

FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* EN REBAÑOS OVINOS DE NAYARIT, MÉXICO

Risk factors associated with *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* on sheep flock of Nayarit, Mexico

Karina Mejía-Martínez¹, Clemente Lemus-Flores^{2*}, Carlos Alejandro González-Morteo², Gabriela Palomares-Resendiz³, Efrén Díaz-Aparicio³ y José Luis Gutiérrez-Hernández³

¹Estudiante de doctorado en el posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias, Unidad Académica de Agricultura, Universidad Autónoma de Nayarit, México; ²Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias, Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Nayarit, México; ³Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología Veterinaria, INIFAP, Carretera libre México - Toluca Km 15.5, Col. Palo Alto, Cuajimalpa 05110, Ciudad de México.

*Autor de correspondencia: drclemus@yahoo.com.mx; clemus23@gmail.com

RESUMEN

Se determinó la seroprevalencia de paratuberculosis (ptb) y factores de riesgo en rebaños ovinos de Nayarit, México; mediante un estudio transversal, se analizaron 368 muestras de suero y heces de 38 rebaños. La identificación de anticuerpos contra *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (Map) fue mediante la ELISA indirecta. Para la detección de Map por reacción en cadena de la polimerasa anidada (nPCR) se utilizaron cebadores que detectan un segmento específico para Map (IS900). La información sobre los posibles factores de riesgo se obtuvo por una encuesta aplicada a propietarios de cada rebaño. La seroprevalencia por rebaño fue 28,94 % con la prueba de ELISA. Solo un animal seropositivo a la prueba de ELISA resultó positivo a nPCR. Se determinaron como factores de riesgo: "la convivencia con cerdos" (*Sus scrofa domestica*), "crías con defectos", "ubres con excremento", "hembras con diarrea" y "hembras que adelgazan y mueren". Con estas mismas variables se observaron correlaciones para disminuir indirectamente la seroprevalencia a ptb. Se realizó un análisis de regresión logística y clasificó correctamente al 81,6% de los casos, $R^2 = 0,45$, $P < 0,03$. El objetivo de este trabajo fue determinar la seroprevalencia de ptb ovina, comparar los resultados obtenidos de la prueba ELISA con la nPCR, y determinar los factores de riesgo asociados a ptb.

Palabras clave: Seroprevalencia; factores de riesgo; distribución; ovinos; paratuberculosis.

ABSTRACT

Seroprevalence of ovine paratuberculosis (ptb) and risk factors in herds of Nayarit, Mexico were determined by a cross sectional study. It was analyzed 368 serum and stool samples from 38 different herds. The identification of antibodies *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (Map) was by indirect ELISA technique. Map for detecting chain reaction of the nested polymerase (nPCR) primers that detect a specific segment (IS900) for Map used. Information on potential risk factors was obtained through a questionnaire applied to the owners of each flock. Herd seroprevalence was 28.94% with the ELISA test. Only one seropositive animal to ELISA test was positive to the nPCR. It was identified as risk factors "coexistence with goats", "cohabitation with pigs", "offspring born with defects", "udders with excrement", "females with diarrhea" and "females who lose weight and die." With these variables correlations to indirectly decrease the seroprevalence were observed. Logistic regression analysis was performed and correctly classified 81.6% of the cases $R^2 = 0.45$, $P < 0.03$. The aim of this study was to determine the seroprevalence of ovine ptb, compare the results of the ELISA test and nPCR, and determine the risk factors associated with ptb.

Key words: Seroprevalence; risk factors; distribution; sheep; paratuberculosis.

INTRODUCCIÓN

Paratuberculosis (ptb), una enfermedad granulomatosa crónica entérica que afecta a rumiantes domésticos y salvajes [36], causando pérdidas económicas [39], no responde a tratamientos y provoca emaciación progresiva de los animales sin signos clínicos específicos [45]. La transmisión se produce principalmente por vía fecal-oral [3], y la mayoría de los animales infectados permanecen en la etapa latente o subclínica sin desarrollar signos de la enfermedad [41]; esto aunado a la falta de un diagnóstico fiable han obstaculizado su erradicación que no se ha logrado en ningún país del mundo [45]. La ptb tiene distribución mundial y actualmente se considera una enfermedad emergente [13]. El diagnóstico se realiza con el uso de pruebas serológicas, como el inmunoensayo enzimático (ELISA) y se confirma demostrando la presencia de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (Map) en las heces mediante cultivo o pruebas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) [15].

Hay pocos estudios sobre ptb en México, pero se informa que está presente en todo el país [5]. Los estudios realizados se han llevado a cabo en condiciones de clima templado y ningún estudio se ha reportado en condiciones tropicales tales como el estado de Nayarit, en el que no se reporta la presencia o prevalencia de ptb en cualquiera de las especies salvajes o domésticas. El conocimiento de la distribución, la prevalencia de ptb y los factores de riesgo asociados son elementos esenciales para establecer programas de prevención y control de esta enfermedad. El objetivo de este trabajo fue determinar la seroprevalencia de ptb de ovinos (*Ovis aries*) en Nayarit, comparar los resultados obtenidos con la prueba de ELISA y la técnica de reacción en cadena de la polimerasa anidada (nPCR) y determinar los factores de riesgo asociados a ptb.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización. El estado de Nayarit se encuentra en el noroeste de México, entre las coordenadas 19°30' y 21°35' LN y 90°43' y 105°46' de LO. Nayarit colinda al norte con los estados de Sinaloa y Durango; al este con Durango, Zacatecas y Jalisco; al sur con Jalisco y el Océano Pacífico; y al oeste con el Océano Pacífico y Sinaloa [17]. Presenta clima subhúmedo tropical con temperatura promedio anual de 25°C, mínima 12°C y máxima de 35°C, en enero y mayo, respectivamente. La mayor parte de la lluvia se genera durante los meses de mayo (promedio anual de 1 100 mm) [17].

Nayarit se clasifica en cinco regiones: la región de la costa, que incluye los municipios de Santiago y Tuxpan; la región Centro-Sureste con los municipios de Compostela, San Blas y San Pedro Lagunillas; la región Sur, que incluye Ahuacatlán, Ixtlán del Río, Jala y Santa María del Oro; la región del Norte que incluye Acajoneta, Huajicori y Tecuala y la región Centro que incluye los municipios de Xalisco y Tepic. El principal sistema de producción

ovina es extensivo, basado principalmente en pastoreo en praderas naturales. Están registrados 475 rebaños de ovejas y 21.965 cabezas en el Comité de fomento y producción pecuaria de Nayarit en el año 2013.

Diseño del estudio. Se realizó un estudio transversal estratificado con dos etapas, el muestreo se llevó a cabo de junio a diciembre de 2013, donde los rebaños fueron las unidades de muestreo inicial. Para determinar el tamaño de la muestra poblacional se consideró la base de datos de los productores de la zona referido por el Comité de fomento y producción pecuaria de Nayarit; con una prevalencia del 10%, empleando un nivel de confianza de un 95% y error de 3%, de acuerdo con la metodología descrita por la fórmula de proporciones finitas [34]. Se tomaron muestras de los animales adultos (> 2 años). El tamaño de la muestra usada fue $n = 368$ ovejas adultas de 38 rebaños. Para determinar el número de animales muestreados en cada conglomerado o distrito de desarrollo rural (DDR) a partir de una muestra general se utilizó la fórmula con asignación Neyman [33].

Análisis de laboratorio. Se tomaron muestras de sangre y heces. Las muestras de sangre (10 mL) se obtuvieron de la vena yugular de cada animal de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana [30], se utilizaron agujas desechables y tubos Vacutainer (Becton Dickinson^R Rutherford, NJ, EUA).

Las heces se obtuvieron utilizando una bolsa de plástico nueva por cada ovino, colectadas directamente del recto del animal. Todas las muestras fueron transportadas al laboratorio del Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias (CENID)-Microbiología del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP) en Palo Alto, Ciudad de México a 4°C. La sangre se centrifugó (Hettich Zentrifugen EBA20, Alemania) a 1500 g durante 10 minutos (min) para obtener el suero; los sueros y heces se congelaron (Torrey^R, CH15, México) a -20°C hasta ser procesadas.

Las muestras de sangre se pusieron a prueba en busca de anticuerpos contra el Map empleando la técnica de ELISA indirecta [18], con un kit comercial (IDEXX Laboratories, Inc., EUA). Se siguieron las instrucciones del fabricante.

La obtención del ADN de heces y la lisis celular se llevaron a cabo con la técnica descrita por Garrido y col. [15]. Para la nPCR se utilizaron los iniciadores IS900 descritos por Erume y col. [11]. Posteriormente, las muestras se procesaron en un termociclador (PCR Sprint 1, Termo Electron, Co., EUA) con el siguiente programa: Desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos a 95°C por 1 min, 65°C por 1 min y 72°C por 1 min, así como extensión final a 72°C por 5 min. Para la segunda amplificación, 3 µL de la primera amplificación fueron transferidos a microtubos de PCR que contenían la misma cantidad y concentración de los reactivos descritos anteriormente, excepto que los iniciadores ptb1 (5' TGA TCT GGA CAA TGA CGG TTA CGG A 3') y ptb4 (5' CGC GGC ACG GCT CTT GTT 3') fueron sustituidos por los iniciadores ptb2 (5' GCC GCG CTG CTG GAG TTA A 3') y ptb3 (5' AGC GTC TTT GGC GTC GGT CTT G 3').

Se utilizó el mismo programa del termociclador. Los productos de amplificación fueron visualizados en geles de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

Factores de riesgo potenciales. Los datos sobre los posibles factores de riesgo se obtuvieron utilizando un cuestionario aplicado al administrador de cada rebaño al momento de la visita. Las preguntas se clasificaron de acuerdo a componentes zootécnicos: sistema de producción, procedencia de los animales, sanidad, reproducción e higiene.

Análisis de los datos. Se estudió la seroprevalencia a la ELISA para calcular la frecuencia de rebaños positivos a anticuerpos contra Map. Los resultados de todas las muestras de suero también se utilizaron para estimar la prevalencia global de la región. Se relacionaron los resultados de las técnicas de ELISA y nPCR para establecer la concordancia entre técnicas con la prueba de Kappa [23], interpretándose de acuerdo a la escala de referencia propuesta por Landis y Koch [20].

Para determinar la sensibilidad y especificidad de la técnica se empleó como referencia el trabajo de Smith y col. [38]. Para determinar si existían diferencias entre los resultados de prevalencia entre ELISA y nPCR se utilizó Ji-cuadrado ($P < 0,05$) [7]. La sensibilidad y la especificidad del ensayo ELISA se utilizaron para calcular la verdadera prevalencia.

Antes de obtener un modelo de regresión logística se seleccionaron las variables estadísticamente significativas ($P < 0,10$) de la encuesta por medio de la prueba de U de Mann Whitney y correlación de Spearman [43]. Con U de Mann Whitney se estableció la diferencia entre la prevalencia de Map por medio del resultado de ELISA (negativo=0, positivo=1), como variable independiente, mientras que las respuestas de las encuestas, conformaron las variables dependientes.

Para identificar las variables asociadas en las encuestas con la seroprevalencia, se realizó un análisis bivalente, para identificar las variables que se asocian significativamente a otras variables de la encuesta se empleó la correlación de Spearman. Posteriormente con las variables consideradas se realizó la regresión logística multivariante, para obtener el mejor modelo que identificara los factores de riesgo que pudieran estar relacionados con la presencia de ptb. El ajuste del modelo final se evaluó mediante la prueba de Hosmer Lemeshow, cuadrados Nagelkerke R y estadísticas residuales [43].

Todos los análisis se llevaron a cabo utilizando el paquete estadístico SPSS versión 9.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La respuesta serológica en este estudio refleja la exposición natural, porque la vacunación en ovejas contra Map no se ha aplicado en el estado de Nayarit, México (TABLA I).

La seroprevalencia encontrada en este estudio puede estar asociada con ovejas adultas al no muestrear animales jóvenes, debido a que se ha reportado que en animales jóvenes pueden no presentarse anticuerpos circulantes contra Map porque en etapas tempranas de la infección no son detectables.

En el ganado, se sabe que los animales jóvenes son más susceptibles a la infección de Map, disminuyendo la susceptibilidad con aumento de la edad [21]. En el presente estudio la seroprevalencia de ptb por rebaño fue 28,94% con intervalo de confianza de 14,53 a 43,37.

TABLA I
SEROPREVALENCIA POR REBAÑO DE PARATUBERCULOSIS EN OVINOS DE NAYARIT CON LA TÉCNICA DE ELISA INDIRECTA

DDR	REBAÑOS POSITIVOS		PREVALENCIA DEL TOTAL DE REBAÑOS (%)	TOTAL DE REBAÑOS MUESTREADOS
	número	(%)		
1 COSTA (SANTIAGO, TUXPAN)	1	20	9,09	5
2 CENTRO-SURESTE (COMPOSTELA, SAN BLAS, SAN PEDRO LAGUNILLAS)	4	57,14	36,37	7
3 SUR (AHUACATLAN, IXTLAN, JALA, SANTA MARIA DEL ORO)	2	22,22	18,18	9
4 NORTE (ACAPONETA, HUAJICORI, TECUALA)	2	28,57	18,18	7
5 CENTRO (XALISCO, TEPIC)	2	20	18,18	10
TOTAL	11	28,94	100	38

DDR: Distrito de Desarrollo Rural n: número de rebaños *diferencia significativa ($P < 0,05$) Promedio (28,94%) (Intervalo de confianza 14,53 - 43,37)

La seroprevalencia mediante ELISA obtenida fue mayor a la reportada por Nielsen y Toft [29] para el continente Europeo, donde se notifica una seroprevalencia del 20% de ptb ovina por rebaño. En Austria, Khol y col. [19], reportan 6%, similar a Attili y col. [2] en Italia. En contraste; Coelho y col. [9], reportaron prevalencias de 46,7% en Portugal y Petit [31] del 68% en Francia; en Alemania Stau y col. [40] reportaron prevalencias del 65%, por rebaño.

En México se han reportado frecuencias de paratuberculosis desde un 0,8 a un 40% para pequeños rumiantes en rebaños [6]. Moron-Cedillo y col. [27], obtuvieron una seroprevalencia del 9,48% en San Luis Potosí, y Mejía y col. [25], del 7,09% en rebaños del estado de México y 14,66% en Hidalgo. Santillán y col. [32], registraron una frecuencia de ptb a nivel de rebaño de 42,42 y de 4,33% a nivel individual en Guanajuato; también se mostraron diferencias de porcentajes en los rebaños muestreados, sugiriendo que la enfermedad estaba mayormente difundida en algunas comunidades, como se apreció en este trabajo.

Las diferencias entre prevalencias pueden variar de acuerdo a las técnicas de diagnóstico, al manejo de los rebaños y a la función zootécnica de los mismos. En Europa, los rebaños muestreados fueron de manejo intensivo, para producción de leche y con mejores estrategias de control; en cambio, en países como México, aunque el manejo de animales es de tipo

extensivo y la función zootécnica se orienta a la producción de carne, se utilizan estrategias de control deficientes. Los tamaños de muestra y las áreas geográficas en que se han realizado los estudios reportados también son pequeñas. No obstante se considera que la enfermedad se encuentra distribuida en todo el país, sin contar con un estudio en cada Estado [6].

De 368 muestras analizadas por la ELISA, 349 resultaron negativas a la técnica así como también a nPCR y de 19 muestras positivas por ELISA, sólo una de ellas resultó positiva a nPCR. La prueba ELISA presentó una sensibilidad y una especificidad del 100 y 94,6, respectivamente (TABLA II). La concordancia entre las distintas técnicas fue considerada muy baja (0,091); cabe señalar que cada método detecta animales en diferente etapa de la infección [8].

Dichos resultados coinciden con los obtenidos en diversos estudios, donde se han realizado evaluaciones con diferentes antígenos de Map, que van desde un 30 al 95% de sensibilidad [37]. Garrido y col. [16], reportaron al ELISA con sensibilidad y especificidad del 96,2 y del 100%, respectivamente. Morón-Cedillo y col. [27], en un estudio de prevalencia de la infección por Map en ovinos de San Luis Potosí, reportaron 20 ovinos positivos por inmuno difusión en gel agar (IDGA) y de ellos solo 16 positivos por nPCR, con sensibilidad del 81% y especificidad de 96%, con una concordancia Kappa de 0,96.

TABLA II

COMPARACIÓN DEL NÚMERO DE CASOS POSITIVOS Y NEGATIVOS QUE RESULTARON A LAS TÉCNICAS DE ELISA Y NPCR EN EL DIAGNÓSTICO DE PARATUBERCULOSIS OVINA

<i>PCR (IS900)</i>			Total
ELISA	+	-	
+	1 ^a	18 ^b	19 ^(a+b)
	0 ^c	349 ^d	349 ^(c+d)
Total	8 ^(a+c)	367 ^(b+d)	368 ⁿ

Sensibilidad: $a / (a + c) * 100 = 100\%$

Especificidad: $d / (b + d) * 100 = 94,6\%$

Concordancia kappa = 0,091

En el presente trabajo se apoya la hipótesis de que los animales muestreados están infectados, a pesar de que tenían una condición corporal clínicamente sana, es probable que al momento de la toma de muestra los individuos no estuvieran excretando un número de organismos adecuados para ser detectados por la prueba de nPCR o bien los bacilos fueran desechados de manera intermitente como lo reporta Sergeant y col. [35].

Otra explicación podría ser que Map es una indicación de la infección, pero no de progreso a la enfermedad clínica, ya que es ampliamente aceptado que la infección subclínica es mucho más común que la enfermedad clínica en rebaños afectados [44].

Los resultados expuestos en este estudio muestran que existe diferencia entre los métodos de diagnóstico utilizados y que la ELISA identifica más animales positivos a ptb como lo han reportado otros investigadores (TABLA III).

TABLA III
ASOCIACIÓN DE LOS FACTORES DE RIESGO DE LA ENCUESTA CON LA SEROPREVALENCIA

Componente zootécnico	ASOCIACIÓN POSITIVA		
	Factor de riesgo	r	P<
sanidad	(49) convivencia con cabras (si=2)	0,52	0,001
Sanidad	(50) convivencia con cerdos (si=2)	0,35	0,10
Sanidad	(21) crías nacidas con defectos (si=2)	0,28	0,10
sanidad	(27) hembras de ubres con excremento (si=3)	0,28	0,10
Componente zootécnico	ASOCIACIÓN NEGATIVA		
	Factor de riesgo	r	P<
Sanidad	(24) hembras con diarrea (si=2)	-0,39	0,01
Sanidad	(23) hembras que adelgazan y mueren (si=2)	-0,31	0,10

*correlación de Spearman P< 0,001 – 0,10

Al realizarse el análisis de correlación de Spearman, se encontraron valores de significancia de P < 0,001 a 0,10. Resultando dos variables con alta significancia, “convivencia con cabras (*Capra aegagrus hircus*)” asociada positivamente y “hembras con diarrea” asociada negativamente a la seroprevalencia de ptb y cuatro variables con significancia moderada (P<0,10). Gallaga [14] realizó una asociación de factores de riesgo, relacionando la convivencia de caprinos dentro de un mismo predio con otras especies de animales, y reportó una tendencia mayor a presentar ptb.

En este estudio, se consideró que la transmisión de ptb se produjo principalmente a través de la ruta fecal-oral [42], por lo tanto una asociación positiva para infección por Map se realizaría si las hembras enfermas de ptb presentan “ubres con excremento”, dato similar en este trabajo. La variable “hembras con diarrea” resultó asociada negativamente a la ptb, Berh y Collins [4] afirman que con mayor frecuencia los signos de ptb son edema, problemas de pulmón, emaciación y diarrea, aunque otros autores como Chávez y col. [6] y Favila-Humara y col. [12] sostienen que el único signo visible es la diarrea sólo en la etapa terminal de la enfermedad, factor que coincide en este estudio, por lo que la diarrea no necesariamente se asocia positivamente a ptb.

Mainar-Jaime y Vázquez-Boland [22] reportaron que razas extranjeras y una tasa elevada de sustitución de animales se asociaron con ptb; Coelho y col. [10] mencionaron factores como razas puras, hacinamiento, sacrificio en cierta temporada del año y tratamientos antiparasitarios. Tiwari y col. [42] determinaron como factores de riesgo el hacinamiento, el ingreso de animales sin diagnóstico al rebaño, animales enfermos y vacunación. En México, Milián-Suazo y col. [26] determinaron como factores de riesgo la presencia de tuberculosis, pastoreo en campos abiertos y sistema extensivo, Martínez y col. [24] no encontraron factores de riesgo ni protectores en rebaños del estado de Veracruz. Cabe mencionar que los factores antes enunciados, aunque son diferentes a los expuestos como significantes en este trabajo, coinciden en general con variables asociadas al componente zootécnico de sanidad.

En la TABLA IV se pueden observar las correlaciones de las variables de la encuesta asociadas significativamente a ptb. Se aprecia que cuando una variable se asocia positivamente a la seroprevalencia de ptb en rebaños como: “crías nacidas con defectos”, “hembras de ubres con excremento”, “convivencia con cabras” y “convivencia con cerdos”, se buscaría disminuir los valores de las variables a las que se asocian, como por ejemplo: “número de borregos en el rebaño”.

TABLA IV
CORRELACIONES DE FACTORES DE RIESGO DE LA ENCUESTA GENERAL

Componente zootécnico	Variable principal (clase con mayor valor) asociada a seroprevalencia	Variable (clase con mayor valor)	Asociación positiva
	21) Crías nacidas con defectos (si = 2) positivo-aumenta	Pregunta 3 Aproximadamente cuantos borregos tiene? (Más de 100=3)	** 0,05*
		Pregunta 5 Cuántas hembras con uno o más partos? (Más de =3)	0,05
		Pregunta 15 borregos con "bolsa con agua"? (No=2)	0,32*
		Pregunta 17 ¿Qué borregas han abortado? (por igual las del rancho y las compradas = 3)	0,37*
		Pregunta 20 ¿Ha tenido corderos que nazcan débiles y mueran al poco tiempo? (Si = 2)	0,38*
		Pregunta 31 Ha visto que sus borregas tienen gusano en la nariz? (No = 2)	0,70**
		Pregunta 41 Aplica vacuna contra la brucelosis (No = 2)	0,45**
		Pregunta 45 ¿Cómo son las agujas que usa? (Nuevas = 2)	0,32*
	23) Hembras que adelgazan y mueren (si = 2) negativo-disminuye	Pregunta 58 ¿Tiene divisiones de madera en sus corrales? (No = 2)	0,33*
		Pregunta 22 ¿Ha tenido borregas repetidoras? (No = 3)	0,60**
		Pregunta 23 ¿Ha tenido borregas delgadas que no se reponen y mueren? (Si = 2)	0,70**
		Pregunta 28 ¿Ha tenido o tiene borregas con ubre inflamada (No = 2)	0,47**
		Pregunta 32 ¿Cada qué tiempo cambia de semental? (cada 5 años = 3)	0,32*
		Pregunta 33 Cuando cambia de semental ¿qué hace con el que saca de su rancho? (Lo vende a otro productor = 4)	0,34*
		Pregunta 38 ¿Ha tenido borregas que no se reponen después de haber parido y quedan flacas? (No = 2)	0,51**
		Pregunta 48 ¿Qué otros animales tiene en su rancho que convivan con los borregos? (Vacas, bueyes, becerros = 2)	0,33*
	Sanidad	Pregunta 56 ¿Que acostumbra hacer con el excremento de sus borregos? (Lo incorpora al terreno = 2)	0,50**
		Pregunta 59 alimento tirado en el corral que regresa al comedero (Si = 2)	0,36*
		Pregunta 22 ¿Ha tenido borregas repetidoras? (No = 3)	0,60**
		Pregunta 23 ¿Ha tenido borregas delgadas que no se reponen y mueren? (Si = 2)	0,70**
		Pregunta 28 ¿Ha tenido o tiene borregas con ubre inflamada (No = 2)	0,47**
		Pregunta 32 ¿Cada qué tiempo cambia de semental? (cada 5 años = 3)	0,32*
		Pregunta 33 Cuando cambia de semental ¿qué hace con el que saca de su rancho? (Lo vende a otro productor = 4)	0,34*
		Pregunta 38 ¿Ha tenido borregas que no se reponen después de haber parido y quedan flacas? (No = 2)	0,51**
	(24) ¿Ha tenido hembras con diarrea (si = 2) negativo-disminuye	Pregunta 48 ¿Qué otros animales tiene en su rancho que convivan con los borregos? (Vacas, bueyes, becerros = 2)	0,33*
		Pregunta 56 ¿Que acostumbra hacer con el excremento de sus borregos? (Lo incorpora al terreno = 2)	0,50**
		Pregunta 59 alimento tirado en el corral que regresa al comedero (Si = 2)	0,36*
		Pregunta 8 De enero del 2011 al día de hoy ¿Ha comprado algún borrego? (Si = 2)	0,36*
		Pregunta 11 ¿Cuándo compra borregos revisa si están enfermos antes de juntarlos con los que ya tiene en su rancho? (Si = 2)	0,47**
		Pregunta 29 ¿Ha tenido borregas que pierdan la ubre o se queden sin leche porque se infectaron? (No = 3)	0,35*
		Pregunta 36 ¿Que hace con las hembras adultas de desecho? (Las vende a otro productor = 3)	0,43**
		Pregunta 39 ¿Ha tenido borregos que siempre tienen diarrea y que no se componen aunque les de medicinas? (No = 3)	0,34*
	49) Convivencia con cabras (si = 2) positivo-aumenta	Pregunta 9 De enero del 2011 al día de hoy ¿Ha comprado algún borrego? ¿Dónde lo ha comprado? (En otro municipio = 3)	0,34*
		Pregunta 50 ¿Qué otros animales tiene en su rancho que convivan con los borregos? (Cerdos = 2)	0,32*
	(50) Convivencia con cerdos (si = 2) positivo-aumenta	Pregunta 1 ¿A qué tipo de producción dedica sus borregos? (Producción de cría = 2)	0,44*
		Pregunta 2 ¿Cuánto tiempo tiene usted como productor de borregos?: (9 años o más = 5)	0,37*
		Pregunta 18 ¿De qué tipo eran las borregas que le han abortado? (Las primas = 4)	0,39*
		Pregunta 30 ¿Ha tenido o tiene borregas con "nube" en el ojo (Si = 2)	0,36*
		Pregunta 48 ¿Qué otros animales tiene en su rancho que convivan con los borregos? (Vacas, bueyes, becerros = 2)	0,40*

**Correlación Spearman significancia $P < 0,01$ *Correlación Spearman significancia $P < 0,05$

En cambio, para las variables que se asocian negativamente a ptb como “hembras que adelgazan y mueren” y “hembras con diarrea”, se tendría que cuidar que las variables que se asocian a ellas tengan mayor valor, para que disminuya indirectamente la seroprevalencia a ptb en rebaños. Cabe mencionar que no existen reportes de estudios con este tipo de asociaciones indirectas.

Para la regresión logística, solamente seis variables de la encuesta tuvieron efectos significativos al análisis univariable, posteriormente para el modelo multivariable se clasificó correctamente al 81,6% de los casos, mostrando valores de R² de Nagelkerke [43] de 0,45 (P< 0.03).

Ecuación logística: – 37,30 + [16,53 (crías nacidas con defectos) + 0,20 (hembras que adelgazan y mueren) – 0,69 (hembras con diarrea) + 0,04 (ubres con excremento) + 2,02 (convivencia con cabras) + 1,55 (convivencia con cerdos)]

Ecuación de predicción:

Existen factores importantes vinculados a ptb que han sido reportados en otros estudios [10]. Mainar-Jaime y Vázquez-Boland [22] y Muskens y col. [28] reportaron la alta densidad poblacional en un rebaño como factor de riesgo a ptb. En España, Arrazuría y col. [1] asociaron mastitis e infertilidad con ptb.

Aunque los resultados en este estudio no coinciden con los de otros autores antes mencionados, son varias las razones que podrían explicar tales divergencias, como diferencias climáticas, especies estudiadas y manejo en los rebaños; sin embargo sobresale la importancia del componente zootécnico sanidad.

CONCLUSIONES

En este estudio se determinó la seroprevalencia (28,94%) de ptb en rebaños ovinos en Nayarit, se compararon los resultados obtenidos con la prueba de ELISA y la nPCR, siendo éste el primer reporte en pequeños rumiantes en la entidad y en rebaños tropicales en México. ELISA comparada con nPCR resultó diferente, mostró alta capacidad en la identificación de animales subclínicamente afectados. Se determinaron los factores (crías nacidas con defectos, hembras de ubres con excremento, convivencia con cabras y convivencia con cerdos) que se asociaron con la seroprevalencia a ptb. Con estas mismas variables se observaron correlaciones para disminuir indirectamente la seroprevalencia a ptb. Se realizó un análisis de regresión logística y clasificó correctamente al 81,6% de los casos, R² = 0,45, P<0,03.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] ARRAZURÍA, R.; ARNAIZ, I.; FOUZ, R.; CALVO, C.; EIRAS, C.F.; DIÉGUEZ, J. Association between *Mycobacterium*

avium subsp. *paratuberculosis* infection and culling in dairy cattle herds. **Arch. Med. Vet.** 46 (1):39-44. 2014.

- [2] ATTILI, A.R.; NGU, N.V.; PREZIUSO, S.; PACIFICI, L.; DOMESI, A.; CUTERI, V. Ovine Paratuberculosis: A seroprevalence study in dairy flocks reared in the Marche Region, Italy. **Vet. Med. Int.** 2011:782-875. 2011.
- [3] BEDOLLA, C.C.; CASTAÑEDA, V.H.; CASTAÑEDA, M.A.; WOLTER, W.; ALVAREZ, M.C.; BEDOLLA, C. Paratuberculosis ovina. **Sci-cucba.** 13 (1):73-86. 2011.
- [4] BEHR, M.; COLLINS, D. Paratuberculosis: Disease. **Paratuberculosis: Organism, Disease, Control.** Canada. CABI. Pp 11-146. 2010.
- [5] CHÁVEZ, G.G. Paratuberculosis en ovinos y caprinos. **Acontecer ovino** 33: 45-7. 2006.
- [6] CHÁVEZ, G.G.; TRIGO, T.F.; SVASTOVA, P.; PAVLIK, I. Genetic polymorphism identification from *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in goats in central Mexico. **Vet. Mex.** 35:72–82. 2004.
- [7] CHRISTENSEN, H. Análisis de datos. **Estadística paso a paso.** Trillas México, D. F. Pp 90-100. 1997.
- [8] CLARK, D.L.; KOZICZKOWSKI, R.P.; RADCLIFF, R.A.; ELLINGSON, J.L.E. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: Comparing fecal culture versus serum enzyme-linked immunosorbent assay and direct fecal polymerase chain reaction. **J. Dairy Sci.** 91 (7): 2620-2627. 2008.
- [9] COELHO, A.C.; PINTO, M.L.; SILVA, S.; COELHO, A.M.; RODRIGUES, J.; JUSTE, R.A. Seroprevalence of ovine paratuberculosis infection in the Northeast of Portugal. **Small Rum. Res.** 71:298–303. 2007.
- [10] COELHO, A.C.; PINTO, M.L.; COELHO, A.M.; AIRES, A.; RODRIGUES, J. A seroepidemiological survey of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in sheep from North of Portugal. **Pes. Vet. Bras.** 30:903–908. 2010.
- [11] ERUME, J.; SPERGSE, J.; ROSENGARTEN, R. Rapid detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from cattle and zoo animals by nested PCR. **Afr. Health. Sci.** 1:83-89. 2001.
- [12] FAVILA, H.L.; HERNÁNDEZ, C.R.; CHÁVEZ, G.G. Detección de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en leche de cabras por PCR en México. **V Congreso de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos.** Mendoza, 2-4 de mayo. Argentina. Pp 1-3. 2007.
- [13] FECTEAU, M.E.; WHITLOCK, R.H.; BUERGELT, C.D.; SWEENEY, R.W. Exposure of young dairy cattle to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* through intensive grazing of contaminated pastures in a herd positive for Johne's disease. **Can. Vet.** 51(2):198-200. 2010.

- [14] GALLAGA, M.E.P. Determinación de la seroprevalencia y factores de riesgo de la paratuberculosis en las regiones caprinas de Libres y la Mixteca en el estado de Puebla. Dirección General de Bibliotecas.UNAM. México D.F. Tesis de Grado. 79 pp. 2011.
- [15] GARRIDO, J.M.; ADURIZ, G.; GARCÍA, M.J.F.; PÉREZ, V.; CHÁVEZ, G.; JUSTE, R.A. Mejora del ELISA indirecto para el diagnóstico de la paratuberculosis ovina. **Prod. Ovina Caprin.** 23:287-290. 1998.
- [16] GARRIDO, J. M.; CORTABARRIA, N.; OGUIZA, J. A.; ADURIZ, G.; JUSTE, R. A. Use of PCR method on fecal samples for diagnosis of sheep paratuberculosis. **Vet. Microbiol.** 77:379-386. 2000.
- [17] INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA Y GEOGRAFÍA- UNIVERSIDAD DE NAYARIT (INEGI-UAN). La ganadería ovina en los Estados Unidos Mexicanos: Censo Agropecuario 2012. 67 pp. 2012.
- [18] JARK, U.; RINGENA, I.; FRANZ, B.; BEYERBACH, M.; GERLACH, G.F. Development of an ELISA technique for serodiagnosis of bovine paratuberculosis. **Vet. Microbiol.** 57:189-198. 1997.
- [19] KHOL, J.L.; STEIN, B.; DREIER, S.; BAUMGARTNER, W. Paratuberculosis (Johne's disease) in small ruminants in Austria. **Slovenian Vet. Res.** 43(10):129-130. 2006.
- [20] LANDIS, J.R.; KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics.** 33:159-174. 1977.
- [21] MACKINTOSH, C.G.; CLARK, R.G.; THOMPSON, B.; TOLENTINO, B.; GRIFFIN, J.F.T.; DE LISLE, G.W. Age susceptibility of red deer (*Cervus elaphus*) to paratuberculosis. **Vet. Microbiol.** 143: 255-61. 2010.
- [22] MAINAR-JAIME, R.C.; VÁZQUEZ-BOLAND, J.A. Factors associated with seroprevalence to *Mycobacterium paratuberculosis* small ruminants farms in the Madrid regions (Spain). **Prev. Vet. Med.** 34:317-327. 1998.
- [23] MARTIN, S.W.; MEEK, A.H.; WILLEBERG, P. Muestreos. **Epidemiología Veterinaria. Principios y Métodos.** Editorial Acribia. Zaragoza. Pp 343-376. 1987.
- [24] MARTÍNEZ, C.A.G.; SANTILLÁN, F.M.A.; RUIZ, G.C.C.; FAVILA, H.L.C.; LÓPEZ, C.D.; DÍAZ, A.E.; ANDRADE, H.L.; BLANCO, O.M.A. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculosis. **Rev. Mex. Cien. Pec.** 3(1):1-18. 2012.
- [25] MEJÍA, S.P.; DÍAZ, A.E.; AGUILAR, R.F.; FAVILA, H.L.; PALOMARES, R.G.; SANTILLÁN, F.M.A.; DE LA CRUZ, C.L.; FAJARDO, G.J.; CÓRDOVA, L.D.; HUERTA, M.I.S. Enfermedades infecciosas que afectan la producción ovina en el Estado de México e Hidalgo, epidemiología. En: **Memorias de la XLVII Reunión Nacional de Investigación Pecuaria.** Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. León, Guanajuato. 12-14 Octubre, México. Pp 50-53. 2011.
- [26] MILIÁN-SUAZO, F.; SANTILLÁN-FLORES, M.A.; ZENDEJAS-MARTÍNEZ, L.; GARCÍA-CASANOVA, L.; HERNÁNDEZ-ANDRADE, A.; CANTÓ-ALARCÓN, G. J. Prevalence and associated risk factors for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy cattle in Mexico. **J. Vet. Med. Anim. Health.** 7(10):302-307. 2015.
- [27] MORÓN-CEDILLO, F.J.; CORTEZ-ROMERO, C.; GALLEGOS-SÁNCHEZ, J.; FIGUEROA-SANDOVAL, B.; AQUINO-PÉREZ, G.; AMANTE-OROZCO, A. Prevalencia de la infección por *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* en rebaños de ovinos de dos municipios de San Luis Potosí, México. **Rev Cientif. FCV-LUZ.** XXIII (4): 293-299. 2013.
- [28] MUSKENS, J.; ELBERS, A.R.; VAN WEERING, H.J.; NOORDHUIZEN, P.T. Herd management practices associated with paratuberculosis seroprevalence in Dutch dairy herds. **J. Vet. Med.** 50(8):372-377. 2003.
- [29] NIELSEN, S.S.; TOFT N. A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. **Prev. Vet. Med.** 88:1-14. 2009.
- [30] NORMA OFICIAL MEXICANA-1999. NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.- Comité Consultivo Nacional de Normalización de Protección Zoonosanitaria. Diario oficial. México. Pp 107-165. 1999.
- [31] PETIT, E. Serological survey of bovine paratuberculosis conducted in Yonne during the 98-99 campaign. **Epidemiol. Sant'e Anim.** 40: 23-39. 2001.
- [32] SANTILLÁN, F. M. A; CÓRDOVA, L. D.; GUZMÁN, R.C.C.; JAIMES, M.N.G.; HERNÁNDEZ, C.O.A. Características generales de la paratuberculosis ovina en grupos GGAVATT del estado de Guanajuato. **XLIII Reunión Nacional de Investigación Pecuaria** Sinaloa. 19-24 noviembre. México D.F. Pp 58-60. 2007.
- [33] SCHEAFFER, R.L.; MENDENHALL, W.; OTT, L. Muestreo aleatorio estratificado. **Elementos de Muestreo.** México. (Ed.) Grupo Editorial Iberoamérica. México D. F. Pp 340-360. 1987.
- [34] SEGURA, J.C.; HONHOLD, N. Muestreo en múltiples etapas. **Métodos de Muestreo para la Producción y Salud Animal.** Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán, México. 139 pp. 2000.
- [35] SERGEANT, E.S.; WHITTINGTON, R.J.; MORE, S.J. Sensitivity and specificity of pooled faecal culture and serology as flock-screening tests for detection of ovine paratuberculosis in Australia. **Prev. Vet. Med.** 52:199-211. 2003.

- [36] SINGH, S.V.; SINGH, A.V.; SINGH, R.; SHARMA, S.; SHUKLA, N.; MISRA, S.; SANDHU, K.S. Sero-prevalence of Bovine Johne's disease in buffaloes and cattle population of North India using indigenous ELISA kit based on native *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* 'Bison type' genotype of goat origin. **Comp. Immunol. Microbiol.** 31(5):419433. 2008.
- [37] SINGH, A.V.; SINGH, S.V.; SINGH, P.K.; SOHAL, J.S. Genotype diversity in Indian isolates of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* recovered from domestic and wild ruminants from different agro-climatic regions. **Comp. Immunol. Microb. Infect. Dis.** 33: e127-e131. 2010.
- [38] SMITH, N.H.; CRAWSHAW, T.; PARRY, J.; BIRTLES, R. J. *Mycobacterium microti*: More diverse than previously thought. **J. Clin. Microbiol.** 47:2551-2559. 2009.
- [39] SOBERÓN, M.A. Enfermedad de Johne. **Paratuberculosis en caprinos**. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. 5pp. 2011.
- [40] STAU, A.; SEELIG, B.; WALTER, D.; SCHROEDER, C.; GANTER, M. Seroprevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in small ruminants in Germany. **Small Rum. Res.** 105:361-365. 2012.
- [41] SWEENEY, R.W.; Pathogenesis of paratuberculosis. **The Vet. Clin. North Amer: Food Anim. Pract.** 27:537-546. 2011.
- [42] TIWARI, A.; VANLEEUEWEN, J.A.; DOHOO, I.R.; KEEFE, G.P.; HADDAD, J.P.; SCOTT, H.M.; WHITING, T. Risk factors associated with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* seropositivity in Canadian dairy cows and herds. **Prev. Vet. Med.** 88: 32-41. 2009.
- [43] VISAUTA, V.B.; MARTORII, C.J.C. Estadística multivariante. **Análisis estadísticos con SPSS para Windows**. Mc Graw Hill. Madrid España. Pp 150-170. 2003.
- [44] WHITLOCK, R.H.; BUERGELT, C. Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). **Vet. Clin. North Amer: Food Anim. Pract.** 12:345-356. 1996.
- [45] WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. (OIE). Code Sanitary for Terrestrial Animals. 2008. Manual of diagnostic tests and vaccines. Paratuberculosis Paris: OIE. En Línea: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00045.h. 25/03/2010.