la zona de estudio del proyecto las provincias de Manabí, Santo Domingo de los Tsáchilas, Pichincha, Napo y Orellana.

Dado que en la especie bovina existen otras enfermedades que generan grandes pérdidas económicas y pueden ser zoonóticas, se propuso la realización de la presente investigación sobre paratuberculosis bovina, con la finalidad de valorar el banco de muestras biológicas (suero sanguíneo) recolectadas en el proyecto.

Figura 5

Ubicación del banco de biológicos del proyecto BruTryp



Nota. Ubicación del Laboratorio de Mejoramiento Genético y Sanidad Animal (LMGSA) en la Hacienda “El Prado”- IASA I de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Recuperado de (Google Earth, 2023).

Determinación del tamaño de la muestra y estrategia de submuestreo

Para el presente estudio se realizó un submuestreo aleatorio estratificado de las muestras pertenecientes al banco de biológicos del proyecto BruTryp, para lo cual se utilizó la fórmula 1, la que permitió una asignación proporcional al tamaño del estrato de los diferentes escenarios epidemiológicos, tal como se presenta en la Tabla 8.

Fórmula 1: Asignación proporcional al tamaño del estrato

$$n_{\pi}(1 - \alpha) = \frac{N z_{1-\alpha/2}^2 \sum_{i=1}^K N_i s_{\pi_i}^2}{D_{\pi}}; \omega_i = N_i/N$$

Donde:

$$D_{\pi} = E^2_{\pi} N^2 + z_{1-\alpha/2}^2 \sum_{i=1}^K N_i s_{\pi_i}^2$$

$s_{\pi_i}^2 = p_i(1 - p_i)$ varianza muestral de la proporción en el estrato i

N = tamaño poblacional total

N_i = tamaño muestral

n_i = número mínimo de animales por provincia para el estudio

p_i = prevalencia estimada por provincia (criterio de varianza máxima)

ω_i = peso muestral del estrato

Tabla 8

Constantes necesarias para el cálculo de la submuestra

Constantes	Valores a reemplazar
N	4682
NdC	95%
$z_{1-\alpha/2}$	1,99
E_{π}	0,05

Nota. N : Tamaño poblacional total; NdC : Nivel de confianza; $z_{1-\alpha/2}$: cuantil de orden $1-\alpha/2$; E_{π} : error de muestreo. Autoría Propia.

Número de muestras por provincias

Se realizó un muestreo aleatorizado en base al número total de muestras por provincia, en la provincia de Manabí se encontró un total de 1438 muestras de las cuales se analizó 132 sueros, en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas se encontró un total de 267 muestras de las cuales se analizó 25 sueros, para Pichincha se encontró 2097 muestras de las cuales se analizó 192 sueros, para Napo se encontró un total de 412 muestras de las cuales se analizó 38 sueros y para Orellana se encontró un total de 468 muestras de las cuales se analizó 43 sueros; obteniendo un total de 430 muestras analizadas, lo que correspondió a 5 placas de la prueba Enzyme Linked Inmunosorbent Assay (iELISA) como método de diagnóstico para la Paratuberculosis bovina.

En la Tabla 9 se presenta el número mínimo de muestras que se tomaron por provincia para el estudio.

Tabla 9

Tabla resumen del número mínimo de muestras necesarias por provincia para el estudio

Provincia	Estrato "i" (provincias)	N_i	p_i	ω_i	s_{π_i}²	N_is_{π_i}²	n_i
Manabí	1	1438	0,5	0,3071	0,25	359,5	132
Santo Domingo de los Tsáchilas	2	267	0,5	0,0570	0,25	66,75	25
Pichincha	3	2097	0,5	0,4478	0,25	524,25	192
Napo	4	412	0,5	0,0879	0,25	103	38
Orellana	5	468	0,5	0,0999	0,25	117	43
Total		4682		1		1170,5	430

Nota. N_i: tamaño muestral; p_i: prevalencia estimada por provincia; ω_i: peso muestral del estrato; s²_{π_i}: varianza muestral de la proporción en el estrato i; n_i: número mínimo de animales por provincia para el estudio. Autoría Propia.

Toma de muestras sanguíneas del proyecto BruTryp

Las muestras de sangre bovino dentro del Proyecto BruTryp, se obtuvieron a partir de la vena coccígea del animal, para lo cual se utilizó el sistema al vacío Vacutainer con agujas de calibre 21. Para la toma de muestras, se levantó la cola del animal y se procedió a desinfectar

la zona caudal con una bandana de algodón con alcohol ubicando las vértebras coccígeas 6-7 lugar en donde se realizó la punción. La sangre se tomó en tubos tapa roja (sin anticoagulante) de 10 mL y fueron almacenadas en un cooler con refrigerantes por máximo 4 horas.

Obtención de suero sanguíneo dentro del proyecto BruTryp

Para la obtención de suero sanguíneo se utilizó las muestras de sangre extraídas en los tubos de tapa roja, los tubos se centrifugaron a 1500 – 2000 rpm durante 10 minutos, transcurrido el tiempo y formado el coágulo se extrajo el sobrenadante con pipetas Pasteur de 3 mL y se colocó en tubos de tapa rosca de 2 mL previamente etiquetados.

Almacenamiento de las muestras del proyecto BruTryp

Las muestras de suero bovino, fueron almacenadas en congelación para mantener la cadena de frío y evitar que los sueros se dañen, por lo cual, las muestras pertenecientes al banco de biológicos del proyecto BruTryp se encuentran en la congeladora del Laboratorio de Mejoramiento Genético y Sanidad Animal (LMGSA) a -20 °C.

Verificación de la existencia de los sueros sanguíneos en el banco de muestras

Después de la aleatorización de las muestras se procedió a buscar las muestras correspondientes dentro del banco de biológicos, las muestras se encontraron en el congelador del LMGSA, los sueros cuya cantidad era insuficiente (n=5), se los reemplazó por la muestra siguiente. Cuando se recuperaron los sueros, se pasó las muestras a la refrigeradora a 4 °C, donde permanecieron por 24 horas, para que se descongelen y garantizar que no se rompa la cadena de frío.

Ensayo inmunoenzimático indirecto (iELISA)

Para el diagnóstico de la paratuberculosis bovina, se llevó a cabo la prueba Enzyme Linked Immunosorbent Assay (iELISA), para lo cual se utilizó el kit Paratuberculosis Screening, de la casa comercial IDEXX, ref P07130-5, lote 22003, cuya fecha de caducidad fue el 20 de julio de 2023.

Diseño de la placa

La placa de iELISA cuenta con 96 pocillos, distribuidos en 8 filas (A... H) y 12 columnas (1...12), el control positivo se colocó en los pocillos A1 y B1, el control negativo se colocó en el pocillo C1 y un control blanco en el pocillo D1, en el resto de los pocillos se colocó los sueros seleccionados, este esquema se siguió para todas las placas.

Tabla 10

Tabla ejemplificada del diseño de placa mantenido durante los ensayos

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CP											
B	CP											
C	CN											
D	B											
E	M1...											
F												...
G												M91
H												M92

Nota. CP: control positivo; CN: control negativo; B: blanco; M1 a M92: muestras a analizar. Autoría propia.

Preparación de los reactivos

Solución de lavado. Se preparó 400 mL de solución de lavado por placa, para lo cual se diluyó la solución de lavado concentrada (20X) en agua destilada en una relación 1:20, es decir, que se diluyó 20 mL de solución de lavado concentrada (20X) en 380 mL de agua destilada, que se almacenó a temperatura ambiente de 18 a 26 °C antes de ser utilizada.

Conjugado. Se preparó 10 mL de conjugado por placa, para lo cual se diluyó el conjugado concentrado en la solución tampón de dilución n.º1 en una relación 1:100, es decir, que se diluyó 100 µL de conjugado concentrado en 9900 µL de la solución tampón de dilución n.º1, que se almacenó de 18 – 26°C antes de usarse.

Preparación de las muestras

Control negativo. Se preparó 120 μL de control negativo para un pocillo en la microplaca de predilución, para lo cual se diluyó el control negativo (CN) en la solución tampón de dilución n.º12 en una relación 1:20, es decir, que se diluyó 6 μL de control negativo (CN) en 114 μL de la solución tampón de dilución n.º12.

Control positivo. Se preparó 120 μL de control positivo para cada pocillo en la microplaca de predilución, para lo cual se diluyó el control positivo (CP) con la solución tampón de dilución n.º12 en una relación 1:20, es decir, que se diluyó 6 μL de control positivo (CP) en 114 μL de la solución tampón de dilución n.º12.

Control blanco. Se preparó 120 μL de control blanco para un pocillo en la microplaca de predilución, para lo cual se diluyó el buffer de dilución en la solución tampón de dilución n.º12 en una relación 1:20, es decir, que se diluyó 6 μL de buffer de dilución en 114 μL de la solución tampón de dilución n.º12.

Muestras a analizar. Se preparó 120 μL de muestra a analizar para cada pocillo en la microplaca de predilución, para lo cual se diluyó la muestra de suero con la solución tampón de dilución n.º12 en una relación 1:20, es decir, que se diluyó 6 μL de muestra de suero en 114 μL de la solución tampón de dilución n.º12.

Procedimiento de la prueba

Se realizó el diseño de la placa donde se registró la posición de cada suero en la placa impregnada con el antígeno, seguido de esto se dispensó las muestras y los controles en la placa de predilución, los controles positivos se ubicaron en la posición A1 y B1 de la placa, seguidos del control negativo que se dispensó en el pocillo C1; a continuación, se colocó un control blanco (B) en el pocillo D1, en el resto de la placa se colocó las muestras diluidas.

Primero se dispensó 114 μL de la solución tampón de dilución n.º12 en todos los pocillos de la placa mediante una micropipeta multicanal (30 – 300 μL), seguido de esto se

colocó 6 μL de control o suero con la micropipeta (5 – 50 μL) en cada uno de los pocillos; cada muestra se homogeneizó en el mismo pocillo con ayuda de la micropipeta. Luego, se incubó las muestras de la placa de predilución en la incubadora de placas (Awareness Technology INC – Star fax 2200) durante 15 minutos a una temperatura de 26°C.

Transcurrido este tiempo, se procedió a dispensar 100 μL de las muestras diluidas en pocillos de la placa impregnada con el antígeno, para lo cual se utilizó la micropipeta multicanal, una vez que se dispensó todas las muestras se cubrió la placa y se homogenizó el contenido de los pocillos con el agitador de microplacas (Awareness Technology INC – Star fax 2200) a velocidad 1 (débil), durante 2 minutos, y se colocó la placa en la incubadora de placas (Awareness Technology INC – Star fax 2200) por 45 minutos (± 5) a 26°C.

Transcurrido el tiempo de incubación (45 minutos), se colocó la placa en el lavador de placas (Star fax – 2600) con la solución de lavado y se lavó 5 veces, con 300 μL de la solución; después del lavado final se dio pequeños golpes a la placa sobre un papel absorbente para asegurar que se eliminó todo el fluido de lavado residual de los pocillos.

Seguido, se dispensó con la micropipeta multicanal 100 μL de conjugado en cada pocillo, se cubrió la placa y se incubó por 30 minutos a 26°C, una vez finalizado el tiempo de incubación se eliminó el contenido de cada pocillo en el lavador de placas (Star fax – 2600) con la solución de lavado 3 veces. Después del lavado final, se eliminó el fluido residual de cada placa golpeándola sobre material absorbente.

Finalmente, se dispensó 100 μL de substrato TMB n.º9 en cada pocillo, se incubó la placa durante 10 minutos a 26°C lejos de la luz directa, finalizado el tiempo de incubación de manera inmediata se dispensó 100 μL de solución de parada n.º3 en cada pocillo. Una vez colocado el reactivo de parada se realizó la lectura de cada muestra en el lector de placas (Awareness Technology INC) a una densidad óptica de 450 nm.

Interpretación de resultados

Controles.

$$CP\bar{x} = \frac{CP1 + CP2}{2}$$

Donde:

CPx: Promedio de la densidad óptica de control positivo

CP1: Densidad óptica del pocillo 1 del control positivo

CP2: Densidad óptica del pocillo 2 del control positivo

Validación de la placa. La validez de la placa por los controles positivos, se determinó a través del promedio de la densidad óptica del CP, siendo este mayor o igual a 0,350.

$$CP\bar{x} \geq 0,350$$

La validación de la placa mediante el control negativo resultó del promedio del control positivo sobre el valor del control negativo fue mayor o igual a 3,00.

$$\frac{CP\bar{x}}{CN} \geq 3,00$$

Ratio de las muestras. Para determinar el Ratio de las muestras de suero analizadas, el kit presenta la siguiente fórmula:

$$S\% = 100 * \frac{M - CN}{CP\bar{x} - CN}$$

Donde:

S: Ratio para el tipo de muestra suero sanguíneo

M: Densidad de las muestras

CN: Control negativo

CPx: Promedio del control positivo

Cut off de las muestras. El cut off de la prueba se basó en el S% como valor de Ratio de la muestra (tipos suero sanguíneo), que fue establecido por el fabricante. La interpretación de los resultados en función del cut off, se presenta en la Tabla 11.

Tabla 11

Interpretación de los resultados kit ELISA Paratuberculosis Screening

Cut off	Interpretación
Cut off ≤ 45%	Negativo
Cut off superior a 45 e inferior a 55	Dudoso
Cut off ≥ 55 %	Positivo

Nota. ≤: menor o igual, ≥: mayor o igual, %: porcentaje.
Recuperado de (IDEXX, 2022).

Análisis estadístico

Diseño no experimental

El presente estudio se determinó a través de un diseño no experimental, ya que, las variables analizadas no tienen ninguna manipulación de parte de los investigadores y solo se las observó en su contexto natural.

Determinación de la prevalencia

La prevalencia es una medida porcentual determinada por el número de casos positivos a una enfermedad en un tiempo específico, y su relación con el número total de individuos muestreados (Fajardo, 2017). La prevalencia de paratuberculosis bovina en la zona de estudio, se determinó utilizando los resultados positivos a la prueba iELISA (Paratuberculosis Screening - IDEXX) en relación con el número total de muestras tomadas del banco de biológicos de proyecto BruTryp.

Formula 2: Calculo de prevalencia

$$Prevalencia = \frac{\text{número de muestras positivas}}{\text{número total de muestras}} \times 100$$

La prevalencia fue descrita en función de: zona geográfica (costa, sierra y oriente); provincia (Manabí, Santo Domingo de los Tsáchilas, Pichincha, Napo y Orellana); tipos de finca (grande, mediana, pequeña); sexo (macho, hembra), raza (*indicus*, *taurus*, *indicus x taurus*), edad (grupos etéreos), prevalencia general (por hatos y por animales).

Operatividad de las variables

Raza. Variable nominal, que se midió en los registros de los ganaderos y pasaportes de los animales. Las categorías estudiadas en esta variable fueron: *Indicus*, *Taurus*, *Indicus x Taurus*.

Sexo. Variable binomial, se determinó mediante registro de los ganaderos. Las categorías en esta variable fueron: machos (M) y hembras (H).

Edad. Variable cuantitativa discreta, medida en meses mediante los registros de los ganaderos y pasaporte de los animales. Esta variable se clasificó en grupos etarios de la siguiente manera: para hembras de 1 a 9 meses con el nombre de terneras (1er grupo), vaconas fiero de 10 a 18 meses (2do grupo), vaconas vientre de 19 a 36 meses (3er grupo) y hembras adultas de 37 a 180 meses (4to grupo). En el caso de los machos se clasificaron con los mismos rangos de edad, terneros de 1 a 9 meses (1er grupo), toretes de 10 a 18 meses (2do grupo), toros jóvenes de 19 a 36 meses (3er grupo) y toros adultos de 37 a 180 meses (4to grupo) (Osorio, 2022).

Categorización de las fincas

Se ordenó a las fincas según el tamaño, para lo cual se tomó en cuenta el número de animales que tenía cada finca, de esta manera se clasificó como fincas pequeñas aquellas que contenían entre 1 y 20 bovinos, como fincas medianas entre 21 y 70 bovinos y como fincas grandes aquellas que contenían más de 71 bovinos (Paucar *et al.*, 2021).

Encuestas epidemiológicas

Las encuestas fueron realizadas por el equipo de trabajo del proyecto BruTryp, las mismas fueron realizadas al propietario o administrador de cada finca en la que se realizó el análisis de los animales; además de los registros de la hacienda y pasaporte de cada animal. La información recolectada fue usada para la generación de la base de datos del Proyecto BruTryp para el análisis de diferentes enfermedades de interés pecuario.

La base de datos, se realizó en una hoja de Excel, en donde se almacenó la información de 4682 muestras de suero bovino, de las cuales se recopiló la información de cada animal del sexo, edad, raza y la zona de muestreo (Provincia y hacienda).

Estadística descriptiva

Los análisis mediante estadística descriptiva fueron realizados con los datos generados en la prueba de laboratorio, mediante la aplicación de la prueba iELISA, y la información contenida en los registros de muestreo en Excel y en la plataforma Epicollect 5, en el grupo Sanidad ESPE. Este tipo de estadística permitió ordenar y describir los datos obtenidos, a partir de este análisis se obtuvieron gráficos y tablas de frecuencias de cada variable analizada.

Se presentó los datos de forma gráfica, en función del tipo de variables, uso de gráficos de pastel para representar datos de variables cualitativas, diagrama de barras para representar datos de variables cualitativas e histograma para variables cuantitativas.

Estadística inferencial

Se determinó la diferencia significativa de la distribución de los casos positivos para los agentes causales analizados, dependiendo el tipo de variables. Los resultados obtenidos en la prueba iELISA y las encuestas epidemiológicas permitieron determinar dependencia entre la presencia de la enfermedad con los posibles factores de riesgo, para lo cual, se realizó la prueba de Chi-Cuadrado, en el programa InfoStat, y evitar errores de tipo I y tipo II en la estadística.

Determinación de factores de riesgo

Los factores de riesgo asociados a la enfermedad fueron identificados a partir de la información obtenida mediante una encuesta epidemiológica y la base de datos obtenido en los registros de campo. En el presente estudio los factores analizados fueron: sexo, edad, raza, tamaño de la finca y zona de muestreo (región y provincia).

Medidas epidemiológicas

La presente investigación es un estudio de tipo cohorte, las medidas epidemiológicas a calcular fueron: riesgo relativo (RR), riesgo atribuible (RA) y fracción etiológica de la población (FEP), conociendo que la prevalencia de paratuberculosis es menor al 10%, se utilizó la medida epidemiológica Odd Ratio (OR) del estudio tipo caso-control.

Riesgo relativo (RR). Esta medida se utilizó para conocer el riesgo de enfermedad en función de la exposición a determinado factor (Fajardo, 2017). Se obtuvo mediante la comparación del riesgo a enfermar del grupo de expuestos, con el riesgo de enfermar del grupo de no expuestos.

Tabla 12

Tabla de distribución de medidas y factor de exposición para cálculos

	Enfermos	Sanos	Total
Expuestos	A	B	A + B
No expuestos	C	D	C + D
Total	A + C	B + D	TOTAL

Nota. Autoría propia

Formula 3: Calculo de riesgo relativo

$$RR = \frac{IE}{InE}$$

Formula 4: Calculo de riesgo a enfermar del grupo de expuestos

$$IE = \frac{A}{A + B}$$

Formula 5: Calculo de riesgo a enfermar del grupo de no expuestos

$$InE = \frac{C}{C + D}$$

Donde:

RR: Riesgo relativo

IE: riesgo a enfermar del grupo de expuestos

InE: riesgo a enfermar del grupo de no expuestos

- A: casos positivos expuestos a la variable de interés.
- B: casos negativos expuestos a la variable de interés.
- C: casos positivos no expuestos a la variable de interés.
- D: casos negativos no expuestos a la variable de interés.

El valor obtenido de riesgo relativo se interpretó de la siguiente forma:

Valor = 1 indicó ausencia de asociación, no-asociación o valor nulo.

Valores <1 indicó asociación negativa, factor de protección.

Valores >1 indicó asociación positiva, factor de riesgo.

Riesgo atribuible (RA). El riesgo atribuible estima la proporción de enfermedad que puede disminuirse al eliminar el riesgo, consiste en restar el riesgo en expuestos y el riesgo de no expuestos (Fajardo, 2017).

Formula 6: Calculo de riesgo atribuible

$$RA = IE - InE$$

Donde:

RA: Riesgo atribuible

IE: riesgo a enfermar del grupo de expuestos

InE: riesgo a enfermar del grupo de no expuestos

Fracción etiológica poblacional (FEP). Es la proporción de casos nuevos dentro de una población, que son atribuibles a un factor de riesgo (Fajardo, 2017).

Formula 7: Calculo de fracción etiológica poblacional

$$FEP = \frac{IP - InE}{IP}$$

Formula 8: Calculo de incidencia poblacional

$$IP = \frac{A + C}{TOTAL}$$

Donde:

FEP: Fracción etiológica de la población

IP: incidencia poblacional

InE: riesgo a enfermar del grupo de no expuestos

Odds ratio (OR). Esta medida otorga una probabilidad de ocurrencia de un evento en base a su asociación con otro evento posible. El OR se calcula basándose en la relación entre los niveles de exposición (NE) de los casos positivos versus los niveles de exposición (NE) de los casos negativos (Fajardo, 2017). Adicionalmente, se calculó un intervalo de confianza del 95% para estimar el rango dentro del cual se encuentra la media poblacional.

Formula 9: Calculo de Odds ratio

$$OR = \frac{A/C}{B/D} = \frac{AD}{BC}$$

$$Ls \ 95\% \ I. \ C. = e^{[\ln(OR) + 1.96\sqrt{(1/A+1/B+1/C+1/D)}]}$$

$$Li \ 95\% \ I. \ C. = e^{[\ln(OR) - 1.96\sqrt{(1/A+1/B+1/C+1/D)}]}$$

Donde:

OR: Odds ratio

I.C.: intervalo de confianza al 95%

Ls: límite superior

Li: límite inferior

Determinación de la distribución geográfica

Los puntos de GPS fueron tomadas dentro del proyecto BruTryp, a través del aplicativo móvil Epicollect 5, donde se obtuvieron coordenadas para la georreferenciación de las fincas muestreadas. Para la generación de los mapas de distribución se utilizó el programa gratuito QGis (Sistemas de Información Geográfica).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estadística descriptiva de la muestra

Distribución de animales y hatos analizados en base a la zona geográfica

Las 430 muestras de suero bovino analizadas pertenecieron a 170 hatos ubicados en 5 provincias del Ecuador (Manabí, Santo Domingo de los Tsáchilas, Pichincha, Napo y Orellana).

Tabla 13

Distribución de las muestras analizadas en base a la zona geográfica y tamaño de la finca

Distribución geográfica	Número de fincas	Número de muestras	Porcentaje de muestreo
Región costa	64	157	36,51
Manabí	48	132	30,70
Finca pequeña	14	17	3,95
Finca Mediana	22	50	11,63
Finca grande	12	65	15,12
Santo Domingo de los Tsáchilas	16	25	5,81
Finca pequeña	4	7	1,63
Finca Mediana	7	10	2,33
Finca grande	5	8	1,86
Región sierra	60	192	44,65
Pichincha	60	192	44,65
Finca pequeña	12	17	3,95
Finca Mediana	30	41	9,53
Finca grande	18	134	31,16
Región amazónica	46	81	18,84
Napo	19	38	8,84
Finca pequeña	7	8	1,86
Finca Mediana	11	24	5,58
Finca grande	1	6	1,40
Orellana	27	43	10,00
Finca pequeña	14	23	5,35
Finca Mediana	9	15	3,49
Finca grande	4	5	1,16
Total	170	430	100,00

Nota. n: número de muestras, %: porcentaje. Autoría propia.

Las muestras se distribuyeron en proporción al tamaño de la población, así en Manabí se analizó 132 sueros bovinos provenientes de 48 hatos, Santo Domingo de los Tsáchilas con 25 muestras correspondiente a 16 hatos, Pichincha con 192 muestras correspondientes a 60 hatos, Napo con 28 muestras provenientes de 19 hatos y Orellana con 43 muestras provenientes de 27 hatos.

En la Tabla 13, se observa que la región Sierra tiene el mayor número de muestras 44,65%, seguido de la región Costa con 36,51% y la región amazónica con 18,84%. Esto se relaciona con las estadísticas de (ESPAC, 2021), donde menciona que, la región Sierra es la que mayor número de animales presenta, con 2'110.973 bovinos, seguida de la región Costa con 1'591.390 bovinos y la región Amazónica con 364.567 bovinos. Como se observa en la distribución de muestras según la región, no hay sesgo de muestreo, ya que, la repartición de las muestras por región y por provincia es proporcional, lo cual permitió que las conclusiones, sea extrapoladas a la población.

Distribución de animales y hatos analizados en base al tamaño de la finca

En la presente investigación se analizó 430 muestras de suero bovino provenientes de 5 provincias de Ecuador, distribuidas en 15,81% de fincas pequeñas; 36,05% de fincas medianas y un 48,14% de fincas grandes.

Tabla 14

Distribución de las muestras tomadas en base al tamaño de la finca

Tamaño de la finca	Número de fincas	Fincas (%)	Número de muestras	Muestras (%)
Pequeñas	51	30	68	15,81
Medianas	79	46,47	155	36,05
Grandes	40	23,53	207	48,14
Total	170	100	430	100

Nota. (%): porcentaje equivalente. Autoría propia.

Dentro de los resultados obtenidos, en las fincas muestreadas se observa una predominancia de fincas clasificadas como medianas (46,47%), seguido de las fincas pequeñas

con un (30%) y (23,53%) de fincas grandes, esto se debe a que, en el Ecuador el sistema de producción se basa en haciendas medianas y pequeñas, y solo una pequeña parte en haciendas grandes, como lo indica Yagual *et al.* (2023) en su estudio en Santa Elena, en donde menciona que la mayoría de ganaderos poseen hatos entre pequeños a medianos, el 47,06% posee entre 1 a 20 animales, y el 52,94% poseen entre 21 a 40 o más bovinos, similar a lo que menciona Andrade *et al.* (2023) en su estudio realizado en Chimborazo, donde el 70% de los ganaderos posee alrededor de 50 cabezas de ganado bovino, el 29% posee entre 51 y 250 bovinos y solo el 2% de las fincas posee más de 251 bovinos, como se observa en los dos estudios realizados en diferentes provincias del Ecuador se demuestra que en el país predominan las haciendas clasificadas como medianas lo que se relaciona a lo obtenido en este estudio. Sin embargo, la mayor cantidad de muestras analizadas 48,14% pertenecen a fincas categorizadas como grandes, esto se debe a que en este tipo de fincas con mayor número de animales el tamaño de la muestra (animales a muestrear) fue mayor, con el fin de obtener una muestra representativa de acuerdo al tamaño de la población.

Distribución de los animales muestreados en base al sexo

Las muestras analizadas se clasificaron en base al sexo del animal, en donde se obtuvo un 77,44% (333/430) de sueros bovinos muestreados de hembras, y solo el 10,23% (44/430) sueros fueron de machos, el resto de muestras no contaron con registros, por lo que no se pudo determinar el sexo de los animales muestreados, lo que correspondió al 12,33% (53/430).

La mayoría de muestras que fueron analizadas pertenecieron a bovinos hembras 77,44%, esto se debe a que, generalmente en las haciendas se usa a las hembras para la producción de leche y la reproducción, mientras que, el 10,23% de muestras pertenecieron a machos, esto se debe a que, generalmente se usa machos solo para la reproducción en una relación macho:hembras 1:10.

Tabla 15*Distribución de las muestras en base al sexo*

Provincia	Hembras		Machos		S.R.	
	n	%	n	%	n	%
Manabí	104	24,19	13	3,02	15	3,49
Santo Domingo de los Tsáchilas	23	5,35	1	0,23	1	0,23
Pichincha	160	37,21	19	4,42	13	3,02
Napo	12	2,79	3	0,70	23	5,35
Orellana	34	7,91	8	1,86	1	0,23
Total	333	77,44	44	10,23	53	12,33

Nota. n: número de muestras, (%): porcentaje equivalente, S.R: animales sin registro. Autoría propia.

ESPAC (2021) menciona que, en el Ecuador la población bovina se divide en 1'239.222 machos y 2'827.708 hembras, esto se debe a que, en el país domina la ganadería lechera, por lo que, se usa más bovinos hembras para la producción de leche.

Distribución de los animales muestreados por edad y sexo

Se analizaron 215 muestras sanguíneas de hembras adultas; 65 de vaconas vientre; 15 de vaconas fierro y 19 de terneras. Por otro lado, de bovinos machos se analizaron con los mismos rangos de edad, 9 muestras de toros adultos; 11 toros jóvenes; 9 de toretes y 11 de terneros. Un total de 76 muestras no fueron clasificadas, ya que no cuentan con registros.

Tabla 16*Distribución de las muestras por edad y sexo*

Edad (meses)	Sexo		Número de muestras	Porcentaje equivalente
	Hembras	Machos		
1 a 9	19	11	30	6,98
10 a 18	15	9	24	5,58
19 a 36	65	11	76	17,67
37 a 180	215	9	224	52,09
S.R.	19	4	23	5,35
ND	-	-	53	12,33
Total	333	44	430	100

Nota. ND: animales no definidos, S.R.: animales sin registro. Autoría propia.

Como se observa en la tabla 16, existe un sesgo involuntario en el número de muestras en base a la edad y sexo de los animales, ya que, el 52,09% de los animales muestreados tiene edad entre 37 a 180 meses, de los cuales 215 bovinos son hembras adultas que predominan en las haciendas debido a su actividad de producción de leche, mientras que 9 muestras son de toros adultos, esto se debe a que estos animales son usados generalmente solo para la reproducción. El número de animales muestreados en el rango de 1 a 9 meses de edad es del 6,98% valor bajo debido a que en el muestreo de los animales no se sacó suero sanguíneo de terneros entre 1 a 6 meses de edad, esto con el fin de evitar reacciones cruzadas con la vacuna contra brucelosis bovina.

Distribución de animales por raza

En el estudio se encontró variedad de razas de ganado bovino presentes en el país, tales como; Holstein, Jersey, Brown Swiss, Gyr, Brahman, Nerole y las cruza de estas. Se realizó una clasificación en tres grupos base, *Bos taurus*, *Bos indicus* y la mezcla entre *Indicus* x *Taurus*, para que las razas puedan ser clasificadas con mayor facilidad.

Las muestras analizadas correspondieron en su mayoría a animales *Indicus* x *Taurus* que representó el 40,0% (172/430) de las muestras, mientras que, la raza *Bos taurus* el 33,72% (145/430) y la raza *Bos indicus* el 10% (43/430) de las muestras, el resto de sueros sanguíneos correspondientes al 16,28% no fueron clasificados, ya que no contaban con registros.

Tabla 17

Distribución de las muestras por raza

Raza	Número de muestras	Porcentaje equivalente
<i>Bos taurus</i>	145	33,72
<i>Bos indicus</i>	43	10,00
<i>Indicus</i> x <i>Taurus</i>	172	40,00
S.R.	70	16,28
Total	430	100

Nota. S.R.: animales sin registro. Autoría propia.

En la distribución de las muestras por raza se presentó un sesgo involuntario en el tamaño de la muestra, ya que, se observó que el 40% de las muestras analizadas pertenecen a animales de la raza *Indicus x Taurus*, el 33,72% a *Bos taurus* y el 10% a *Bos indicus*, lo que se relaciona con lo mencionado por ESPAC (2021), que en el Ecuador 1´490.972 bovinos son mestizos, mientras que, 607.356 bovinos pertenecen a la raza Brahman, 388.445 a la raza Holstein, 258.616 a la raza Brown Swiss y 121.678 a la raza Jersey. En el Ecuador el sistema de producción ganadera está destinado a la producción de leche, por lo que predominan las razas bovinas lecheras como las razas criollas, mestizos, o razas puras como Brown Swiss y Holstein, en donde el 41% es ganado mestizo y alrededor del 2% es ganado puro (Andrade *et al.*, 2023), con lo que se justifica que el tamaño de la muestra sea mayor en la categoría *Indicus x Taurus* (mestizos), seguidos por razas lecheras *Bos Taurus* usadas en la producción de leche, y en menor proporción por la raza *Bos indicus* utilizada en la producción de carne.

Prevalencias

Prevalencia general de Paratuberculosis bovina en Ecuador

La prueba Enzyme Linked Inmunosorbent Assay (iELISA) permitió identificar la presencia de anticuerpos contra *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis*, agente causal de la paratuberculosis, en 10 muestras de suero sanguíneo de bovinos (2,33%) de 430 muestras analizadas. A nivel de hato se determinó una prevalencia de (5,88%) de 10 fincas positivas de un total de 170 fincas muestreadas.

Tabla 18

Prevalencia de paratuberculosis en sueros bovinos analizados por la prueba de iELISA

Resultado	Número de muestras	Prevalencia (%)	Número de hatos	Prevalencia (%)
Positivos	10	2,33	10	5,88
Sospechosos	8	1,86	5	2,94
Negativos	412	95,81	155	91,18
Total	430	100,00	170	100,00

Nota. (%): porcentaje equivalente. Autoría propia.

La prevalencia de paratuberculosis bovina de 2,33% por animal y 5,88% por hatos encontradas en el presente estudio en Ecuador a través de la prueba iELISA, están relacionadas con las prevalencias reportadas por Guamán (2017), quien determinó una prevalencia de 1,72% por animal y 9,5% por hatos a través de una prueba iELISA. Sin embargo, Echeverría *et al.* (2020), determinó una prevalencia general alta del 25% por animal, mediante el uso de un kit iELISA, valor que se justifica por la interferencia de otras especies de micobacterias incluidas *M. avium* subespe. *avium* y *M. fortuitum*, identificadas por prueba PCR, que desencadenan reacciones cruzadas en el iELISA resultando en falsos positivos a paratuberculosis. En el mismo estudio, mediante la prueba de cultivo fecal utilizada como método de confirmación, se obtuvo una prevalencia de 4,7% por animal. Las prevalencias reportadas anteriormente se encuentran relacionadas, sin embargo, los resultados pueden variar dependiendo de la prueba diagnóstica utilizada, el número de animales muestreados y las zonas analizadas.

Investigaciones realizadas en Colombia por Naranjo *et al.* (2022), determinó una prevalencia de 4,18% mediante la prueba iELISA, lo cual se encuentra relacionado con la prevalencia determinada en este estudio. Sin embargo, otro estudio realizado por Guzmán *et al.* (2023) en Villavicencio determinó una prevalencia de 52,4% por animal y de 100% por hatos a través de la prueba iELISA, lo que significa que en ciertas regiones del país se encuentra una alta incidencia de la enfermedad.

La baja prevalencia en la enfermedad reportada en el presente estudio, podría deberse a varios factores como la sensibilidad y especificidad de las pruebas diagnósticas empleadas. Sánchez (2019) menciona que, el método de diagnóstico ELISA en suero tiene una sensibilidad y especificidad del 40% a 70% (Tabla 5). Además, (OMSA, 2018) establece que la sensibilidad del ELISA depende de la fase de la enfermedad y la edad del animal, es así que un ELISA comercial identifica a animales solo en fase clínica, esto debido a que, en esta fase se presentan concentraciones detectables de anticuerpos (Escobar, 2018).

Se determinó una prevalencia de casos sospechosos de 1,86% por animal y de 2,94% por hato, este porcentaje de muestras y haciendas no pueden ser consideradas positivas o negativas, por lo que necesitan de una prueba confirmatoria. Sin embargo, las prevalencias de animales sospechosos obtenidas en este estudio se relacionan con las obtenidas por Guamán (2017) donde determinó prevalencias de 0,46% por animal y 3,07% por hato.

Prevalencia por zona geográfica

Tabla 19

Prevalencia de Paratuberculosis por zona geográfica en muestras de bovinos

Distribución geográfica	Hatos			Muestras		
	Número de fincas	Número de fincas positivas	Prevalencia (%)	Número de muestras	Número de muestras positivas	Prevalencia (%)
Región costa	64	5	7,81	157	5	3,18
Manabí	48	4	8,33	132	4	3,03
Finca pequeña	14	0	0,00	17	0	0,00
Finca mediana	22	2	9,09	50	2	4,00
Finca grande	12	2	16,67	65	2	3,08
Santo Domingo de los Tsáchilas	16	1	6,25	25	1	4,00
Finca pequeña	4	0	0,00	7	0	0,00
Finca mediana	7	0	0,00	10	0	0,00
Finca grande	5	1	20,00	8	1	12,50
Región sierra	60	4	6,67	192	4	2,08
Pichincha	60	4	6,67	192	4	2,08
Finca pequeña	12	1	8,33	17	1	5,88
Finca mediana	30	1	3,33	41	1	2,44
Finca grande	18	2	11,11	134	2	1,49
Región amazónica	46	1	2,17	81	1	1,23
Napo	19	1	5,26	38	1	2,63
Finca pequeña	7	0	0,00	8	0	0,00
Finca mediana	11	1	9,09	24	1	4,17
Finca grande	1	0	0,00	6	0	0,00
Orellana	27	0	0,00	43	0	0,00
Finca pequeña	14	0	0,00	23	0	0,00
Finca mediana	9	0	0,00	15	0	0,00
Finca grande	4	0	0,00	5	0	0,00
Total	170	10	5,88	430	10	2,33

Nota. (%): porcentaje equivalente. Autoría propia.

De las 10 muestras positivas a nivel nacional, 5 muestras positivas (3,18%) de 157 muestras analizadas pertenecieron a la región costa, 4 muestras positivas (2,08%) de 192 muestras analizadas pertenecieron a la región sierra, y solamente se encontró 1 muestra positiva (1,23%) de 81 muestras analizadas perteneciente a la región amazónica.

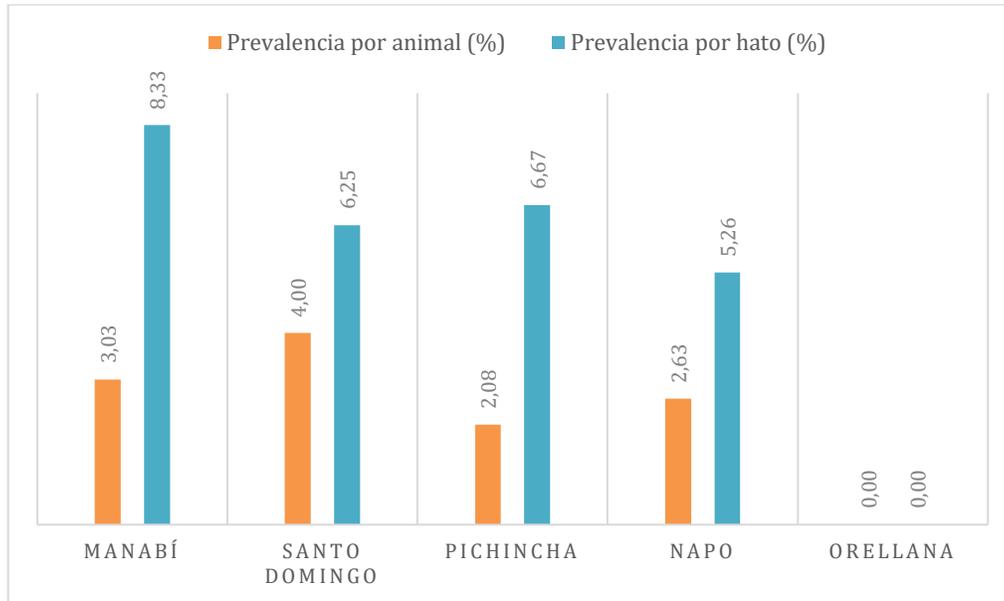
A nivel de hato se obtuvo un total de 10 fincas positivas, 5 fincas (7,81%) de 64 fincas muestreadas pertenecieron a la región costa, 4 fincas positivas (6,67%) de 60 fincas analizadas pertenecieron a la región sierra, y 1 finca positiva (2,17%) de 46 fincas muestreadas perteneció a la región amazónica.

La región costa presenta un escenario con alta prevalencia de paratuberculosis bovina con el 3,18% por animal, seguido de la región sierra que presenta un escenario medio con 2,08% y la región amazónica que se encuentra en un escenario con baja prevalencia de la enfermedad con 1,23%. A comparación con las prevalencias determinadas por Guamán (2017), donde la región costa presentó la mayor prevalencia 2,05%, seguido de la región sierra con 1,64% y la región amazónica con 1,00%, se observó que las prevalencias entre ambos estudios guardan estrecha relación, sin embargo, es perceptible un aumento en las prevalencias reportadas en este estudio, a comparación de las reportadas hace 6 años, lo que significa que la enfermedad se está desarrollando en el país, ya que no se han reportado medidas de control y/o prevención de la enfermedad. Además, estas variaciones entre prevalencias podrían deberse a que en el presente estudio el tipo de muestreo se estratificó a las fincas, lo que permitió una mayor exactitud en los resultados obtenidos.

En la figura 6, se observa la prevalencia de paratuberculosis bovina por provincia, donde la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas presenta la mayor prevalencia, 4% por animal, seguido de Manabí, Napo y Pichincha con 3,03%, 2,68% y 2,08% respectivamente, sin embargo, la provincia de Manabí es la que presenta una alta prevalencia 8,33% por hato, seguido de Pichincha, Santo Domingo de los Tsáchilas y Napo con 6,67%, 6,25% y 5,26% respectivamente, en la provincia de Orellana no se encontró la enfermedad.

Figura 6

Prevalencia de Paratuberculosis por provincia



Nota. (%): porcentaje equivalente. Autoría propia.

En la provincia de Manabí, se obtuvo una prevalencia de 3,03% por animal y de 8,33% por hat, en esta provincia del Ecuador no se encontró algún estudio anterior que determine la prevalencia de paratuberculosis en la zona. Sin embargo, la alta prevalencia a comparación de las otras provincias en estudio podría deberse a que, Manabí es la principal provincia ganadera con 862.482 bovinos (21,21%) del total de bovinos en el Ecuador (ESPAC, 2021), además factores como las condiciones ambientales, el manejo de las explotaciones y manejo de los animales son antecedentes que pueden favorecer a la infección por MAP (Sánchez *et al.*, 2009). También, la dinámica del hat juega un rol importante, Manabí compra alrededor de 20.586 animales (8,40%), que pueden incluir a animales infectados con MAP y que sean una fuente de diseminación de la enfermedad en la provincia, de igual manera, la alta prevalencia de la zona la establece como un foco de contagio al resto de país, ya que, la provincia vende alrededor de 91.245 bovinos (17,5%) a provincias aledañas (ESPAC, 2021).

En la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, se obtuvo una prevalencia de 4% por animal y de 6,25% por hat, un estudio realizado por Echeverría *et al.* (2020) determinó una

prevalencia de 7% (14/200), mientras que, (Aldás, 2020) presentó una prevalencia de 5,2% (59/1130) en la misma zona de estudio, ambos estudios determinaron la prevalencia de la enfermedad a través de un diagnóstico iELISA, la prevalencia obtenida en este estudio está relacionada a los valores antes mencionados. La variación entre el valor obtenido y los reportados en la literatura pueden deberse a tipo de muestreo y número de muestras.

En la provincia de Pichincha, se determinó una prevalencia de 2,08% por animal y de 6,67% por hato, un estudio relacionado donde se determinó la “Prevalencia de paratuberculosis en Ganado lechero en Ecuador” por (Echeverría *et al.*, 2020), estableció una seroprevalencia de 54,5% (109/200) en Mejía – Pichincha, sin embargo, mediante dos pruebas confirmatorias tinción ZN y PCR se determinó prevalencias de 18,3% y 4,9% respectivamente, los resultados obtenidos en este estudio se relaciona al valor mencionado anteriormente mediante la técnica PCR, esto debido a que, esta técnica tiene 100% de especificidad con lo que se obtiene verdaderos positivos, mientras que, en la técnica de ELISA y tinción ZN se presentó en el mismo estudio reacciones cruzadas con otras especies de micobacterias no tuberculosas (MNT) resultando en prevalencias altas debido a falsos positivos. Otro estudio realizado en Mejía – Pichincha por (Oña *et al.*, 2015) determinó una prevalencia de 7,29% (28/384) por animal a través de prueba iELISA, valores que se encuentran relacionados al obtenido en este estudio.

En la provincia de Napo, se obtuvo una prevalencia de 2,63% por animal y de 5,26% por hato, en esta provincia del Ecuador no se encontró algún estudio anterior que determine la prevalencia de paratuberculosis en la zona.

En la provincia de Orellana, no se encontró la presencia de la enfermedad, esto puede deberse a que en la zona de estudio la población de bovinos es de 53.145 animales, lo que representa al 1.31% de tenencia de ganado vacuno del total a nivel nacional (ESPAC, 2021), relacionado a lo que menciona Guamán (2017) donde indica que la variación en la prevalencia de la región amazónica, se podría deber a diferencias en el tamaño de la muestra.

Prevalencia por tamaño de finca

La prueba serológica iELISA permitió obtener una prevalencia en base al tamaño de las fincas y el número de animales. En las fincas clasificadas como grandes se encontraron 5 casos positivos en paratuberculosis bovina en 5 fincas, obteniendo así una prevalencia del 2,42% por animal y 12,5% por hato. En fincas de tamaño mediano, 4 animales resultaron positivos en 4 fincas, obteniendo así una prevalencia por animal y por hato del 2,42% y 5,06% respectivamente. Por otro lado, en las fincas pequeñas se encontró 1 animal positivo en 1 finca, en donde la prevalencia obtenida es de 1,47% por animal y 1,96% por hato.

Tabla 20

Prevalencia de Paratuberculosis bovina por tamaño de finca en muestras de bovinos analizados por iELISA

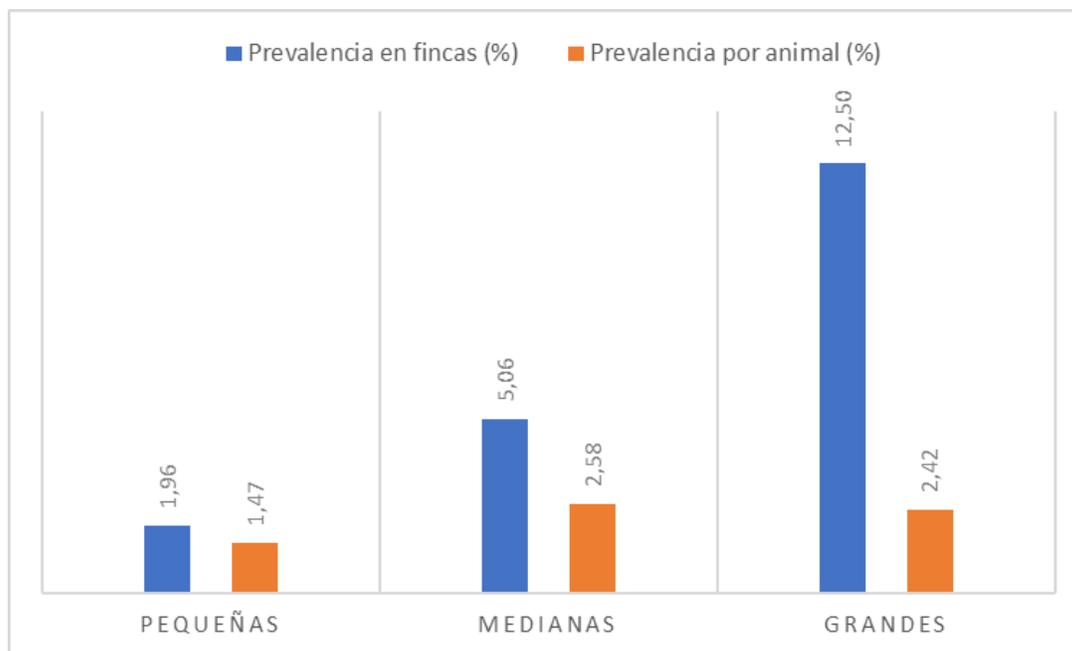
Tamaño de la finca	Número de fincas	Número de fincas positivas	Prevalencia en fincas (%)	Número de muestras	Número animales positivos	Prevalencia por animal (%)
Pequeñas	51	1	1,96	68	1	1,47
Medianas	79	4	5,06	155	4	2,58
Grandes	40	5	12,50	207	5	2,42
Total	170	10	5,88	430	10	2,33

Nota. (%): porcentaje equivalente. Autoría propia.

En la figura 11, se observa una mayor prevalencia de paratuberculosis bovina en fincas categorizadas como grandes con el 12,50% (5/40) fincas positivas, esto podría deberse a que en este tipo de fincas se lleva a cabo la ganadería intensiva, que se caracteriza por una alta carga animal por hectárea (León *et al.*, 2022), lo que predispone a que los animales sanos mantengan más contacto con los animales infectados, llegando a infectarse con la bacteria mediante una transmisión horizontal. También, en este tipo de fincas se puede dar con más frecuencia la transmisión fecal oral, debido al complejo manejo de las heces en el pasto, por lo que las heces contaminadas pueden llegar a infectar a animales sanos y contaminar las superficies o alimentos.

Figura 7

Prevalencia de Paratuberculosis bovina en base al tamaño de la finca



Nota. (%): porcentaje equivalente

Prevalencia por sexo del animal

Se presentó en los resultados obtenidos de prevalencia por sexo del animal, un sesgo involuntario, debido a que en las muestras analizadas existe un mayor número de hembras (333/430) con respecto a los machos (44/430).

Tabla 21

Prevalencia de Paratuberculosis por el sexo del animal en muestras de bovinos analizados por iELISA

Sexo del animal	Número de muestras	Casos positivos	Prevalencia (%)
Hembras	333	9	2,70
Machos	44	0	0,00
S.R.	53	1	1,89
Total	430	10	2,33

Nota. (%): porcentaje equivalente. Autoría propia.

En el presente estudio se determinó la prevalencia de paratuberculosis en base al sexo del animal en muestras de bovinos analizados por iELISA, en donde se calculó una prevalencia de 2,70% (9/333) para hembras, mientras que, la prevalencia para machos no se pudo calcular, debido a que ninguna de las muestras analizadas resultó positiva (0/44). Guamán (2017) en su estudio de paratuberculosis en Ecuador, encontró un total de 87 animales positivos, en donde 60 animales fueron hembras (68,96%), y 27 fueron machos (31,03%). Otro estudio realizado por Ronquillo y Veléz (2021) determinaron una prevalencia de 23,53% (8/34) en hembras y 13,79% (4/29) en machos positivos a paratuberculosis mediante diagnóstico tinción ZN. Como se observa en los valores antes mencionados la mayoría de casos positivos para la enfermedad son detectados de hembras, esto se debe a que, en las explotaciones ganaderas tanto de carne como de leche se emplea a bovinos hembras, ya que, son utilizadas para la producción láctea, reproducción y el manejo de estos animales es más dócil, a comparación de los bovinos machos, que son usados en su mayoría solo para la reproducción, y su manejo es más difícil debido a su temperamento, además de prácticas como la castración que requieren de una mayor mano de obra en estos bovinos, por lo que la muestra es proporcional al tamaño de la población, ya que el número de hembras muestreadas (77,44%) es mayor al número de machos muestreados (10,23%).

Prevalencia por la edad del animal

Se presentaron 5 casos positivos a paratuberculosis en bovinos de 37 a 180 meses, 3 resultaron positivos en bovinos de 19 a 36 meses, 1 resultado positivo en bovinos de 10 a 18 meses, 1 resultado positivo en animales sin registro y ningún caso positivo en bovinos entre 1 a 9 meses.

Tabla 22*Prevalencia de Paratuberculosis por la edad del animal*

Edad (meses)	Número de muestras	Casos positivos	Prevalencia (%)
1 a 9	30	0	0,00
10 a 18	24	1	4,17
19 a 36	76	3	3,95
37 a 180	224	5	2,23
S.R.	76	1	1,32
Total	430	10	2,33

Nota. (%): porcentaje equivalente. Autoría propia.

En base a los grupos etarios, la prevalencia más alta se encontró en bovinos de 10 a 18 meses con 4,17% (1/24), seguido de bovinos de 19 a 36 meses con 3,95% (3/76) y en bovinos de 37 a 180 meses se determinó una prevalencia de 2,23% (5/224), los resultados obtenidos se relacionan a los mencionados por Guamán (2017) que reporto una mayor prevalencia en animales entre los 12 y 18 meses de edad con el 70,11% y 29,89% en animales de 19 a 24 meses de edad. Por otro lado, Ronquillo y Veléz (2021) determinaron una prevalencia de 19% por tinción ZN y de 4,76% por histopatología en animales de 2 a 6 años de edad positivos a paratuberculosis. El diagnóstico de animales positivos a paratuberculosis a través de la prueba iELISA varía en función de la edad del animal y de la fase de la enfermedad en que se encuentre, es así que las prevalencias varían en si el animal se encuentra en la fase clínica, donde se presentan concentraciones detectables de anticuerpos para un ELISA comercial (Escobar, 2018).

En el presente estudio no se pudo determinar una prevalencia de paratuberculosis en bovinos de 1 a 9 meses de edad, debido a que, de las 30 muestras analizadas ningún caso resulto positivo para la enfermedad, esto se debe a que, los animales infectados con MAP generan una respuesta de inmunidad humoral a partir de los 10 a 17 meses post-infección, con producción de anticuerpos que pueden ser identificados mediante la prueba ELISA (Guamán, 2017). El valor obtenido en este estudio, puede resultar en falsos negativos, ya que, en los

terneros de 1 a 9 meses pueden estar infectados y no presentar aún anticuerpos, pero representan un riesgo potencial, ya que, excretan la bacteria en las heces de manera intermitente (Castellanos *et al.*, 2010).

Prevalencia por la raza del animal

En el análisis realizado se presentaron 10 casos positivos para paratuberculosis que corresponden a bovinos de las razas *Bos taurus*, *Bos indicus* y mestizos, obteniendo una prevalencia de 2,76% para *Bos taurus*, 6,98 % para *Bos indicus* y 1,16% para híbridos *Indicus x Taurus*, un caso positivo no pudo ser definido, debido a que la muestra analizada no presentó registro.

Tabla 23

Prevalencia de Paratuberculosis por la raza del animal

Raza	Número de muestras	Casos positivos	Prevalencia (%)
<i>Bos taurus</i>	145	4	2,76
<i>Bos indicus</i>	43	3	6,98
<i>Indicus x Taurus</i>	172	2	1,16
S.R.	70	1	1,43
TOTAL	430	10	2,33

Nota. (%): porcentaje equivalente. Autoría propia.

La presencia de paratuberculosis fue mayor en bovinos que pertenecen a la raza *Bos indicus* con el 6,98% (3/43) a comparación de la prevalencia de animales *Bos taurus* con el 2,76% (4/145) y del grupo de animales *Indicus x Taurus* con el 1,16% (2/172), la diferencia de los valores presentados entre razas *Bos indicus* (ganado de carne) y razas *Bos taurus* (ganado de leche) radica en el manejo de los terneros, ya que, los terneros de leche son separados de la madre entre las primeras 24 horas de vida, mientras que, los terneros de carne se mantienen junto a la madre por alrededor de 6 a 7 meses, por lo que estos últimos se encuentra expuestos al estiércol de animales adultos, encontrándose la raza *Bos indicus* más expuesta a la enfermedad (Vélez *et al.*, 2016). De igual manera, la elevada prevalencia en la raza *Bos indicus*

podría estar relacionada a las condiciones climáticas y a la zona, ya que, en la región costa donde generalmente habita esta raza tienen una alta prevalencia 7,81%.

Sin embargo, Bulla *et al.* (2020) encontró una mayor prevalencia de paratuberculosis en bovinos de la raza *Bos taurus*: Jersey 16% (26/162), seguido de la raza Holstein 10,6% (23/218), Ayrshire 8,8% (12/137) y Normando 5,7% (5/87); esto debido a que puede existir predisposición genética de ciertas razas de ganado y líneas familiares para contraer la enfermedad.

Factores de riesgo

Dependencia de variables

Se realizó un análisis estadístico de Chi-cuadrado, con el fin de determinar relación entre la enfermedad y los posibles factores de riesgo (tamaño de finca, región y provincia).

Tabla 24

Análisis de chi-cuadrado y Odds ratio

Variable de exposición	Variable de respuesta	p-valor	Odds Ratio
Tamaño de finca	iELISA (+)	0,0965	N.D.
Región	iELISA (+)	0,6113	N.D.
Provincia	iELISA (+)	0,6227	N.D.

Nota. (OR): Odds Ratio; p-valor: probabilidad asociada. Autoría propia.

Se determinó que las variables: tamaño de finca, región y provincia, no tienen asociación con la presencia de la enfermedad ($p > 0,05$).

El tamaño de la finca no es un factor de riesgo a paratuberculosis ($p=0,0965$), esto quiere decir que el tamaño de la finca no influye, obteniendo prevalencias casi iguales entre fincas pequeñas, medianas y grandes 1,47%, 2,58% y 2,42% respectivamente. Lo que concuerda con lo mencionado por Cárdenas y Peñaloza (2017) que indican que bovinos de hatos pequeños como de hatos grandes tienen la misma probabilidad de presentar o no paratuberculosis.

La paratuberculosis bovina no presentó dependencia con la variable región ($p=0.6113$) y provincia ($p=0.6227$), sin embargo, la mayor prevalencia la obtuvo la región costa (7,81%), que podría deberse a las condiciones climáticas de la zona, ya que, MAP es capaz de desarrollarse a temperaturas de 20°C hasta 37°C (Castellanos *et al.*, 2010).

Medidas epidemiológicas

Se determinó el riesgo relativo (RR), riesgo atribuible (RA) y fracción etiológica de la población (FEP) de los posibles factores de riesgo (sexo, edad y raza).

Tabla 25

Medidas epidemiológicas para determinar factores de riesgo

Factores de riesgo	Categoría	Total de muestras	Muestras positivas	Muestras negativas	Riesgo relativo	Riesgo atribuible	FEP
Sexo	Hembra	333	9	324	ND	ND	ND
	Macho	44	0	44			
Edad	Adultos	300	8	292	1,44	0,8%	27%
	Jóvenes	54	1	53			
Raza	Bos indicus	43	3	40	1,50	2%	ND
	Bos taurus	145	4	141			

Nota. FEP: fracción etiológica de la población, ND: no definido, (%): porcentaje equivalente. Autoría propia.

No se pudo determinar la medida epidemiológica riesgo relativo para la variable sexo del animal, debido a que ningún bovino macho resulto positivo al iELISA, sin embargo, en la mayoría de estudios analizados se presentó mayor prevalencia en hembras, pero esto puede verse influenciado por el tamaño de la población.

La edad del animal se categorizo en animales adultos (19-180 meses) y en animales jóvenes (0-18 meses), en el análisis de medidas epidemiológicas se determinó que la edad bovinos adultos es un factor de riesgo ($RR=1,44$), es decir, que los animales adultos tienen 1,44 veces más probabilidad de presentar anticuerpos contra MAP que el grupo de animales jóvenes. Sin embargo, Bulla *et al.* (2020) detecto una asociación significativa entre la edad de los animales y la presentación de la enfermedad, en el estudio se estableció que la edad de 3 a 4 años, puede considerarse como un factor de protección contra la enfermedad ($RR < 1$), esto

podría deberse a que los animales jóvenes son más susceptibles a contraer la enfermedad debido a que las células M del intestino se encuentran permeables y facilita la entrada de MAP, a medida que el animal va creciendo adquiere cierta resistencia a la micobacteria (Castellanos *et al.*, 2010). La edad del animal como factor de riesgo puede deberse a que el iELISA, solo puede diagnosticar a animales en fase clínica que generen anticuerpos, mientras que los animales jóvenes no presentan inmunidad humoral hasta los 10 a 17 meses post infección (Guamán Tixi, 2017), puesto que los animales adultos tienen 1,44 veces más de presentar anticuerpos contra MAP, si se elimina a los bovinos adultos la prevalencia de paratuberculosis podría disminuir en 0,8%; la fracción etiológica de la población determinó que el 27% de los casos positivos en la población pueden deberse a la edad del animal.

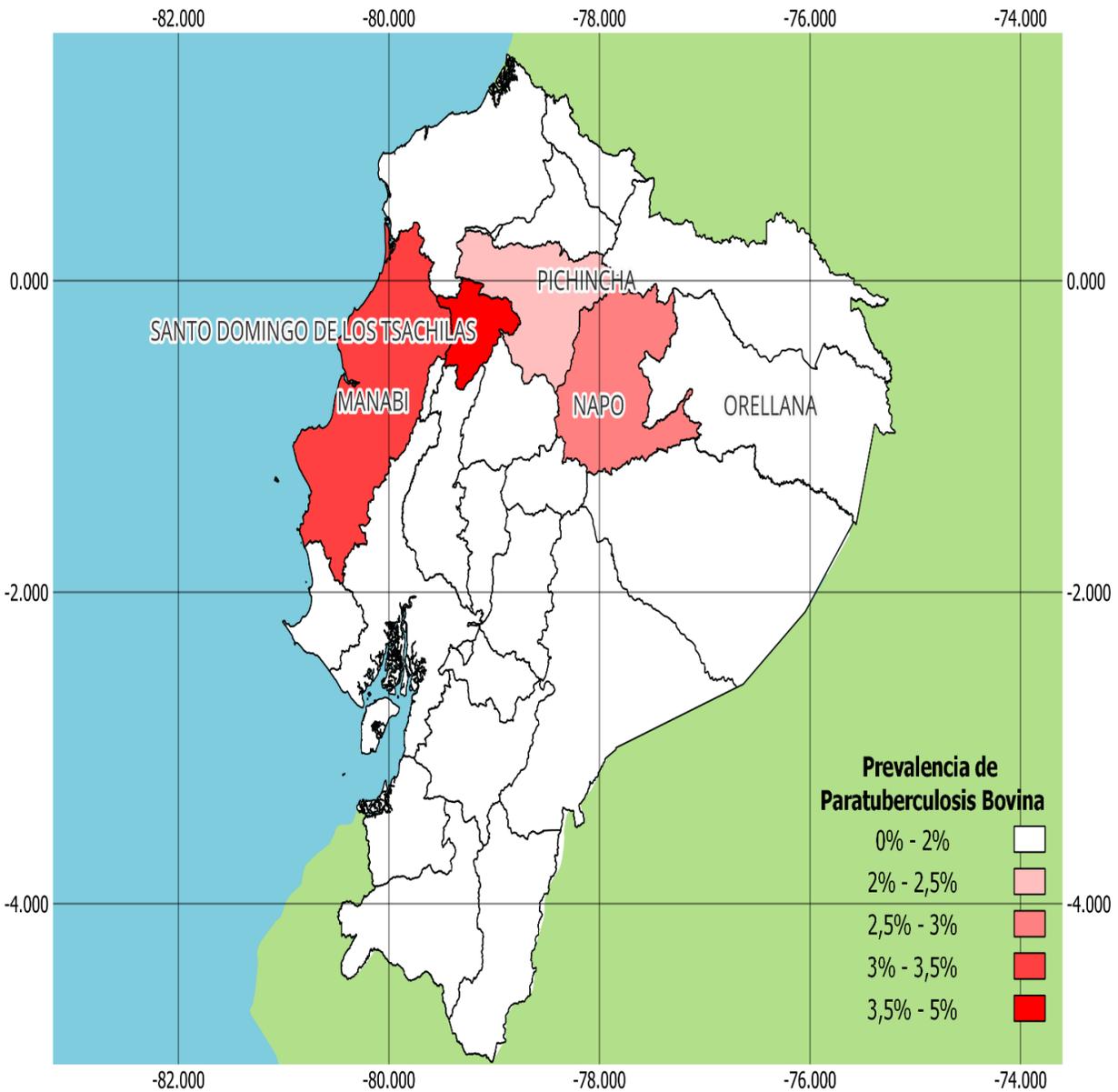
Se determinó que la raza de los animales se encuentra asociada con la presentación de la enfermedad, el riesgo relativo (RR=1,50), representa que este factor es de riesgo, ya que, los animales *bos indicus* tienen 1,5 veces más de contraer la enfermedad que las razas *bos taurus*. Sin embargo, Bulla *et al.* (2020) menciona que podría existir predisposición genética de ciertas razas *bos taurus* para contraer la enfermedad como la raza Jersey, Holstein, Ayrshire y Normando.

Georreferenciación

Se obtuvo las coordenadas GPS en la aplicación Epicollect 5 de cada hacienda positiva para paratuberculosis bovina con la prueba iELISA, con lo cual se realizó mapas de georreferenciación de cada provincia (Manabí, Santo Domingo de los Tsáchilas, Pichincha, Napo y Orellana) en el programa QGIS.

Figura 8

Mapa con las prevalencias de paratuberculosis bovina en 5 provincias de Ecuador

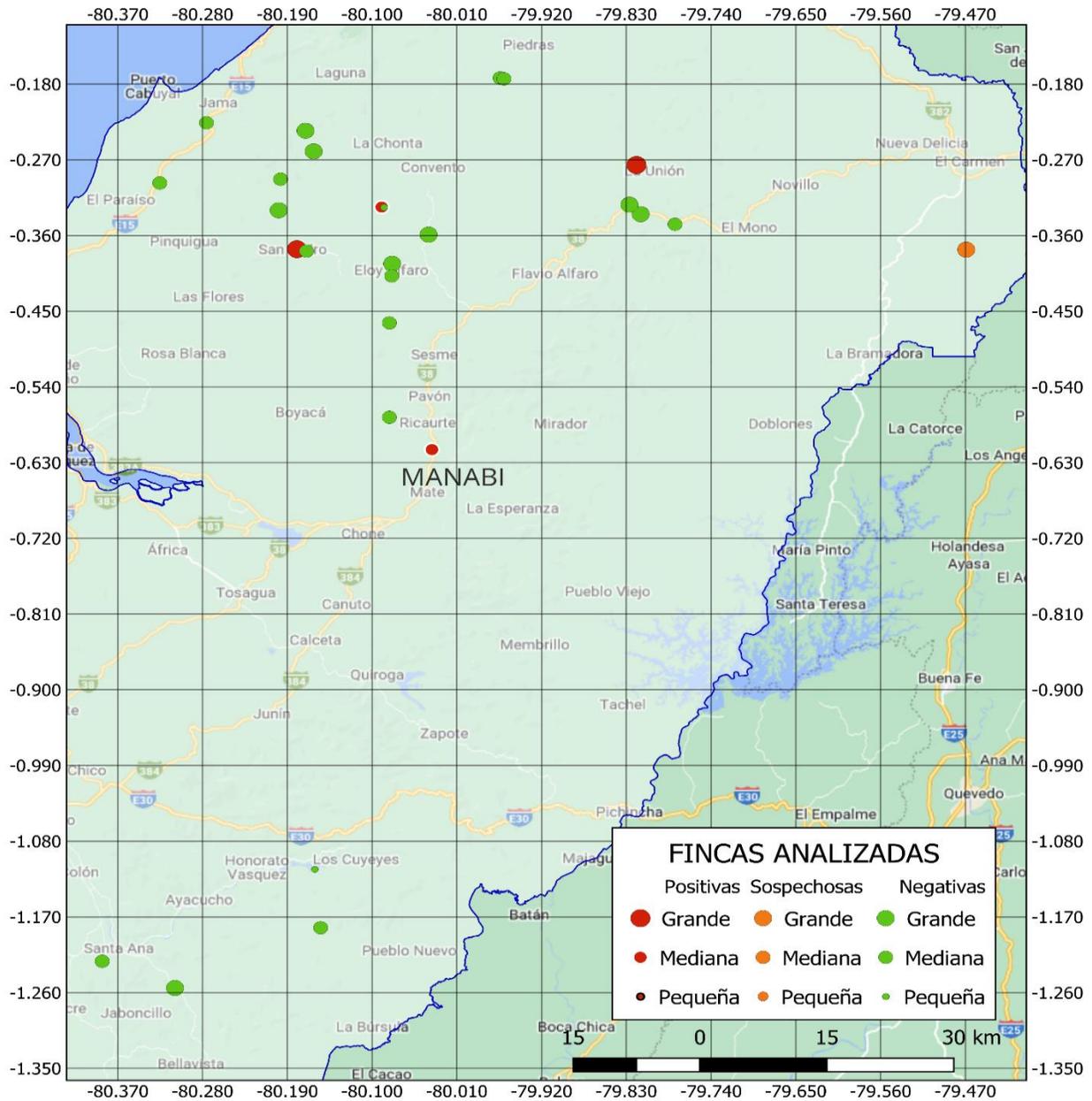


Nota. Autoría propia.

En la figura 8, se observa la prevalencia de paratuberculosis bovina en Ecuador, se obtuvo una prevalencia de 3,03% en Manabí, 6,25% en Santo Domingo de los Tsáchilas, 6,67% en Pichincha y 5,26% en Napo. En la provincia de Orellana no se encontró la enfermedad.

Figura 9

Mapa de fincas positivas a Paratuberculosis bovina en la provincia de Manabí

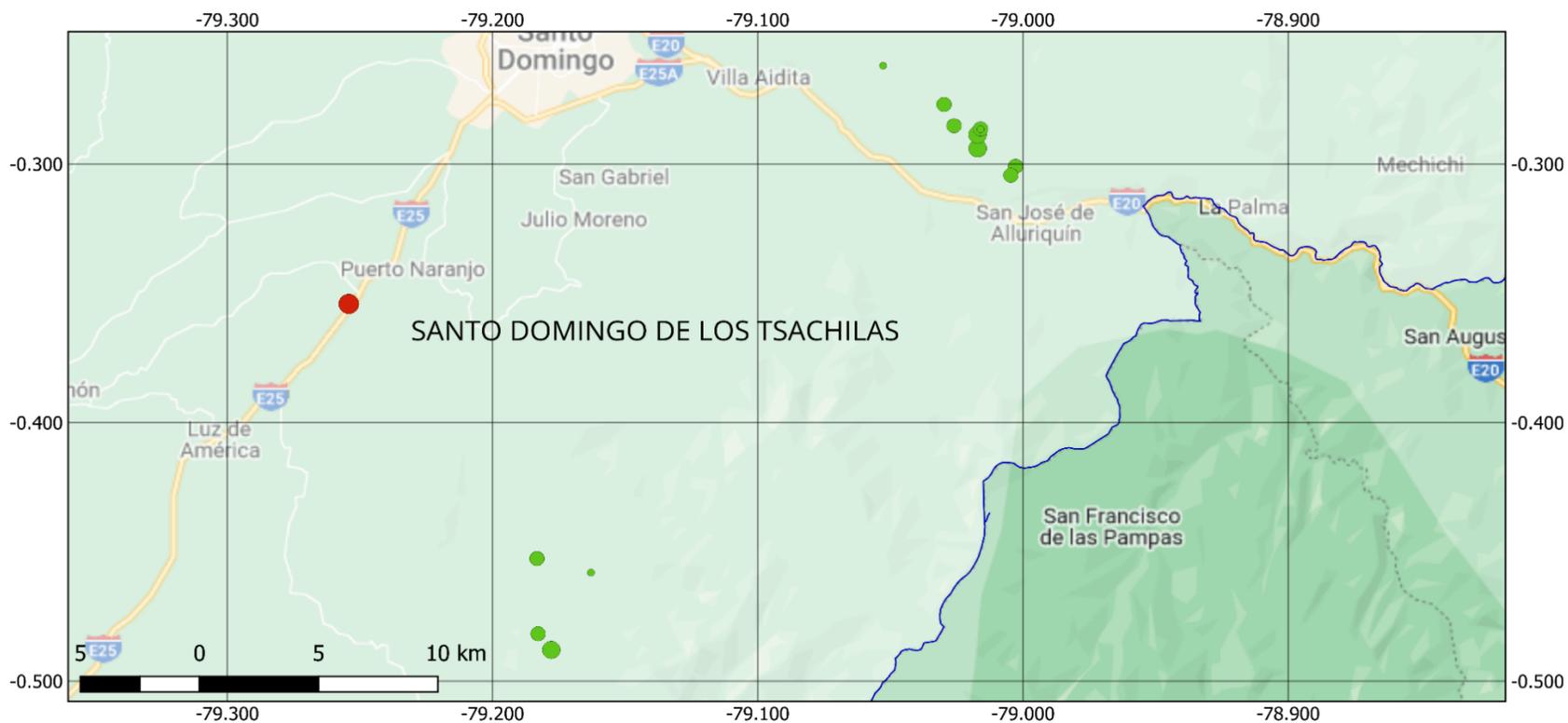


<p>MANABÍ</p>		<p>UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS ESPE PROYECTO BRU-TRYP Autora: Nycole Estefania Villalta Gavilanes</p>	<p>Mapa de fincas analizadas para Paratuberculosis Bovina en la provincia de Manabí</p> <p>Escala: 1:600000 Fecha: 18/08/2023</p>	<p>Sistema de referencia: WGS 84/UTM ZONA 17N ID de la autoridad: EPSG 32617</p>
---------------	--	--	--	---

Nota. Autoría propia.

Figura 10

Mapa de fincas positivas a Paratuberculosis bovina en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas

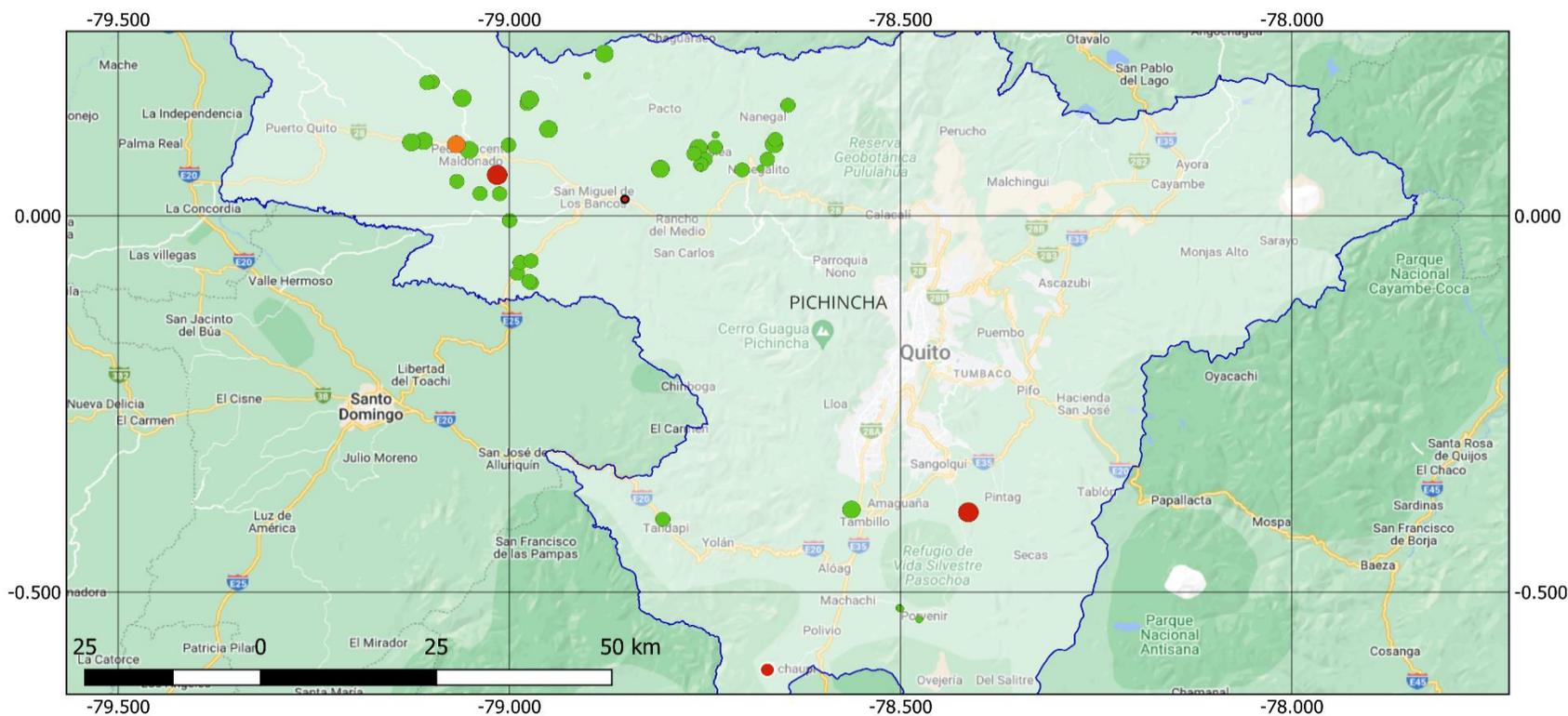


FINCAS ANALIZADAS			 <small>AGENCIA DE INVESTIGACIÓN Y DESENVOLUPAMIENTO SUPERIOR</small>	UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS ESPE PROYECTO BRU-TRYP Autora: Nycole Estefania Villalta Gavilanes	Mapa de fincas analizadas para Paratuberculosis Bovina en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas Escala: 1:220000 Fecha: 18/08/2023	Sistema de referencia: WGS 84/UTM ZONA 17N ID de la autoridad: EPSG 32617
Positivas	Sospechosas	Negativas				
● Grande	● Grande	● Grande	  <small>Grupo de Investigación en Sanidad Animal y Humana</small>			
● Mediana	● Mediana	● Mediana				
● Pequeña	● Pequeña	● Pequeña				

Nota. Autoría propia.

Figura 11

Mapa de fincas positivas a Paratuberculosis bovina en la provincia de Pichincha



<p>FINCAS ANALIZADAS</p> <p>Positivas Sospechosas Negativas</p> <p>● Grande ● Grande ● Grande</p> <p>● Mediana ● Mediana ● Mediana</p> <p>● Pequeña ● Pequeña ● Pequeña</p>		<p>UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS ESPE</p> <p>PROYECTO BRU-TRYP</p> <p>Autora: Nycole Estefanía Villalta Gavilanes</p>	<p>Mapa de fincas analizadas para Paratuberculosis Bovina en la provincia de Pichincha</p> <p>Escala: 1:740000</p> <p>Fecha: 18/08/2023</p>	<p>Sistema de referencia: WGS 84/UTM ZONA 17N</p> <p>ID de la autoridad: EPSG 32617</p>
--	--	--	---	---

Nota. Autoría propia.

Figura 12

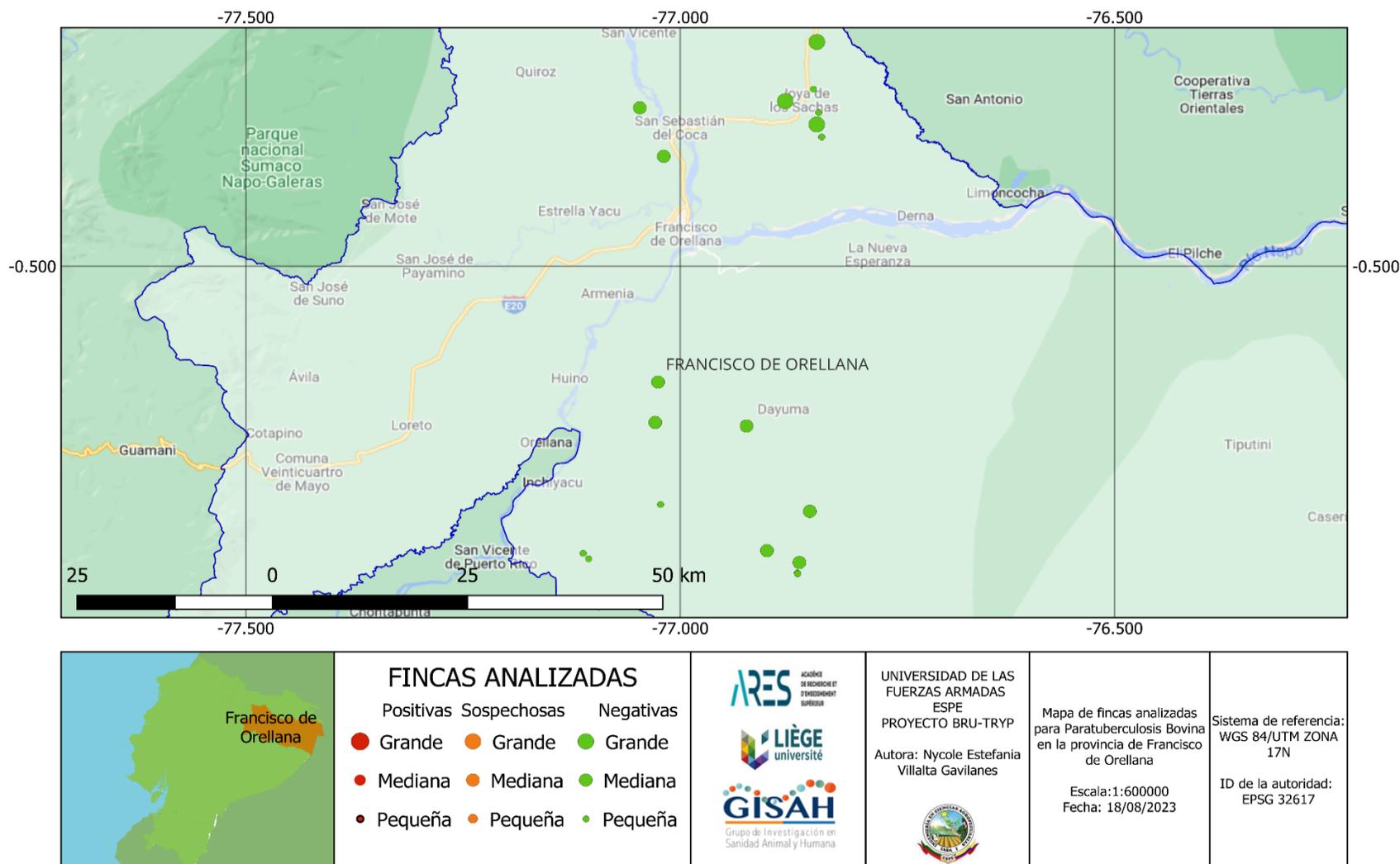
Mapa de fincas positivas a Paratuberculosis bovina en la provincia de Napo



Nota. Autoría propia.

Figura 13

Mapa de fincas positivas a Paratuberculosis bovina en la provincia de Orellana



Nota. Autoría propia.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- En este estudio se determinó que la prevalencia de paratuberculosis bovina a nivel nacional fue de 2,33% por animal y de 5,88% por hato, determinando la presencia de anticuerpos contra *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis* en sueros bovinos provenientes de 5 provincias del Ecuador, mediante una prueba iELISA.
- Se estableció que la enfermedad se encuentra distribuida a nivel nacional en las 3 regiones del Ecuador, la región costa presenta la prevalencia más alta con 3,18% por animal y 7,81% por hato, de las provincias en estudio Santo Domingo de los Tsáchilas fue la de mayor prevalencia con 4,00% por animal y Manabí presentó la prevalencia más alta con 8,33% por hato.
- Se observó una mayor prevalencia de paratuberculosis bovina en haciendas grandes con 12,50%, la infección es más frecuente en hembras con 2,70% y en animales de 19 a 36 meses de edad con 4,17%.
- Se determinó que la enfermedad se encuentra distribuida a nivel nacional, con 10 muestras positivas distribuidas en las 3 regiones del Ecuador, sin embargo, no se encontró la enfermedad en la provincia de Orellana.
- Se estableció que las variables raza y edad de los animales son factores de riesgo, con valores de riesgo relativo de 1,50 y 1,44, que predispone al animal a la presencia de anticuerpos contra *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis*, los valores de riesgo atribuible obtenidos fueron muy bajos 0,8% para la raza y 2% para la edad. No se encontró asociación entre las variables tamaño de la finca y zona de muestreo (región y provincia) ($p > 0.05$).

Recomendaciones

- Se recomienda llevar a cabo investigaciones sobre la prevalencia de paratuberculosis bovina en otras provincias no abordadas en este estudio, con el fin de tener el escenario real de la enfermedad en el país.
- Reportar los nuevos casos identificados a Agrocalidad, encargada del control sanitario animal en el Ecuador, con el fin de que se establezcan políticas públicas para el control y prevención de esta enfermedad en el país.
- Se obtuvo un total de 5 fincas sospechosas ubicadas en las 3 regiones del Ecuador, por lo que se recomienda se realice pruebas confirmatorias para clasificar a estas fincas como positivas o negativas, y puedan llevarse a cabo medidas de control y/o prevención en estos posibles puntos de contagio.
- Establecer un plan de control y prevención contra la enfermedad, el cual incluya la eliminación de animales infectados y reposición de animales negativos a pruebas diagnósticas a paratuberculosis.
- Capacitar a los ganaderos sobre la enfermedad, además, sobre el uso de registros tanto productivos, reproductivos y de sanidad animal, y del areteado a los animales con el fin de la correcta identificación de los mismo, y posterior tratamiento individual.
- Analizar otros posibles factores de riesgo como etapa de reproducción, número de lactancia, presencia de diarrea, conocimiento de los productores sobre la enfermedad como posibles factores de riesgo que predispongan a los animales a la enfermedad.

Bibliografía

- Abdala, A., Aguirre, N., Luca, E., Storani, G., Storero, R., y Torioni de Echaide, S. (2019). Seroprevalencia de paratuberculosis bovina en rodeos de cría y de leche de dos departamentos de la provincia de Santa Fe (Argentina). *InVet*, 21(1).
http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S1668-34982019000100002yscript=sci_arttext
- Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario. (2022). *Catálogo de enfermedades, infecciones e infestaciones de notificación o declaración obligatoria, así como, aquellas determinadas como de control oficial en el Ecuador*. [Archivo PDF].
https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2022/10/anexo_1_cat%C3%A1logo_de_enfermedades_aprobado_21-09-2022.pdf
- Aldás Silva, D. R. (2020). *Descripción epidemiológica transversal de tuberculosis, paratuberculosis y fiebre Q, mediante utilización de pruebas diagnósticas, en hacienda de alta producción lechera del subtrópico, Santo Domingo - Ecuador* [Trabajo de Titulación, Universidad de las Américas].
<https://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/12276/1/UDLA-EC-TMVZ-2020-29.pdf>
- Alfaro, C., Romo, M., Clavijo, A., y Valle, A. (2006). Caracterización de la paratuberculosis bovina en ganado doble propósito de los llanos de Monagas, Venezuela. *Zootecnia Tropical*, 24(3). ve.scielo.org/scielo.php?pid=S0798-72692006000300010yscript=sci_arttext
- Andrade, G., Andrade, M., Suárez-Usbek, A., Bautista-Espinoza, H., y Haro-Haro, A. (2023). Impacto socioeconómico de la ganadería lechera en comunidades indígenas del Ecuador. *EASI: Ingeniería y Ciencias Aplicadas En La Industria*, 2(1), 34–43.
<https://doi.org/10.53591/easi.v2i1.1907>
- Ayele, W. Y., Bartos, M., Svastova, P., y 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>

- Benavides, B., Arteaga, Á., y Montezuma, C. (2015). Estudio epidemiológico de paratuberculosis bovina en hatos lecheros del sur de Nariño, Colombia. *Revista de Medicina Veterinaria*, 31(1), 57–66. http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0122-93542016000100006yscript=sci_arttext
- Buitrago López, A., Castro Forero, S. P., Fernández Jiménez, M., y Pulido Medellín, M. O. (2021). Paratuberculosis bovina, revisión de literatura. *Revista Habitus: Semilleros de Investigación*, 1(2), e12434. <https://doi.org/10.19053/22158391.12434>
- Bulla Castañeda, D. M., Díaz Anaya, A. M., García Corredor, D. J., y Pulido Medellín, M. O. (2020). Serodiagnóstico de Paratuberculosis en bovinos del Municipio de Sogamoso, Boyacá (Colombia). *Entramado*, 16(2), 312–320. <https://doi.org/10.18041/1900-3803/entramado.2.6758>
- Bustamante V, J., Aguilar O, J., Ortiz M, M., y Bustamante L, J. (2011). *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in dairy cattle in the Lima area detected through three diagnostic techniques. *Revista de Investigación Veterinaria Perú*, 22(4), 394–402. https://sisbib.unmsm.edu.pe/bVrevistas/veterinaria/v22_n4/pdf/a14v22n4.pdf
- Cárdenas Morocho, A. A., y Peñaloza Chimbo, A. V. (2017). *Prevalencia de anticuerpos para Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis en hatos lecheros de la sierra sur del Ecuador (Azuay - Cañar)* [Tesis de Grado, Universidad de Cuenca]. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/26284>
- Castellanos, Elena., Aranz, A., Domínguez, L., y Ferré, J. (2010). *Caracterización molecular de aislados de “Mycobacterium avium” subespecie “paratuberculosis”: mapa epidemiológico en España* [Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid]. <https://core.ac.uk/download/pdf/19714446.pdf>

- Center for Food Security y Public Health. (2007). *Paratuberculosis, Enfermedad de Johne* [Archivo PDF]. <https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/paratuberculosis-es.pdf>
- Cirone, K., Morsella, C., Mendez, L., y Paolicchi, F. (2022). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and other mycobacteria in retail milk and dairy products in Argentina. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 48(3).
<https://www.redalyc.org/journal/864/86474225001/html/>
- Cocito, C., Gilot, P., Coene, M., De Kesel, M., Poupart, P., y Vannuffel, P. (1994). Paratuberculosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 1(1), 328–345.
<https://journals.asm.org/journal/cmvr>
- Collins, M., y Manning, E. (2023). *Epidemiología*. Centro de Información de Johne.
<https://johnes.org/dairy/epidemiology/>
- Collins, M., Wells, S., Petrini, K. R., Collins, J. E., Schultz, R. D., y Whitlock, R. H. (2005). Evaluation of five antibody detection tests for diagnosis of bovine paratuberculosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12(6), 685–692.
<https://doi.org/10.1128/CDLI.12.6.685-692.2005>
- Corbett, C. S., Naqvi, S. A., Bauman, C. A., De Buck, J., Orsel, K., Uehlinger, F., Kelton, D. F., y Barkema, H. W. (2018). Prevalence of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infections in Canadian dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 101(12), 11218–11228.
<https://doi.org/10.3168/jds.2018-14854>
- Correa Valencia, N. M., Ramírez Vásquez, N. F., y Fernández Silva, J. A. (2022). Prevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and associated risk factors in dairies under mechanical milking parlor-systems in Antioquia, Colombia. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, 13(3), 643–657. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v13i3.5776>
- De Waard, J. (2010). ¿Milking mycobacteria from cattle? Health and economic impact of bovine Tuberculosis and Paratuberculosis in Colombia. *Revista MVZ Cordoba*, 15(2), 2037–2040. <http://www.scielo.org.co/pdf/mvz/v15n2/v15n2a01.pdf>

- Echeverría, G., Escobar, H., Changoluisa, D., Ron, L., Proaño, A., Proaño-Pérez, F., Zumárraga, M., y De Waard, J. (2020). Prevalence of paratuberculosis in dairy cattle in Ecuador. *International Journal of Mycobacteriology*, 9(1), 1–6.
https://doi.org/10.4103/ijmy.ijmy_175_19
- Escobar Chamba, H. R. (2018). *Aislamiento e identificación de Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis a partir de muestras fecales en bovinos seropositivos en tres localidades del Ecuador* [Trabajo de Titulación, Universidad Central del Ecuador].
<http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/16279>
- Estadísticas Agropecuarias. (2021). *Tabulados de la Encuesta de Superficie y Producción Continua* [Archivo Excel]. Censo Nacional Agropecuario.
<https://www.ecuadorencifras.gob.ec/censo-nacional-agropecuario/>
- Espescht, I. F., Schwarz, D. G. G., Faria, A. C. S., Souza, M. C. C., Paolicchi, F. A., Juste, R. A., Carvalho, I. A., y Moreira, M. A. S. (2017). Paratuberculosis in Latin America: a systematic review. *Tropical Animal Health and Production*, 49(8), 1557–1576.
<https://doi.org/10.1007/s11250-017-1385-6>
- Fajardo Gutiérrez, A. (2017). Medición en epidemiología: prevalencia, incidencia, riesgo, medidas de impacto. *Revista Alergia México*, 64(1), 109–120.
https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2448-91902017000100109
- Fanelli, A., Buonavoglia, D., Carrasco, C., y Tizzani, P. (2020). Paratuberculosis at European scale: An overview from 2010 to 2017. *Veterinaria Italiana*, 56(1), 13–21.
<https://doi.org/10.12834/Vetlt.1829.9692.3>
- Fernández, B. (2016). *Respuesta inmune humoral inducida por proteínas de Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis en bovinos* [Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires]. <https://doi.org/10.1155/2012/145318>

- Goodridge, A., Correa, R., Castro, P., Escobar, C., y 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>
- Guamán Tixi, R. L. (2017). *Determinación de la prevalencia de paratuberculosis en bovinos entre 12 y 24 meses de edad en Ecuador* [Trabajo de Titulación, Universidad Central del Ecuador]. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/10152>
- Guzmán Barragán, B., Monroy Roberto, Y. A., Tobón, J., Blanco Angarita, L. C., y Guzmán, Y. L. (2023). Seroprevalence and associated risk factors *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in cattle from Villavicencio, Colombia. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 34(2). <https://doi.org/10.15381/rivp.v34i2.22959>
- IDEXX. (2022). *Mycobacterium paratuberculosis Antibody Test Kit*. Editorial IDEXX.
- Jorge, M., Traversa, M., Schettino, M., Fresneda, K., y Mendivil Mariana. (2005). *Epidemiología e importancia económica de la paratuberculosis bovina*. Portal Veterinario.
<https://www.portalveterinaria.com/rumiantes/articulos/2819/epidemiologia-e-importancia-economica-de-la-paratuberculosis-bovina.html#:~:text=La%20paratuberculosis%20causa%20p%C3%A9rdidas%20econ%C3%B3micas,diagn%C3%B3stico%20y%20los%20medicamentos%20utilizados.>
- Jubb, T. F., Sargento, E., Callinan, A., y Galvin, J. W. (2004). Estimate of the sensitivity of an ELISA used to detect Johne's disease in Victorian dairy cattle herds. *Australian Veterinary Journal*, 82(9), 569–573. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2004.tb11206.x>
- Kudahl, A. B., y Nielsen, S. S. (2009). Effect of paratuberculosis on slaughter weight and slaughter value of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 92(9), 4340–4346.
<https://doi.org/10.3168/jds.2009-2039>

- Lavers, C. (2013). *Evaluation of diagnostic tests for detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (MAP) at the herd-level and cow-level* [Tesis de Posgrado, Universidad de la Isla del Príncipe Eduardo].
<https://islandscholar.ca/islandora/object/ir%3A9711/datastream/PDF/view>
- León Rodríguez, I. C., Lituma Zhunio, N. N., y Veintimilla Luna, G. E. (2022). Estudio situacional de la actividad ganadera en la parroquia Ayapamba, Cantón Atahualpa. *Sociedad y Tecnología*, 5(S2), 443–457. <https://doi.org/10.51247/st.v5is2.311>
- Lombard, J. E., Gardner, I. A., Jafarzadeh, S. R., Fossler, C. P., Harris, B., Capsel, R. T., Wagner, B. A., y Johnson, W. O. (2013). Herd-level prevalence of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection in United States dairy herds in 2007. *Preventive Veterinary Medicine*, 108(2–3), 234–238.
<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2012.08.006>
- Machado, G., Kanankege, K., Schumann, V., Wells, S., Pérez, A., y Álvarez, J. (2018). Identifying individual animal factors associated with Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (MAP) milk ELISA positivity in dairy cattle in the Midwest region of the United States. *BMC Veterinary Research*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1354-y>
- Ministerio de Agricultura y Ganadería. (2023). *Reporte mensual de precios de leche cruda adquirida por las industrias lácteas en cumplimiento al Acuerdo Ministerial No. 394*. AGROCALIDAD. <https://www.agricultura.gob.ec/acuerdo-ministerial-no-394/>
- Maldonado, J. E., y Pérez, C. C. (2022). Enfermedades infecciosas del ganado bovino diagnosticadas entre 2020 y 2022 en la sierra sur del Ecuador. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 30(2), 63–65.
<https://doi.org/10.53588/alpa.300609>
- Naranjo, L., Rodríguez, N., y Mejía, J. (2022). Prevalence of bovine viral diarrhoea, bovine neosporosis, enzootic bovine leukosis and bovine paratuberculosis in dual-purpose

- cows in conditions of the Colombian tropics. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 33(2). <https://doi.org/10.15381/rivep.v33i2.20694>
- National Center for Biotechnology Information. (2023). *Taxonomy browser (Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis c)*. NCBI. Recuperado el 10 de agosto de 2023 de <https://bacdive.dsmz.de/strain/8439>
- Nielsen, S. S., y Toft, N. (2008). Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: A review of accuracies of ELISA, interferon- γ assay and faecal culture techniques. In *Veterinary Microbiology* 129(3–4), 217–235. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.12.011>
- Organización Mundial de Sanidad Animal. (2018). Paratuberculosis (Enfermedad de Johne) en *Manual Terrestre de la OIE*. Editorial OMSA. <https://www.woah.org/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea-al-manual-terrestre/>
- Organización Mundial de Sanidad Animal. (2023). *Paratuberculosis*. Organización Mundial de Sanidad Animal. Recuperado el 15 de agosto de 2023 de <https://www.woah.org/es/enfermedad/paratuberculosis/>
- Oña, D., Cajilema, M., Paredes Muñoz, J., y Mosquera, J. (2015). Diagnóstico de paratuberculosis bovina en vacas lecheras del Cantón Mejía utilizando un ELISA indirecto. *Maskana*, 6(1), 221–222. <https://publicaciones.ucuenca.edu.ec/ojs/index.php/maskana/article/view/686>
- Osorio Añazco, S. A. (2022). *Determinación de la prevalencia y factores de riesgo de tripanosomiasis en explotaciones ganaderas (grandes, medianas y pequeñas) de la zona noroccidental de la provincia de Pichincha* [Trabajo de integración curricular, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE]. <https://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/36548>.
- Osuna Chávez, R., López Robles, G., Celaya Michel, H., Sosa Castañeda, J., Nieblas López, M., y Ibarra Zazueta, C. (2021). Seroprevalencia de *Mycobacterium avium* subespecie

- paratuberculosis en bovinos sospechosos sacrificados en rastro de Sonora, México. *Abanico Veterinario*, 11, 1–12. <https://doi.org/10.21929/abavet2021.21>
- Paucar, V., Ron-Román, J., Benítez-Ortiz, W., Celi, M., Berkvens, D., Saegerman, C., y Ron-Garrido, L. (2021). Bayesian estimation of the prevalence and test characteristics (Sensitivity and specificity) of two serological tests (rb and sat-edta) for the diagnosis of bovine brucellosis in small and medium cattle holders in ecuador. *Microorganisms*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091815>
- Quinn, P., Markey, B., Leonard, F., Hartigan, P., Fanning, S., y Fitzpatrick, E. (2011). *Microbiología veterinaria y enfermedades microbianas* (2nd ed). Editorial Wiley-Blackwell. [https://books.google.com.ec/books?hl=esylr=yid=L3tQmr5YGXQCyoifndypg=PR10ydg=Veterinary+Microbiology+and+Microbial+Disease+\(Second+Edi\).+UKyots=381YmRy5utysig=djcm5dgNSwMQW9OogSIGfyx_is#v=onepageyq=Veterinary%20Microbiology%20and%20Microbial%20Disease%20\(Secret%20Edi\).%20UKyf=false](https://books.google.com.ec/books?hl=esylr=yid=L3tQmr5YGXQCyoifndypg=PR10ydg=Veterinary+Microbiology+and+Microbial+Disease+(Second+Edi).+UKyots=381YmRy5utysig=djcm5dgNSwMQW9OogSIGfyx_is#v=onepageyq=Veterinary%20Microbiology%20and%20Microbial%20Disease%20(Secret%20Edi).%20UKyf=false)
- Rasmussen, P., Barkema, H. W., Mason, S., Beaulieu, E., y 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>
- Retamal, P., Beltrán, C., Abalos, P., Quera, R., y Hermoso, M. (2011). Mycobacterium avium subsp paratuberculosis y enfermedad de Crohn: evidencias de una zoonosis. *Revista Médica de Chile*, 139, 794–801. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872011000600015>
- Ronquillo Véliz, J. C., y Veléz Falcones, X. C. (2021). *Determinación de la prevalencia de paratuberculosis en bovinos de descarte mediante tinción de Ziehl Neelsen e histopatología en el camal del cantón Nobol* [Trabajo de Titulación, Universidad de Guayaquil]. <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/54489>

- Sánchez Rosales, L. G. (2019). *Paratuberculosis bovina: diagnóstico, prevención y control en hatos lecheros* [Tesina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos].
<https://hdl.handle.net/20.500.12672/11299>
- Sánchez Villalobos, A., Arráiz Rodríguez, N., Becerra Ramírez, L., Faria, N., Montero Urdaneta, M., Oviedo Bustos, A., Zambrano Nava, S., Boscán Ocando, J., Molero Saras, G., y Pino Ramírez, D. (2009). Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis infection in a criollo limonero herd. *Revista Científica Maracaibo*, 19(6).
ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592009000600002
- Setim, D. H., Bondan, C., Cortese, C. C., Peretti, J. C., Facioli, F. L., Zanella, R., Costa, M. M., y da Motta, A. C. (2023). Detection of paratuberculosis in dairy cows from southern Brazil. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 43. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-7187>
- Sweeney, R. W. (2011). Pathogenesis of Paratuberculosis. In *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 27(3), 537–546.
<https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2011.07.001>
- Tiwari, A., VanLeeuwen, J. A., Dohoo, I. R., Keefe, G. P., Haddad, J. P., Scott, H. M., y Whiting, T. (2009). Risk factors associated with Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis seropositivity in Canadian dairy cows and herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 88(1), 32–41. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2008.06.019>
- Tiwari, A., VanLeeuwen, J. A., McKenna, S. L. B., Keefe, G. P., y Barkema, H. W. (2006). Johne's disease in Canada Part I: clinical symptoms, pathophysiology, diagnosis, and prevalence in dairy herds. *The Canadian Veterinary Journal = La Revue Veterinaire Canadienne*, 47(9), 874–882. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1555680/>
- Vélez, M., Rendón, Y., Valencia, A., Ramírez, N., y Fernandez, J. (2016). Seroprevalencia de Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (MAP) en una granja de ganado de carne de bosque húmedo tropical en Caucasia, Antioquia, Colombia. *Revista*

- Colombiana de Ciencia Animal*, 8(2), 167–176.
<https://www.recia.edu.co/index.php/recia/article/view/184/225>
- Verdugo, C., Valdes, M. F., y Salgado, M. (2018). Within-herd prevalence and clinical incidence distributions of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infection on dairy herds in Chile. *Preventive Veterinary Medicine*, 154, 113–118.
<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.03.022>
- Vilar, A. L. T., Santos, C. S. A. B., Pimenta, C. L. R. M., Freitas, T. D., Brasil, A. W. L., Clementino, I. J., Alves, C. J., Bezerra, C. S., Riet-Correa, F., Oliveira, T. S., y Azevedo, S. S. (2015). Herd-level prevalence and associated risk factors for *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in cattle in the State of Paraíba, Northeastern Brazil. *Preventive Veterinary Medicine*, 121(1–2), 49–55.
<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.06.003>
- Whitlock, R. H., Wells, S. J., Sweeney, R. W., y Tiem, J. Van. (2000). ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. *Veterinary Microbiology*, 77, 387–398. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00324-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00324-2)
- Yagual Maldonado, C., Acosta Lozano, N., Chávez García, D., y Andrade Yucailla, V. (2023). Caracterización productiva, morfométrica y faneróptica de rebaños bovinos criollos en la parroquia Colonche-Santa Elena, Ecuador. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal*, 18(1), 74–82. <https://repositorio.upse.edu.ec/handle/46000/9920>
- Zambrano Luna, E. V. (2020). *Epidemiología de paratuberculosis (Mycobacterium avium) en ganado bovino con ELISA y/o PCR y determinación de factores de riesgo en zonas endémicas: una revisión sistemática* [Trabajo de Titulación, Universidad de las Américas]. <http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/12608>
- Zapata Restrepo, M., Rodas González, J., y Maldonado Estrada, J. (2008). Paratuberculosis bovina: ¿conocemos la situación real de la enfermedad en la ganadería colombiana?

Revista Colombia de Ciencias Pecuarias, 21, 420–435.

<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2897912>