

132
2 eje.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

FRECUENCIA DE PARATUBERCULOSIS
EN GANADO DE LIDIA EN TLAXCALA

T E S I S

CUE PARA OBTENER EL TITULO DE

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

HORACIO MORALES RAMIREZ

ASESOR: DR RAUL VAZQUEZ MARTINEZ



México, D.F.

1994

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A MIS PADRES:

María Esther Ramírez Labastida y

Vicente Morales Mondragón.

*Por darme la vida, su confianza y
esfuerzo.*

A MI ABUELITA:

María Cruz Mondragón Ortega.

*Por su gran bondad, su infinita paciencia y
principalmente por su desmedido amor.*

A MI ESPOSA E HIJAS:

Cecilia Beatriz Botello López,

Tania y Lidia Morales Botello.

*Por su apoyo y principalmente por el amor
y comprensión que nos une.*

A MIS HERMANOS:

Lolita, Vicente, Orlando, Salvador,

Gabriela, Fernando, María Marcia y

*especialmente a Adriana por su cariño y
gran apoyo.*

A MI ASESOR:

M. V. Z. Raúl Vázquez Martínez.

El más sincero agradecimiento.

A MI HONORABLE JURADO:

M. V. Z. Aline S. de Aluja.

M. V. Z. Arturo Olguín y Bernal-

M. V. Z. Roberto A. Cervantes Olivares.

M. V. Z. Francisco Suárez Güemes

M. V. Z. José Angel Gutiérrez Pabelló.

A ANGLO CORP, S. A. DE C. V.

En especial al Dr. Edsel Bixler Chanfreau.

*Por el estímulo y apoyo que me brindó para
finalizar este trabajo.*

*A LA FACULTAD DE MEDICINA
VETERINARIA Y ZOOTECNIA*

I N D I C E

T E M A	P A G I N A
I RESUMEN	1
II INTRODUCCION	2
III MATERIAL Y METODOS	41
IV RESULTADOS	42
V DISCUSION	44
VI CONCLUSIONES	46
VII BIBLIOGRAFIA	47

I. RESUMEN

Se midió la frecuencia de paratuberculosis de ganado de lidia nativo del Estado de Tlaxcala, principalmente de la Ganadería de Haro y de otros potreros como Coatzamalucan, El Triángulo, La Plaza y en una minoría del Estado de Querétaro. Se obtuvieron 50 muestras de heces tanto de animales con signos de enfermedad, como de animales sin signos y muestreándose indistintamente hembras y machos. Estas muestras se transportaron en bolsas de polietileno en refrigeración hasta el laboratorio de bacteriología, localizado en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (UNAM), una vez ahí, se descontaminaron para eliminar hongos y otras bacterias, se sembraron en un medio especial para *Mycobacterium paratuberculosis* (medio de Herrold's con micobactina) e incubaron a 37 °C, esperando su crecimiento hasta tres meses, para después realizar resiembras de las colonias e identificación de las mismas.

De las 50 muestras trabajadas resultaron un total de 15 positivas, lo que representa un 30% de animales positivos a la enfermedad en la zona estudiada. Se plantea la necesidad de llevar a efecto estudios de frecuencia de paratuberculosis en distintas zonas de la República para pasar de esta etapa de estudio a la de prevención y control de la enfermedad.

**TEMA: FRECUENCIA DE PARATUBERCULOSIS EN GANADO
DE LIDIA EN TLAXCALA**

II. I N T R O D U C C I O N

La inquietud que motivó la elaboración del presente trabajo fue ofrecer a los Médicos Veterinarios Zootecnistas e investigadores interesados en estudios bacteriológicos una aportación a un problema poco estudiado y con una aparente mayor incidencia en nuestro país: LA PARATUBERCULOSIS EN GANADO DE LIDIA.

Desde el punto de vista del curso que sigue la enfermedad, se puede notar que el problema tiende a agudizarse conforme pasa el tiempo, basados en las experiencias de presentación en la zona, pues se está incrementando rápidamente el número de casos (5,7,20).

II.I ANTECEDENTES HISTORICOS.

La paratuberculosis conocida también como enfermedad de Johne, enteritis crónica bacteriana y enteritis hipertrófica, afecta a ganado bovino, ovino, y caprino, así como a diversos rumiantes silvestres (5,14,18,20,32,34,38,77,93,,), equinos y cerdos (5,84). El microorganismo causal es *Mycobacterium paratuberculosis* (5,6,7,9,11,12,14,20,27,32,38,63,79,80,108,125).

En humanos existe un padecimiento conocido como Enfermedad de Crohn caracterizada por una ileocolitis granulomatosa que aunque no ha sido precisada con claridad su etiología, muy probablemente sea producida por un agente estrechamente relacionado con *M. paratuberculosis* (17,18,19,114).

D'Aroval (1826) observó una enfermedad que afectaba al ganado vacuno, la cual se presentaba como una diarrea crónica. Hansen y Nielsen en 1811, describieron que las lesiones presentes en estos animales, mostraban un engrosamiento y corrugación de la mucosa intestinal en los ovinos que morían de ese tipo de enteritis (17), mientras tanto en 1895, Johne y Frothingham demostraban la presencia de bacilos ácido-resistentes que no podían distinguirse del bacilo tuberculoso pensando que se trataría del bacilo tuberculoso aviar en caso atípico (17,32,38,80).

Bang en 1905, demostró que era un bacilo diferente al pensado, denominándolo *Enteritis pseudotuberculosis* o Enfermedad de Johne (17,32,38,125).

En 1911, Twor logró la separación de *M. paratuberculosis* mediante la adición de microorganismos ácido resistentes y otras especies bacterianas muertas por calor en el medio, que le proporcionaban los nutrientes necesarios para su crecimiento (17,38,80,103,108).

Francis et al en 1953, aislaron a partir de *Mycobacterium phlei* una substancia que llamaron micobactina que favorece el aislamiento de *M. paratuberculosis* (38,108).

Posteriormente, se obtuvo otro tipo de micobactina denominada J a partir de una cepa de *M. paratuberculosis*, que para su aislamiento primero requirió de micobactina. Esto significaría según Merkal (63) que *M. paratuberculosis* poseía la información genética para la producción de micobactina, pero debido a las condiciones de su hábitat dentro de los macrófagos se había inhibido la síntesis de esta micobactina. El empleo de la micobactina homóloga J, a diferencia de la micobactina heteróloga P, incrementa los aislamientos de *M. paratuberculosis* a partir de los tejidos infectados así como la proporción de microorganismos observados en las colonias (53).

Taylor en 1945 trabajó en el aislamiento de microorganismos a partir de ovejas y cabras (32,38). Tiempo después logró el aislamiento de cepas procedentes de ovejas, una en Islandia y dos en Escocia. La cepa islandesa y una de las cepas escocesas correspondieron al tipo bovino clásico, mientras que la otra cepa escocesa resultó ser una cepa sumamente pigmentada y se le consideró como una variedad del tipo clásico (12,38,120). A ambos tipos se les cultivó en un medio con 60% de yema de huevo, demostrándose que eran capaces de enfermar a bovinos y de mantener sus características de cultivo después de aislarlas de dichos bovinos (32,38). En 1965, Stuart obtuvo de manera experimental la variedad pigmentada de *M. paratuberculosis* a partir de un bovino (12,38).

Merkal y Carrant en 1983, sugirieron la incapacidad de *M. paratuberculosis* para obtener ion férrico del medio, lo que comprobó su dependencia de la micobactina (38).

En México, el primer trabajo data de 1936 y corresponde a Unzueta, R.J. quien realizó un estudio de enteritis paratuberculosa bovina (111).

En 1974, Bustamante, X. realiza una detección de anticuerpos a *M. paratuberculosis* por medio de la prueba de fijación de complemento y para ese mismo año, Garibay, V. contribuye con

una prueba doble comparativa intradérmica a la tuberculina aviar y mamífera para identificación de reactores a *M. paratuberculosis* en un hato de bovinos (13,32).

En 1979, Ramírez et al, describen el primer aislamiento e identificación de *M. paratuberculosis* realizado en México, a partir de muestras de ganglios mesentéricos e intestino delgado de bovinos lecheros sacrificados en el rastro de Tulancingo, Hgo. (80).

También en 1979, Trigo, F. J., presenta un trabajo recapitulativo de los métodos utilizados en el diagnóstico de la paratuberculosis (108).

En 1983, Ramírez, P., realiza un estudio serológico de paratuberculosis en ovejas y cabras (81).

Para 1985, Ramírez, C. et al, confirman la presencia de *M. paratuberculosis* en una ganadería de toros de lidia de un hato localizado en el Estado de Michoacán, mediante pruebas de intradermorreacción (Johnina) y cultivo de heces (14,20,79).

Los últimos estudios realizados corresponden a Barajas, J. et al en 1987-1988, quien realiza diagnóstico clínico, así como aislamiento e identificación de *M. paratuberculosis* en ganado de lidia (6,7).

II.II IMPORTANCIA ECONOMICA

No se han realizado estudios que indiquen con exactitud las pérdidas económicas de la paratuberculosis, producidas por emaciación, muerte y disminución de la productividad, sin embargo, algunos autores estiman que en presencia de la infección la producción de leche puede disminuir hasta en un 24%, presentarse infertilidad y ser susceptibles a afecciones como la mastitis. En Estados Unidos en 1987 se estimó que la pérdida anual por animal adulto a causa de la enfermedad clínica fue de 75 dólares (9,17,63,78).

II.III DISTRIBUCION GEOGRAFICA

A nivel mundial se conoce que en Dinamarca, Holanda, Bélgica y Francia la enfermedad de Johne es endémica (11,12,32,38,105), en Canadá y E.U.A. no es un gran problema; en Inglaterra e Irlanda la enfermedad es más común de lo que sugieren los casos clínicos registrados (38,105). En todos estos países afecta tanto a vacunos como a ovinos, pero se ha descrito con mayor frecuencia en animales silvestres cautivos en lugares como haciendas, granjas o zoológicos (12,34,38,63,77,89,105,108). Al mejorar los métodos de diagnóstico se ha visto que la enfermedad y su propagación están más extendidos de lo que se creía (5,12,34,38,77,93,105,108).

En México también se ha descrito la enfermedad, pero se desconoce la prevalencia e incidencia en las diferentes especies susceptibles (5,6,13,32,79,80).

II.IV ETIOLOGIA.

El agente etiológico de la paratuberculosis pertenece al Orden de los Actinomicetales, a la Familia Mycobacteriaceae, al Género *Mycobacterium* y a la Especie *Mycobacterium paratuberculosis* (35), conocido también como *Mycobacterium johnei*, *Mycobacterium enteritidis*, bacilo de Johne y bacilo de la enfermedad de Johne (32,38). La introducción de nuevas técnicas bioquímicas, químicas y genéticas permite establecer actualmente las diferencias entre *Mycobacterium* y otras bacterias relacionadas. Las bacterias del género *Mycobacterium* se han clasificado dentro de dos categorías: de crecimiento rápido (colonias visibles a simple vista en menos de siete días de cultivo) y de crecimiento lento (necesitan 7 días o más para que puedan ser observadas (35). *M. paratuberculosis* se encuentra clasificada dentro de las Micobacterias de crecimiento lento con requerimientos nutricionales especiales para su aislamiento (35), es carente de esporas y cápsula y mide de 0.5 a 1.0 micra de largo (12,27,32,38). Se encuentra en acúmulos (útil para su identificación) en tejidos y materias fecales (17,32,38,108).

Es característica de *M. paratuberculosis* la ácido y alcohol resistencia (5,6,9,11,12,17,32,38,41,50,79,81,103,108), por lo cual, se utilizan sustancias ácidas o alcalinas para eliminar bacterias contaminantes en el proceso de cultivo (5,38,67,120).

Una de las principales características es su dependencia a la micobactina exógena para su crecimiento *in vitro* (14,17,38).

Las características de las colonias bacterianas es que son firmes, suaves y lisas-rugosas, pudiendo haber variaciones en la coloración de algunas cepas que producen pigmento amarillo naranja (17,38).

Asimismo, pruebas de inmunolectroforesis cruzada y de ADN micobacteriano demuestran una similitud entre *M. paratuberculosis* y *M. avium*, debido a lo cual algunos autores (Thorel y Saxegaard entre otros) opinan que *M. paratuberculosis* debería ser clasificado dentro del grupo del *M. avium* de acuerdo al Complejo *M. avium* - *intracellulare* (17,91,107), aunque dicha sugerencia no es compartida por Kunze y otros investigadores, que demuestran una clara diferencia de identidad entre las secuencias de inserción IS900 e IS901 que presentan *M. paratuberculosis* y *M. avium*, además, de mostrar diferencias de virulencia, características de cultivo y clara dependencia a la micobactina en su desarrollo en el laboratorio en el caso de *M. paratuberculosis* (45,56).

Camphausen en 1985 encuentra que *M. paratuberculosis* posee el antígeno glicopeptidolípido inmunorreactivo (GLP-I) y es responsable de la seroespecificidad de los serotipos 2 y 8 pertenecientes al Complejo *M. avium/M. intracellulare/M. scrofulaceum* (MAIS), aunque no todas las cepas pertenecientes a este grupo producen este antígeno, como las cepas rugosas (14).

M. paratuberculosis persiste en los pastizales sin multiplicarse durante períodos prolongados, conservando su capacidad infecciosa hasta por un año, bajo condiciones favorables de humedad y factores químicos del suelo, ya que este microorganismo es relativamente susceptible a la desecación, luz solar, concentraciones elevadas de calcio y pH del suelo; el contacto permanente con las heces y orina disminuye su longevidad (12,79).

II.V VIA DE TRANSMISION

La vía de transmisión más común es la oral por ingestión de agua y alimentos contaminados con heces que contienen la bacteria (5,12,32,38,63,118) la cual se establece en el intestino y penetra la mucosa para pasar a ganglios mesentéricos y en ocasiones a la sangre donde se transportan a diferentes órganos, pudiendo llegar a glándula mamaria y útero de hembras gestantes que a través de la barrera placentaria puede ocasionar infecciones congénitas (5,11).

Se sospecha de una transmisión genital pues se considera que el toro puede infectar a la vaca al momento de la monta (12,32,38,63,118), ya que a partir de genitales y semen de toros infectados se ha aislado el microorganismo, el cual sobrevive a la adición de antibióticos, a la congelación y como consecuencia de la inseminación sobreviene la infección intrauterina (12,92).

Se considera predisponente el tipo de suelo, ya que algunos autores mencionan que suelos con pH ácido puede ser un factor importante a considerar en la presentación de la enfermedad (17), mientras que otros mencionan que suelos calcáreos alcalinos desarrollan la enfermedad con mayor frecuencia (12,38). Otros factores importantes a considerar son estado inmunológico del animal, cantidad de bacterias ingeridas, aunque datos de morbilidad determinan que una pequeña cantidad de bacilos sería suficiente para provocar la enfermedad. En adición a lo antes mencionado, un estrés fisiológico como la gestación, la lactación o bien, una sobrepopulación facilitarían la presentación de la enfermedad (4,17,45).

En cuanto a la edad en que son más susceptibles los animales, los investigadores mencionan diferentes rangos, así Guillespie, J. H. et al (1983) entre otros, mencionan que se ven más afectadas las hembras de dos a tres años y sobre todo al inicio de la lactación;

Chiodini et al., (1984) y Chávez, G. (1993), consideran que son más susceptibles de infectarse a una edad de 30 días; Barajas, J.A. (1987) indica como más susceptibles a los becerros de menos de tres meses (5,12,14,17,32,38).

Respecto a la resistencia por parte del animal no se conoce aún con certeza la naturaleza de ésta a la enfermedad; algunos trabajos experimentales indican que a medida que aumenta la edad el individuo es capaz de desarrollar una resistencia. Al respecto, Chiodini (1993) sugiere una explicación fisiológica asociada al funcionamiento de la canaladura esofágica en los rumiantes jóvenes, ya que la ingesta tiene un paso directo al abomaso, de tal manera que conforme avanza la edad de los rumiantes, el alimento consumido y contaminado de micobacterias pasarían directamente al rumen, con lo cual las posibilidades de infección se verían disminuidas (16). Así también, se ha observado determinada resistencia a la enfermedad en las etapas tempranas de la vida por los altos títulos de anticuerpos derivados del calostro (17).

En el ganado bovino se plantea la existencia de una resistencia asociada a la raza. Así las razas encaminadas a la producción de carne generalmente presentan una menor incidencia de la enfermedad que el ganado productor de leche, por situarse en áreas más extensas y tener una relación menos estrecha con otros animales que pudieran

estar eliminando micobacterias a través de las heces. Debido a esto, no se ha fundamentado una diferencia real entre susceptibilidad y resistencia entre razas (17).

II.VI SIGNOS DE LA ENFERMEDAD.

La paratuberculosis es una enfermedad de curso crónico pudiendo diseminar el microorganismo en las heces los animales de 6 meses a 3 años antes de que comiencen a manifestar signos clínicos de paratuberculosis (5,6,7,9,11,17,20,38,62,92).

La edad promedio de los toros de lidia con signos clínicos de paratuberculosis es de 3.5 años en un período de 2 años 4 meses a 5 años, en las hembras la edad promedio es de 4 años 5 meses en un período de 4 a 5 años (5).

Los signos que se presentan al principio de la enfermedad son: edema submaxilar (asociado a la hipoproteinemia), pelo opaco e hirsuto y falta de flexibilidad en la piel, diarrea profusa en forma de chorro que en ocasiones contiene burbujas de gas y un olor desagradable, extremidades posteriores y colas sucias por materias fecales líquidas, deshidratación, globos oculares hundidos en las órbitas y desaparición de la grasa retroocular (5,12,14,17,32,38,63,79).

Al momento en que comienza la diarrea, los animales pueden morir en el término de una semana, o bien mejorar, pero la emaciación y caquexia continúan, reincidiendo en un segundo ataque de diarrea (5,12,32,38,63). Algunos casos crónicos se recuperan por completo, sólo para recaer en el principio del nuevo período de lactancia al año siguiente (12,13,32,38).

Se observa que las hembras gestantes manifiestan alguna mejoría en el último tercio de la gestación, para volver a recaer después del parto; no se observa falta de apetito (79).

Se registra a veces alguna recuperación pasajera cuando se retira a los animales de los campos de pastoreo y se les administra piensos secos (12).

Körmendi, llevando a cabo estudios bioquímicos en la sangre de animales afectados de paratuberculosis, pudo comprobar aumentos en los valores de las actividades de la Creatinina quinasa (CK) y de la Fructuosa -1,6 difosfato aldolasa (ALD) como resultado de alteraciones en la permeabilidad de la membrana de las células musculares esqueléticas y por un aumento en las concentraciones de triglicéridos como de las proteínas totales en asociación a la reducción de la masa corporal y de la producción de estos animales, por lo cual sugiere que estas pruebas brindarían una ayuda complementaria para el diagnóstico de la paratuberculosis (55).

Otro de los signos en las vacas afectadas por la enfermedad es su predisposición a padecer mastitis, probablemente inducida por una inmunosupresión local. Así también se ha observado que en hembras gestantes, a menudo los bacilos se agregan en los cotiledones placentarios, llegando a provocar placentitis y abortos. Pero solamente en pocas ocasiones se han aislado micobacterias del feto abortado a partir de vísceras, pero no así del tracto gastrointestinal (17).

II.VII LESIONES DE LA ENFERMEDAD.

Lesiones macroscópicas:

Los signos clínicos no siempre son indicativos de la severidad de las lesiones, sobre todo en los casos de los ovinos y caprinos. En bovinos, las lesiones características son una reacción granulomatosa difusa, sin necrosis, hiperemia o fibrosis, en algunas ocasiones la mucosa tiene una apariencia granular. En los ovinos y caprinos pueden observarse lesiones caracterizadas por una necrosis caseosa, calcificación y fibrosis, de manera similar a como sucede en la tuberculosis (17,71).

M. paratuberculosis infecta los ganglios mesentéricos y tubo digestivo (12,33,38,50,61,63,120), empezando en la última porción del intestino delgado, ciego y la primera porción del colon (11,38); las lesiones raramente se extienden al colon distal y al recto (11).

Las lesiones se presentan como engrosamientos y estriaciones en la pared intestinal asemejando las circunvoluciones superficiales de la corteza cerebral, en ocasiones se presentan hemorragias y petequias (11,12,32,33,38,63,108,118). En las lesiones post-mortem se observan engrosamientos y rugosidades características del ileon, ciego y primera porción del intestino grueso, la válvula ileocecal se observa engrosada y los ganglios linfáticos mesentéricos adyacentes presentan hiperplasia de la médula (5). Otros autores mencionan que las lesiones a la válvula ileocecal y al yeyuno son predominantemente más tempranas (17,76). En los ganglios se observa un aumento de volumen y edema en ocasiones zonas de calcificación. Los ganglios más afectados son los de la región ileocecal (17). A pesar de que la mayoría de los autores mencionan que no existe daño a otros órganos comúnmente (11,12,32,33,38,63,108,118), Hines y colaboradores, indican que otros órganos afectados con menor frecuencia son el hígado, donde no se aprecian lesiones macroscópicas, pero histológicamente se caracteriza por presentar una hepatitis granulomatosa multifocal; los riñones, sobre todo a nivel cortical que presentan nodulaciones de 0.5 cm. de diámetro y que hacen ligeras prominencias hacia la superficie y rara vez en la

médula (46). Vascularmente se han observado calcificaciones principalmente a nivel de la aorta abdominal en el ganado bovino. Otras lesiones macroscópicas son el hidroperitoneo y el hidrotórax, cambios asociados a la presión osmótica. La atrofia serosa de la grasa es otro de los hallazgos más frecuentes en los casos clínicos de la enfermedad (17).

Lesiones microscópicas:

Las lesiones histológicas se distribuyen principalmente a nivel intestinal, sobre todo en el intestino delgado, produciendo una enteritis granulomatosa, que se localiza tanto en las placas de Peyer, como en la lámina propia de la mucosa intestinal, mostrando diferentes grados de evolución. Estas lesiones que son características de la paratuberculosis, se distinguen por presentar agrupaciones de macrófagos de citoplasma abundante y de aspecto espumoso, que ocasionalmente llegan a desarrollar células gigantes tipo Langhans y tanto en este tipo celular como en los macrófagos pueden observarse micobacterias en su interior. Dependiendo del grado de afección, las lesiones pueden llegar a distorsionar y engrosar la morfología de las vellosidades intestinales, que corresponderían con el engrosamiento de la mucosa observado macroscópicamente. Algunos autores consideran que en fases tempranas de la paratuberculosis las lesiones granulomatosas son nodulares y de tipo tuberculoide, que gradualmente confluyen haciéndose difusas llegando a obliterar a las

criptas intestinales y a éstas últimas las consideran de tipo lepromatoso. La lesión granulomatosa puede llegar a infiltrar la submucosa y la serosa en donde los vasos linfáticos pueden estar lesionados produciéndose una endolinfangitis granulomatosa y en su interior contener células epitelioides (17,46). Existen numerosas evidencias que describen el importante papel de las placas de Peyer como sitio inicial del desarrollo de las lesiones de la paratuberculosis como se describen en algunos trabajos experimentales (31,53,73,76).

En los ganglios linfáticos mesentéricos, fundamentalmente las lesiones se localizan a nivel paracortical y en los senos subcapsulares, caracterizadas por la formación de nidos de macrófagos y células gigantes conteniendo micobacterias tal y como sucede en el intestino. En los senos subcapsulares se aumenta la presencia de histiocitos que posteriormente confluyen hacia la corteza del ganglio linfático afectado (17,46).

En los casos de que suceda una diseminación de la paratuberculosis a otros órganos extraintestinales éstos pueden verse afectados. En el hígado se demuestra una hepatitis granulomatosa multifocal, constituida por macrófagos, células epitelioides, células gigantes multinucleadas y algunas veces la lesión puede verse acompañada de neutrófilos. A nivel de los septos interlobulares del pulmón, los vasos linfáticos llegan a presentar una dilatación

conteniendo células gigantes multinucleadas tipo Langhans, células epitelioideas así como linfocitos y neutrófilos en escasa cantidad alrededor de pequeños focos necróticos, sin embargo, no se ha observado la presencia de micobacterias en el interior de estas lesiones. Entre las lesiones vasculares que han sido descritas en asociación con la paratuberculosis, están el engrosamiento de la capa interna, acompañada de placas de calcificación y degeneración de los miocitos con mineralización de las fibras elásticas que se integran a la capa media de los vasos; éstos cambios histológicos se han llegado a observar a nivel de la aorta abdominal y del corazón. En cabras afectadas severamente, en algunos casos, se ha descrito la presencia de material amiloide en órganos como las glándulas adrenales, vejiga y a nivel de los glomérulos renales, probablemente relacionado a un fenómeno mediado por complejos inmunes (71).

El tejido nervioso a nivel del nervio ciático y plexo braquial, ha mostrado una degeneración asociada a esta enfermedad. Estas lesiones recuerdan a aquellas de la lepra (17).

II.VIII INMUNIDAD

M. paratuberculosis induce inmunidad celular por su capacidad de ser intracelular (118). La gran parte de las células T reconocen al receptor antigénico Alfa-Beta-CD3, pero un pequeño porcentaje no

lo expresan a éste, pero sí a un segundo tipo de receptor denominado Gamma-Delta. En un estudio realizado, empleando una línea de células con receptores Alfa-Beta y Gamma-Delta, al exponerlas a una proteína micobacteriana clonada de BCG denominada proteína de choque térmico de 65 kDa (43); frecuentemente son el blanco de las respuestas inmune humoral y celular durante las infecciones y las enfermedades autoinmunes (49), son sintetizadas en respuesta a incrementos repentinos de temperatura o estresores medioambientales; estas proteínas HS, de las células procarióticas y eucarióticas poseen propiedades antigénicas, son polipéptidos filogenéticamente preservados en las células procarióticas con una amplia distribución en la naturaleza, se observó una mayor reacción de los linfocitos Gamma-Delta (43), que según Happ et al., este tipo de linfocitos pueden presentarse como respuesta de especificidad fina celular a un antígeno micobacteriano como la BCG (42).

II.IX DIAGNOSTICO

Existen varios métodos para diagnosticar esta enfermedad, el valor de estas diferentes pruebas esta determinado por la sensibilidad o especificidad que ofrece cada una de estas.

La sensibilidad se define como la capacidad que posee una prueba para identificar los animales infectados con un resultado positivo mientras que la especificidad es la habilidad de una prueba para identificar a los animales no infectados con un resultado negativo. No se ha encontrado hasta el momento alguna prueba de laboratorio que nos permita diferenciar con un 100% de certeza, a los animales infectados de paratuberculosis de los no infectados. Se ha establecido como regla general en las diferentes pruebas que se tienda a establecer un balance entre la sensibilidad y la especificidad, pues existe un punto en el que si es aumentado, ya sea la sensibilidad o la especificidad se hace disminuir uno u otro parámetro (44).

1. Examen clínico

De acuerdo con Larsen el ganado expuesto al contacto con M. paratuberculosis puede ser clasificado en cuatro categorías: animales clínicamente enfermos, animales asintomáticos pero que eliminan bacilos, animales portadores que no eliminan bacilos y animales no infectados (11,108).

Este método tiene la limitante de que sólo sirve cuando los animales presentan signos de la enfermedad (9,11,12,32,38,108).

2. Métodos inmunológicos.

2.1. Pruebas de evaluación de inmunidad celular.

2.1.1 In vivo

Intradermorreacción:

Las pruebas in vivo de inmunidad celular son las primeras que se emplearon en el diagnóstico de la paratuberculosis, basándose en un inicio en tuberculina aviar y posteriormente johnina en inoculación intradérmica. La prueba se efectúa inyectando intradérmicamente en la región cervical 0.2 ml. de Johnina también llamada P.P.D. (derivado proteico purificado del medio de cultivo de M. paratuberculosis). La prueba se lee a las 48 horas de la inyección y un aumento mayor de 5 mm. de diámetro se considera positivo. Las inoculaciones intradérmicas han sido modificadas por la administración intravenosa de tuberculina aviar o johnina. La inyección intravenosa de 2 a 4 ml. de johnina induce un aumento de temperatura en los animales sensibilizados; un aumento de 1 °C después de transcurridas de 5 a 8 horas de aplicada la inyección se considera como positivo. Si se utiliza tuberculina aviar, se inyectan 10 ml. y también se requiere de un aumento de 1 °C en la temperatura del

animal en el transcurso de 5 a 8 horas para considerarlo positivo. Aunque ambas pruebas son de cierto valor para determinar la existencia de la enfermedad en el hato a principio de esta, ninguna de ellas es lo bastante específica como para confirmar la enfermedad Johnne, aparte de la reacción cruzada que se presenta con *M. avium* (6,9,12,13,32,33,38,62,63,75,79,108,118,125). Estas pruebas en comparación con medios bioquímicos de cultivo, tienen una especificidad del 35 al 40% y una sensibilidad de 50 a 55% (6).

2.1.2 In vitro

Transformación de linfocitos.

La transformación de linfocitos ha mostrado resultados halagadores, sin embargo, la tecnología y el equipo requeridos para realizarla, limitan su utilización como una prueba práctica (11,108), y los resultados mostrados por ésta no han demostrado ser útiles en la detección individual de animales infectados de paratuberculosis (6,47).

Prueba de Gamma-Interferón

En los últimos años se ha desarrollado la Prueba de Gamma-

Interferón, que al principio de su uso se aplicaba en pacientes humanos. Esta prueba in vitro detecta la producción de Gamma-Interferón inducida por antígenos específicos en linfocitos previamente sensibilizados en sangre completa adicionada de heparina. La medición de esta linfoquina se realiza mediante una prueba de ELISA de captura (29,122). Por esta técnica es factible detectar hasta unos 25 pg/ml de Gamma-Interferón recombinante en el plasma (87). Otros factores que pueden influir en la producción del gamma-interferón es la presencia o adición de adyuvantes en las muestras de sangre (28).

Esta prueba se ha aplicado para el diagnóstico de la tuberculosis bovina, mostrando una mayor sensibilidad y especificidad que la prueba de ELISA indirecta (85,88). Por otro lado al compararse con la prueba de intradermorreacción también demostró poseer una mayor sensibilidad y especificidad (122).

Se ha encontrado que esta prueba de gamma-interferón, utilizándose en el diagnóstico de paratuberculosis tiene ventajas sobre las técnicas serológicas, ya que puede detectar aquellos animales que se encuentran en fase temprana de la infección. Para esto se emplean como antígenos a la PPD bovina y a la PPD aviar, teniendo en consideración para esto, la estrecha relación antigénica que presentan *M. avium* y *M. paratuberculosis*. (3,15).

Para el ganado bovino se estima que la prueba de gamma-interferón posee una sensibilidad entre el 70 y 94% con una especificidad que oscila entre un 97 y 99%. Sin embargo, no se tiene la suficiente experiencia para evaluar la validez de esta prueba en el diagnóstico de la paratuberculosis de ovinos y caprinos (44).

2.2. Pruebas de inmunidad humoral.

- Prueba de fijación de complemento.

Parece evidente que al utilizar como método de diagnóstico la Fijación de Complemento (FC'), fundamentalmente se detecta la producción de anticuerpos hasta que la infección esta bien desarrollada, asociándose éstos resultados positivos a la eliminación constante en heces de un gran número de micobacterias en los animales infectados. Por lo que se detectarían los animales que se encuentran en las fases clínicas de la enfermedad. Sin embargo, los resultados positivos en esta prueba son irregulares (6,11,13,32,33, 38,55,61,62,63,65,81,95,103,108,120). Esta aseveración no tiene concordancia con las investigaciones hechas en el ganado bovino, ovino y ruminantes silvestres que sugieren la

habilidad de la prueba para el diagnóstico de las fases subclínicas de la enfermedad (36,44,83,120). Cuando se emplea como punto de corte la reacción 1:8, en los animales subclínicamente afectados se obtiene una especificidad entre 95 y 97% y entre un 21 y 52% de sensibilidad (44). Presenta la desventaja de tener reacciones cruzadas que produce con otras micobacterias, incluyendo *M. bovis* y *M. avium*; también puede presentarse reacción cruzada con antígenos comunes del género *Corynebacterium*. Así como el problema que presenta en la estandarización de acuerdo a los diferentes laboratorios que la desarrollan (1,6,11,21,44,55,61,63,75,81,82,103,108, 119,120).

- Prueba de hemoaglutinación.

Esta prueba esta basada en la adsorción de un antígeno adecuado sobre eritrocitos de carnero, para buscar posteriormente su aglutinación por un suero inmune. Presenta las mismas limitaciones que la prueba de fijación de complemento, es decir, reacciones cruzadas con otras micobacterias (6,11,38,62,108).

- Prueba de precipitación.

En ovinos infectados experimentalmente los anticuerpos precipitantes se desarrollan primero; seguidos de los hemoaglutinantes y por último los fijadores del complemento. Dichas precipitinas continúan aumentando con la infección y decrecen conforme los animales se van recuperando (108). La aplicación de las pruebas de precipitación para la diagnosis de la enfermedad de Johne en ganado no fue satisfactoria, por una relativa insensibilidad para la detección de casos subclínicos y clínicos de la enfermedad así comparadas por pruebas de Fijación de Complemento, Hemoaglutinación ó Inmunofluorescencia (6). Principalmente se utiliza en ovinos y caprinos, no siendo recomendable por la mayoría de los autores para el diagnóstico de la infección de bovinos (5,6,108).

- Prueba de inmunofluorescencia.

Investigadores reportan más especificidad en esta prueba que con la prueba de Fijación de Complemento; dio tan buen resultado como la prueba de Fijación de Complemento para la confirmación de la enfermedad de Johne cuando las lesiones están avanzadas (11).

Otros autores reportan que son detectables anticuerpos de *M. paratuberculosis* en estados más tempranos de la infección que en la prueba de Fijación de complemento, sin embargo, debido a las variaciones de negativo a positivo y regreso a negativo en las pruebas sucesivas la prueba de inmunofluorescencia no fue considerada de valor para la detección de la infección de *M. paratuberculosis* como una prueba simple (11,108). Se consideran títulos positivos aquellos superiores a 1:16 (108).

- Prueba de floculación de bentonita.

Se utilizaron como antígeno partículas de bentonita sensibilizadas con tuberculina de Koch. La dilución final del suero que aglutina a las partículas se toma como título de anticuerpos. Presenta el problema de que no diferencia las infecciones de la tuberculosis (108).

- Prueba de inmunoabsorbencia enzimática ligada a enzima (ELISA).

Se considera como la prueba con el mejor balance entre

sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de la paratuberculosis, es una prueba capaz de detectar una mayor cantidad de animales afectados subclínicamente. Se estima que tiene una especificidad que oscila entre un 87 y un 99.9% (6,7,26,44,68,83,102,107,124,126). Cuando esta técnica se utiliza como diagnóstico en bovinos afectados subclínicamente muestra una especificidad del 99% y una sensibilidad del 47.3% (6,7,23). En ovinos y caprinos muestra resultados satisfactorios con una especificidad y sensibilidad que oscila del 93 al 96.8% y del 28 al 64.7% respectivamente de acuerdo a diferentes autores (31,44,69). Al igual que las otras pruebas serológicas presenta problemas de reacción cruzada con otras especies del género *Mycobacterium* o con *Nocardia asteroides*, aunque algunos investigadores mencionan que al realizar diluciones del antígeno ayudaría a eliminar las reacciones cruzadas (26). Otro método utilizado para eliminar las reacciones cruzadas es la previa adsorción del suero con *M. phlei*, así se logra aumentar la especificidad de un 78.8 al 96.2% utilizando el mismo tipo de título y se reduce su sensibilidad (8,109,127).

Otro de los problemas que se presentan en la técnica de ELISA es determinar el título cuando un animal es positivo, es uno de los mayores dilemas que se plantean en los laboratorios (6,30).

El empleo de vacuna muerta de paratuberculosis en los vacunos, produce falsos positivos entre los 2 y 6 meses posteriores a la vacunación de los animales (100).

- Inmunodifusión en Gel de Agar (IDGA).

Es una técnica que se realiza a bajo costo, fácil de realizar y de interpretar que la prueba de Fijación de Complemento. Es capaz de detectar anticuerpos entre los 3 y 9 meses posteriores al inicio de la eliminación de bacterias en heces, en animales subclínicamente afectados se observa una mayor positividad cuando estos animales eliminan más micobacterias en heces; aunque en otras investigaciones realizadas donde la IDGA producía los resultados más pobres respecto a la FC' y al ELISA en los sueros procedentes de animales positivos al cultivo (21,95,99), sin embargo presenta la mejor correlación entre cultivo negativo con resultados negativos (126). Otros resultados obtenidos hacen énfasis en la utilidad de la prueba de IDGA en el ganado ovino, no observándose resultados falsos positivos y presentándose una asociación clara con la severidad de las lesiones y con la respuesta inmune. Por lo que demuestra mejores resultados con los animales con lesiones granulomatosas más extensas. De tal manera que la IDGA es una

prueba recomendable para la confirmación del diagnóstico de animales con signos clínicos (97). Cuando se realiza una preabsorción en los sueros con *M. phlei*, se mejora la especificidad de la prueba y su sensibilidad es menor que aquella observada en ELISA (64).

La IDGA posee una sensibilidad del 50% aproximadamente en los animales clínicamente afectados y entre un 26.7 al 29% en los animales afectados subclínicamente (44,89,96,99). La IDGA es una prueba útil en la confirmación de la paratuberculosis, no obstante, los resultados negativos no excluyen la posibilidad de la infección en los animales (44).

Se demuestra que empleando la IDGA en bovinos vacunados provoca resultados falsos positivos (94).

3. Método microscópico.

Este método tiene múltiples desventajas, así que sólo aquellos animales que eliminan grandes cantidades de bacilos pueden ser detectados, también, que en ocasiones se requiere examinar bastantes laminillas para identificar a los microorganismos y por último, que se necesita de cierta experiencia para diferenciar *M. paratuberculosis* de otras micobacterias saprófitas (6,11,38,62,108).

Este método es útil, cuando los frotis se realizan a partir de ganglios linfáticos mesentéricos o de raspados de la mucosa intestinal (6,11,61).

El examen directo de frotis fecales teñidos es un buen método cuando hay diarrea; poseen valor diagnóstico innegable los acúmulos de bacterias ácido resistentes en las células epiteliales, lo cual se observa con más frecuencia durante episodios diarreicos que en periodos de normalidad, ya que las células epiteliales se desprenden más fácilmente (6,11,12).

4. Método bacteriológico

El cultivo a partir de heces es un método bastante útil para diagnosticar la enfermedad en animales eliminadores de micobacterias tanto para la confirmación de los animales que presentan signos clínicos, como en aquellos que se encuentran en las fases subclínicas de la enfermedad (12,32,33,38,62,65,74,79,89,108). Este método presenta serios inconvenientes, pues el aislamiento a partir de heces produce contaminación de los medios de cultivo por una gran cantidad de bacterias del tracto gastro intestinal, incluyendo otras micobacterias saprófitas, por lo que se han utilizado diferentes descontaminantes como el cloruro de benzalconio, ácido oxálico, cloruro de hexa-decil piridino, hidróxido de sodio (14,118). Cuando las muestras procedan de ganado bovino, se recomienda además para

obtener buenos resultados la utilización del medio de Herrold's. Sin embargo, aunque en muestras de caprinos se ha utilizado el medio de Herrold's, se logran mejores resultados cuando se utiliza el medio de cultivo Löwenstein-Jensen con micobactina J y sin piruvato de sodio. Estas diferencias en los requerimientos para el crecimiento de las micobacterias podrían indicar diferentes tipos de *M. paratuberculosis* que producen la enfermedad en el ganado bovino y en los pequeños ruminantes (5,15,74,86,89,108,117,118) y como sugieren algunos autores las micobacterias aisladas de los casos de ovinos y caprinos podrían tener una relación muy estrecha con *M. avium*. (24,90).

En los casos de cabras sospechosas de paratuberculosis también el medio de Dubos se ha empleado con resultados satisfactorios al que se le adiciona carbenicilina, polimixina, trimetoprim, y anfotericina B para evitar contaminaciones (89). Con el fin de obtener mejores resultados en el aislamiento bacteriológico se adicionan diferentes compuestos a los medios de cultivo como el sorbato de polioxietileno (Tween) y Middlebroock 7H9 (Tween 60) que si bien aumenta el aislamiento micobacteriano puede modificar la morfología de las colonias de *M. paratuberculosis* cambiando de una morfología rugosa a lisa. Mediante la microscopía electrónica se ha observado alteraciones en la superficie de la pared celular, así que esto puede modificar las características bioquímicas, antigénicas y de virulencia de estos aislamientos bacteriológicos (89).

Una de las desventajas que presenta el aislamiento microbiológico es que el organismo requiere de 9 a 14 semanas para crecer (89,108,117).

5. Métodos inmunohistoquímicos.

Se ha comprobado que estas técnicas resultan ser más sensibles en la detección de *M. paratuberculosis* como de otras micobacterias al compararse con la técnica convencional de Ziehl-Nielsen. Esta ventaja se hace patente sobre todo en aquellas secciones que presentan una escasa cantidad de micobacterias, de tal manera que facilitan su observación en los tejidos afectados. Los diferentes métodos inmunohistoquímicos con los que más se han trabajado son: la Peroxidasa-anti-Peroxidasa, Avidina-Biotina-Peroxidasa, Estreptoavidina- Biotina-Peroxidasa (30,59,72).

6. Detección del ADN micobacteriano (Hibridación de ADN, Análisis de Restricción de Endonucleasas, Reacción en Cadena de la Polimerasa).

Las similitudes existentes entre las bacterias del género *Mycobacterium*, ocasionan problemas para establecer un diagnóstico preciso. Debido a esto, innovadoras técnicas diagnósticas han abierto nuevas vías para establecer un diagnóstico más certero en las

enfermedades infecciosas. Estas pruebas se realizan rápidamente y poseen una buena especificidad en la detección de los microorganismos (57,70).

Este tipo de pruebas surgen como un recurso valioso para la clasificación de micobacterias, en especial entre aquellas que muestran una estrecha relación como la que presentan *M. paratuberculosis* y *M. avium* (2,40). Aunque algunos autores opinan que la utilización de la prueba de hibridación, no es capaz de distinguir entre *M. paratuberculosis* y *M. avium*, otros investigadores demuestran la ventaja de esta prueba para distinguir entre *M. paratuberculosis* y las serovariedades 2 y 3 de *M. avium* así como *Nocardia asteroides*, destacando la importancia de la prueba (2,48,70).

En estudios comparativos con técnicas de hibridación de ADN y análisis de restricción de endonucleasas entre diferentes aislamientos de *M. paratuberculosis* procedentes de diferentes rumiantes y de humano así como de *Mycobacterium "wood pigeon"* se propone la existencia de dos grupos de *M. paratuberculosis*, el primero integrado por cepas procedentes de bovinos. El segundo grupo de *M. paratuberculosis* se conformó con aislamientos de ovinos y caprinos. Asimismo, comprobaron que *Mycobacterium "wood pigeon"* presentaba un patrón diferente del *M. paratuberculosis* y a través del análisis de restricción de endonucleasas mostraron un patrón similar al que presenta *M. avium* de tal manera que sugieren que esta

micobacteria debería ser clasificada dentro de *M. avium* (22).

En el primer grupo de *M. paratuberculosis* se incluye a la cepa Linda aislada de un paciente con enfermedad de Crohn, indicando la importancia de este tipo de micobacterias, sin embargo en estudios más recientes utilizando la secuencia de inserción IS901, demuestran la participación de *M. avium* en estos pacientes (60). Investigadores observaron mediante estudios de hibridación del DNA que las cepas de micobacterias dependientes de micobactina como las aisladas de paloma torcaz, *M. paratuberculosis* y en un aislamiento considerado como *M. avium* procedente de bovino, presentaban un patrón similar entre estas, entonces sugirieron que se tratarían de bacterias con una relación genética estrecha (127).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): siglas de Polymerasa Chain Reaction.

Mediante esta prueba es posible realizar la amplificación de una secuencia de varios cientos de pares de bases de oligonucleótidos. Uno de los principales inconvenientes de esta prueba es el riesgo de sufrir contaminaciones, sobre todo previamente a la realización de la amplificación de los productos (25,56,58).

Esta prueba emplea como cebador la secuencia de inserción IS900 que está conformada por 1451 pares de bases conteniendo

un 66% de Guanina y Citosina. Mediante esta prueba es posible detectar hasta 7 ng de ADN de *M. paratuberculosis*, de tal manera que al considerar que el tamaño del genoma es de 3.1×10^9 esta prueba podría presentar resultados positivos en muestras que contengan el equivalente a 10^5 ó 10^6 organismos por mililitro, por lo que se sugiere esta prueba como herramienta para la detección de animales eliminadores de micobacterias, incluso aquellos afectados subclínicamente en los programas de control de la paratuberculosis, presentando ventajas en la rapidez de su realización con respecto al cultivo bacteriológico (25,37,113,115). Otra de las ventajas que presenta esta técnica es su habilidad para distinguir *M. paratuberculosis* de *M. avium* (113). Otras investigaciones pudieron constatar que la PCR posee una especificidad del 100%, siendo además más rápida en la detección micobacteriana, comparativamente con el cultivo fecal (115).

7. Diagnóstico Histopatológico

Las lesiones histopatológicas características de esta enfermedad son:

Válvula ileocecal: Enteritis granulomatosa con múltiples áreas de necrosis.

Ileon distal: Enteritis granulomatosa con múltiples áreas de necrosis y calcificación.

Ileon proximal: Lesiones similares a las del Ileon distal.

Yeyuno: Enteritis granulomatosa con múltiples áreas de necrosis y calcificación.

Yeyuno (Placas de Peyer distales): Lesiones similares a las del anterior.

Yeyuno (Sin placas de Peyer): Enteritis granulomatosa focal.

Yeyuno (Placas de Peyer mediales): Enteritis granulomatosa con múltiples áreas de necrosis y calcificación.

Yeyuno (Sin placas de Peyer): Lesiones similares al anterior.

Yeyuno (Placas de Peyer proximales): Lesiones similares a las del anterior.

Ganglio linfático ileocecal: Linfadenitis granulomatosa difusa.

Ganglio linfático mesentérico caudal: Lesiones similares a las del ganglio linfático ileocecal.

Ganglio mesentérico medial: Lesiones similares a las del ganglio linfático ileocecal.

Ganglio mesentérico proximal: Lesiones similares a las del ganglio linfático ileocecal.

Ciego: Tiflitis granulomatosa multifocal.

Hígado: Hepatitis granulomatosa multifocal.

Bazo: Esplenitis granulomatosa multifocal. (14,75).

OBJETIVO. Lograr el aislamiento e identificación de *Mycobacterium paratuberculosis* mediante examen bacteriológico de heces en ganado de lidia con signos y sin signos clínicos de la enfermedad de Johne.

III. MATERIAL Y METODOS

Se obtuvieron 50 muestras de heces de ganado de lidia de las ganaderías de Haro, Coatzamalucan, El triángulo, La plaza del Estado de Tlaxcala, de las cuales 40 muestras fueron de animales con signos clínicos sugestivos de la enfermedad y 10 animales sin ningún signo. Las muestras se enviaron en refrigeración al laboratorio dentro de las 24 horas siguientes y se procesaron mediante la técnica de descontaminación con ácido oxálico al 5% como la describen Whipple, D., y Merkal, R. (118). Una vez realizada la descontaminación se sembró en medio de Herrold's con micobactina 2 por muestra y uno y medio sin micobactina y se incubó a 37 °C realizando observaciones semanales con el fin de detectar el desarrollo de colonias. De las muestras sin micobactina no se detectó crecimiento o se desarrollaron Mycobacterias saprófitas. Las colonias desarrolladas con micobactina se sometieron a la tinción de Ziehl-Neelsen con el fin de detectar la presencia de bacterias ácido alcohol resistentes. Las colonias que resultaron positivas se resembraron y fueron sometidas a las pruebas de identificación descritas por Vestal y Tsukamura (110,116), además se determinó la morfología y agrupación características de *M. paratuberculosis*. Colonias pequeñas, incoloras, translúcidas, hemisféricas con bordes redondeados, uniformes y de superficies lisas y brillantes (5,11,14,38,80). Microscópicamente se ven bacilos ácido alcohol resistentes en forma de bastoncillos cortos y gruesos que en heces se encuentran generalmente en masas (11,14,38,80).

IV. RESULTADOS

Los tubos inoculados se revisaron periódicamente y después de 8 semanas de incubación se llevó a cabo la identificación del *Mycobacterium paratuberculosis* como se describió en material y métodos.

De las 40 muestras que se trabajaron de animales con signos se aisló en un 35% *M. paratuberculosis* (14 muestras) y de las restantes 10 sin signos de la enfermedad un 10% (1 muestra).

Los resultados se presentan en el cuadro I de una manera secuencial, separando los de animales con signos y de los que no presentan signos.

CUADRO I

MUESTRAS POSITIVAS DE LOS ANIMALES CON SIGNOS DE LA ENFERMEDAD.

Número de muestra	Fecha de siembra	Fecha de crecimiento	Ziehl-Neelsen
1	08-08-86	03-10-86	Positivo
2	21-08-86	06-10-86	Positivo
6	08-10-86	03-12-86	Positivo
7	20-10-86	07-12-86	Positivo
9	20-10-86	06-12-86	Positivo
17	19-03-87	28-06-87	Positivo
23	29-05-87	20-08-87	Positivo
24	06-05-87	21-08-87	Positivo
26	06-05-87	21-08-87	Positivo
27	19-03-87	27-06-87	Positivo
28	06-05-87	23-08-87	Positivo
29	29-05-87	27-08-87	Positivo
41	03-05-87	28-08-87	Positivo
45	28-05-87	28-08-87	Positivo
50	18-05-87	21-08-87	Positivo

MUESTRAS POSITIVAS DE LOS ANIMALES SIN SIGNOS DE LA ENFERMEDAD

7	08-12-86	27-02-87	Positivo
---	----------	----------	----------

V. D I S C U S I O N

La paratuberculosis en el ganado de lidia ha producido serias pérdidas económicas en las ganaderías, dado que ésta enfermedad se ha descrito con anterioridad y no se le ha otorgado la debida importancia (5,79).

Tomando en cuenta el estudio realizado y los resultados que arroja, se detecta una alta frecuencia de la enfermedad en las instalaciones investigadas.

El problema aparentemente no es exclusivo del Estado de Tlaxcala sino de todo Estado con ganadería de toros de lidia, ya que se ha observado la aparición de casos esporádicos en Michoacán, Querétaro, Estado de México y Tamaulipas, lo mismo parece ocurrir en ganado lechero y de pastoreo (5,6,7,20,79).

Cabe hacer notar que la frecuencia con que se observan casos clínicos de paratuberculosis en el ganado de lidia, así como la edad de los animales afectados y la falta de respuesta de estos a tratamientos hace pensar que la frecuencia de paratuberculosis en el estado de Tlaxcala es muy difundida. Mas aún, al tomar en cuenta la alta población de ganado bravo en el estado y el sistema de manejo del mismo como son: el suministro de forraje en el piso, falta de aislamiento de animales enfermos y su retención en las ganaderías

por tiempos prolongados aumentando así la contaminación de los potreros y el mezclado de estos animales enfermos con animales sanos, lo cual induce al incremento de la frecuencia de casos de paratuberculosis en este estado (7).

Por lo anterior, existe paratuberculosis en el ganado de lidia de Tlaxcala y es necesario realizar un estudio epidemiológico mediante técnicas adaptadas a la explotación de este tipo de ganado, en el estado arriba mencionado para evitar posibles pérdidas económicas (5,7,20,79).

VI. CONCLUSIONES

Se obtuvo alta frecuencia de paratuberculosis en los lugares muestreados.

El presente trabajo contribuye a determinar la frecuencia de paratuberculosis en el ganado de lidia en los lugares de estudio en el Estado de Tlaxcala y pretende mostrar la necesidad de implementar programas de manejo, salud animal y medicina preventiva destinados a: disminuir la frecuencia de la enfermedad, reducir la posibilidad de nuevas infecciones, identificar animales en etapa subclínica controlando así la diseminación de la enfermedad.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Abbas, B., Riemann, H. and Lonnerdal, B.: Isolation of specific peptides from *M. paratuberculosis* protoplasm and their use in an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of paratuberculosis (Johne's disease) in cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 44:2229-2236 (1983).
2. Ambrosio, R., Harris, Y. and Huchzermeyer, H.: A DNA probe for the detection of *M. paratuberculosis*, *Vet. Microbiol.*, 26:87-93 (1991).
3. Andersen, P., Seymour, C., Wood, P., Sockett, D. and Collins, M.: Application of multiple diagnostic test to the diagnosis and profiling of *M. paratuberculosis* infected herds. *Proc. Third International Colloquium on paratuberculosis, Orlando, Fl., U.S.A. (1991)*.
4. Angus, K.: Intestinal lesions resembling paratuberculosis in a wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), *J. Comp. Path.*, 103:101-105 (1990).

5. Arriola, J., Barajas, J. A., Ruiz, R., Yáñez, R. A. y Gómez, R. A.: Diagnóstico clínico de paratuberculosis (Enfermedad de Johne) en ganado de lidia y aislamiento e identificación del *Mycobacterium paratuberculosis*. Memorias XIII Congreso Nacional de Buiatría. México, D. F. 1987.
6. Barajas, J. A.: Paratuberculosis in Mexico, Memorias del Siumposium Internacional de Tuberculosis y Paratuberculosis, Ciudad de México, 1988.
7. Barajas, J. A., Bermúdez, R. M., Riemann, H., Monge, F., Gutiérrez, J., Gómez, R. A. y Arriola, J. Seroepidemiología de la paratuberculosis en ganado de lidia en el Estado de Tlaxcala. Memorias XIII Congreso Nacional de Buiatría. México, D. F. 1987.
8. Bech-Nielsen, S., Shulaw, P., Frandsen, P., Jorgensen, J., Field, N. and Ahrens, P.: Comparison of subjective and objective test evaluations for use of *M. phlei*-adsorbed serum in a dot-enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of paratuberculosis in cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 53:1386-1391 (1992).
9. Belletti, G. L.: Paratuberculosis Bovina - "Mal del Canale", *Praxis Vet.*, 2:5-7 (1987).

10. Berrada, J.: Control and prevention of paratuberculosis, Memorias del Simposium Internacional de Tuberculosis y Paratuberculosis, Ciudad de México, 1988.
11. Blobel, H. and Schlieben, T.: In line Handbuch der Bakteriellen Infektionen bei Tieren, Band V, Gustow Fischer Verlag, Stn Hganh, 1985.
12. Blood, D. C. and Henderson, J. A: Veterinary Medicine. Fifth ed. Lea Febiger, Philadelphia, 1979.
13. Bustamante, X.: Detección de anticuerpos a *Mycobacterium paratuberculosis* por medio de la prueba de fijación de complemento. Tesis de Licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 1974.
14. Chávez, G.: Estudio comparativo de las lesiones y de la respuesta inmunológica observada en corderos infectados experimentalmente con *Mycobacterium paratuberculosis* y de *Mycobacterium avium* sp. *silvaticum*, Tesis de Doctorado, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, 1993.

15. Chávez, G., García, J. F., Adúriz, G., Moreno, B., Gutiérrez, M., Juste, R. y Badiola, J. J.: Comparación de las respuestas inmunes Humoral y Celular en ovinos inoculados experimentalmente con *M. avium sylvaticum* y *M. paratuberculosis*, ITEA, 13:504-506 (1993).
16. Chiodini, R. J.: Age resistance and the reticular groove reflex: link or coincidence, *The paratuberculosis Newsletter*, 5:29-30 (1993).
17. Chiodini, R. J., Van Kruiningen, H. J. y Merkal, R. S.: Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects, *Cornell Vet.*, 74:18-262 (1984).
18. Chiodini, R. J., Van Kruiningen, H. J., Merkal, R. S., Tahyer, W. and Cout, J.: Characteristics of an unclassified *Mycobacterium* species isolated from patients with Crohn's disease, *J. Clin. Microbiol.*, 20:966-971 (1984).
19. Chiodini, R. J., Van Kruiningen, H. J., Merkal, R. S., Tahyer, W. and Cout, J.: Possible role of *Mycobacteria* in inflammatory bowel disease. I. An unclassified *Mycobacterium* species isolated from patients with Crohn's disease, *Dig. Dis. Sci.*, 29:1073-1079 (1984).

20. Colin, R. F., Yáñez, R. A., Trigo, F. J. y Arriola, J.: Paratuberculosis en ganado de lidia: Estudio clínico-patológico. Memorias XIII Congreso Nacional de Buiatría. México, D. F. 1987.
21. Colgrove, G., Thoen, C., Blackburn, B. y Murphy, C.: Paratuberculosis in cattle: A comparison of three serologic tests with results of fecal culture, *Vet. Microbiol.*, 19:183-187 (1989).
22. Collins, D., Gabric, D. and de Liesly, G.: Identification of two groups of *M. paratuberculosis* strain by restriction endonuclease analysis and DNA hibridization, *J. Clin. Microbiol.*, 28:1591-1596 (1990).
23. Collins, M., Sockett, D., Ridge, S. and Cox, J.: Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for Johne's disease, *J. Clin. Microbiol.*, 29:272-276 (1992).
24. Collins, P. Davies, D. and Matthews, P.: Mycobacterial infection in goats diagnosis and pathogenicity of the organism, *Br. vet. J.*, 140:196-201 ((1984).

25. Coote, J.: Amplification of nucleic acids by the polymerase chain reaction, *Westminster Column*, August:57-59 (1990).
26. Cox, J., Drane, D., Jones, S. and Milner, A.: Development and evaluation of a rapid absorbed enzyme immunoassay test for the diagnosis of Johne's disease in cattle, *Aus. Vet. J.*, 68:157-160 (1991).
27. Davies, B.: *Microbiology*. Third ed. Harper Row Publishers, New York, 1980.
28. Emery, D., Rothel, J. and Wood, P.: Influence of antigens and adjuvants on the production of gamma-interferon and antibody by ovine lymphocytes, *Immunol. Cell Biol.*, 68:127-136 (1990).
29. Gallati, H., Pracht, I., Schmidt, J., Häring, P. y Garotta, G.: A simple, rapid and large capacity for biologically active native and recombinant human IFN-gamma, *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agent*, 3:109-118 (1987).
30. García Marín, J. F., Benazzi, S., Pérez, V. y Badiola, J.: Study of the entrance of *M. paratuberculosis* in the lambs intestinal mucosa using immunohistochemical methods for antigen detection, *Proc. Third International Colloquium on Paratuberculosis*, Orlando, Fl., U.S.A., pp. 370-376 (1991).

31. García Marín, J. F., Chávez, G., Pérez, V., Adúriz, J., Juste, R. y Badiola, J.: Estudio de las lesiones intestinales en caprinos procedentes de rebaños afectados de paratuberculosis y comparación de métodos diagnósticos, ITEA, Vol. Extra II:650-652 (1991).
32. Garibay, V. M.: Prueba doble comparativa intradérmica a la tuberculina aviaria y mamífera para identificación de reactores a *Mycobacterium paratuberculosis* en un hato de bovinos. Tesis de Licenciatura. Fac. Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 1974.
33. Gibbons. J.: Diagnóstico clínico de las enfermedades del ganado. Primera ed. Interamericana, S. A. México, D. F. 1967.
34. Gilmour, N. and Nyange, J.: Paratuberculosis (Johne's disease) in deer, Practice, September:193-196 (1989).
35. Goodfellow, M. and Wayne, L. G.: Taxonomy and nomenclature, The Biology of the Mycobacteria, Vol. 1, Physiology, identification and classification,, Ed. Ratledge, C. and Standford, J. Academic Press, London, pp. 471-521, 1982.

36. Goudswaard, J., Gilmour, N., Dijkstra, R. and Van Beek, J.:
Diagnosis of Johne's disease in cattle: a comparison of five
serological tests under field conditions. *Vet. Rec.*, 98:461-462
(1976).
37. Green, E., Tizard, M., Thompson, M., Winterbourne, D., McFadden,
J. and Hermon-Taylor: Sequence and characteristics of the IS900,
an insertion element identified in a human Crohn's disease,
Nucleic Acids Research., 17:9063-9073 (1989).
38. Gillespie, J. H. and Timoney, J. F.: Hagan y Bruner:
Enfermedades Infecciosas de los Animales Domésticos. Cuarta
ed. de la 7a. ed. en inglés. La Prensa Médica Mexicana, S. A.
México, D. F. 1983.
39. Gunnarsson, E.: Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from
sheep and cattle in Iceland, *Acta vet. scand.*, 20:191-199
(1979).
40. Hance, J., Grandchamp, B., Lévy-Frébault, V., Lecossier, D.,
Rauzier, J., Bocart, D. and Gicquel, B.: Detection and
identification of mycobacteria by amplification of micobacterial
DNA, *Molecular Microbiol.*, 3:843-849 (1989).

41. Hans, P. R.: Diagnosis of Johne's Disease. (Paratuberculosis) in Northern California cattle and note on it's economic significance. School of Veterinary Medicine. University of California. Davis, California. 10:20-24 (1983).
42. Happ, M., Kubo, R. and Palmer, E.: Limited receptor repertoire in a mycobacteria-reactive subset of yg T lymphocytes, *Nature*, 342:696-698 (1989).
43. Haregowin, H., Soman, G., Hom, R. and Finberg, R.: Human yg + T cells respond to mycobacterial heat-shock protein, *Nature*, 340:309-312 (1989).
44. Hietala, S.: The opinions in diagnosis ruminant paratuberculosis, *Veterinary Medicine*, Nov: 1122-1132 (1992).
45. Hillermark, K.: A disease resembling paratuberculosis (Johne's disease) in Roe Deer (*Capreolus capreolus* L.). an aetiological and pathoanatomical study, *Acta Vet. Scand.*, 7:330-360 (1966).
46. Hines, S., Buergelet, C., Wilson, J. and Bliss, E.: Disseminated *Mycobacterium paratuberculosis* infection in a cow, *J. A. V. M. A.*, 15:681-683 (1987).

47. Hintz, A.: Comparative lymphocyte stimulation studies on whole blood from vaccinated and nonvaccinated cattle with Paratuberculosis, *Am. J. Vet. Res.*, 42:507-510 (1981).
48. Hurley, S., Splitter, G. and Welch, R.: Development of a diagnostic test for Johne's disease using a DNA hibridization probe, *J. Clin. Microbiol.*, 27:1582-1587 (1989).
49. Iwasaki, A., Yoshikai, Y., Yuuki, H., Takimoto, H. and Nomoto, K.: Self reactive T cells are activated by the 65-kDa mycobacterial heat-shock protein in neonatally thymectomized mice, *Eur. J. Immunol.*, 21:597-603 (1991).
50. Jensen, R.: Disease of Feedlot Cattle. Third ed. Lea Febiger, Philadelphia, 1979.
51. Johnson, D. W., Muscoplat, Ch. C., Larsen, A. B. and Thoen, Ch. O.: Skin testing, fecal culture and lymphocyte immunostimulation in cattle inoculated with *Mycobacterium paratuberculosis*, *Am. J. Vet. Res.*, 38(12):2023-2025 (1977).
52. Jones, R. L., and Brennan, P. J.: Application of modern biotechnology to the diagnosis of paratuberculosis,

53. Juste, R.: Estudio experimental de las fases iniciales de la Paratuberculosis ovina, Tesis Doctoral, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, (1990).
54. Juste, R., Marco, J., Sáez de Ocariz, C. and Adúriz, J.: Comparision of different media for the isolation of small ruminant strains of *M. paratuberculosis*, *Vet. Microbiol.*, 28:385-390 (1991).
55. Körmendi, B., Szilágyi, M., Tuboly, S. and Nagy, G.: Some diagnostic features of the pathogenesis of bovine paratuberculosis (Johne's disease) and serum biochemical changes after oral reinfection, *J. Vet. Med.*, 37:229-235 (1990).
56. Kunze, Z., Wall, S., Appelberg, L., Silva, M., Portaels, F. and McFadden, J.: IS901, a new member of a widespread class of atypical insertion sequences, is associated with pathogenicity in *M. avium*, *Mol. Microbiol.*, 5:2265-2272 (1991).
57. Lieberman, I., Sartou, P., Cazenave, P. and Rueff-Juy, D.: Expression and biological activity of interleukin-1 receptors in mouse yg thymocytes during ontogeny, *Eur. J. Immunol.*, 22:2849-2854 (1992).

58. Longo, M., Berninger, M. and Hartley, J.: Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reaction, *Gene*, 93:125-128 (1990).
59. Massone, A., Martín, A., Ibarгойen, G. and Gimeno, E.: Immunohistochemical methods for the visualization of *M. paratuberculosis* in bovine tissues, *J. Vet. Med. B.*, 37:251-253 (1990).
60. McFadden, J., Collins, J., Beaman, B., Arthur, M. and Gitnick, G.: Mycobacteria in Crohn's Disease: DNA probes identify the wood pigeon strain of *M. avium* and *M. paratuberculosis* from human tissue, *J. Clin. Microbiol.*, 30:3070-3373 (1992).
61. Merkal, R. S.: Diagnostic methods for detection of paratuberculosis (Johne's Disease). Proc. 74th Annual Meet. U.S. Animal Health Association, 620-623 (1970).
62. Merkal, R. S.: Laboratory diagnosis of bovine paratuberculosis. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 163:1100-1102 (1973).
63. Merkal, R. S.: Paratuberculosis. Proc. 86th Annual Meet. U.S. Animal Health Association, pp. 519-522 (1982).

64. Merkal, R. S.: Paratuberculosis: advances in cultural, serologic and vaccination methods, *J. A. V. M. A.*, 184:939-943 (1984).
65. Merkal, R. S., Larsen, A., Kopecky, K. and Ness, R.: Comparison of examination and test methods for early detection of paratuberculosis in cattle, *Am. J. Vet. Res.*, 29:1532-1539. (1968).
66. Merkal, R. S. Larsen, A. B., Velićer, L. F. and Thurston, J. R.: Serologic and allergenic effects of 3 *Mycobacterium paratuberculosis* antigens, *Am. J. Vet. Res.* 26:1267-1270. (1965).
67. Merkal, R. S. and Whiple, D. L.: Effectiveness of disinfectants of *Mycobacterium paratuberculosis*, *Proc. 86th Annual Meet. U.S. Animal Health Association*, pp. 514-518 (1982).
68. Milner, A., Mack W. and Coates, K.: A modified ELISA for the detection of goats infected with *M. paratuberculosis*, *Aus. Vet. J.*, 66:305-307 (1989).
69. Molina, A., Morera, L. and Llanes, D.: Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *M. paratuberculosis*, *Am. J. Vet. Res.*, 52:863-868 (1991).

70. Murray, A. and Moriarty, K.: A diagnostic opportunity: DNA probes, *N. Z. Vet. J.*, 37:45-47 (1989).
71. Nakamatsu, M. and Fujimoto, Y.: The pathological study of paratuberculosis in goats centered around the formation of remote lesions, *Jpn. J. Vet. Res.*, 16:103-135 (1968).
72. Nguyen, H. and Buergelt, C.: Indirect immunoperoxidase test for the diagnosis of paratuberculosis, *Am. J. Vet. Res.*, 44:2173-2174 (1983).
73. Nisbet, D., Gilmour, N. and Brotherston, J.: Quantitative studies of *M. johnei* in tissues of sheep. III. Intestinal histopathology, *J. Comp. Path.*, 72:80-91 (1962).
74. Paliwal, O., Rajya, B. and Krishna, S.: Comparative evaluation of diagnostics tests for paratuberculosis in goats, *Indian J. Anim. Sci.*, 54:657-659 (1984).
75. Pemberton, D. H.: Diagnosis of Johne's Disease in Cattle using mesenteric lymph node biopsy: Accuracy in clinical suspects. *Australian Veterinary Journal*, 55:217-219 (1979).

76. Peris, B.: Contribución al conocimiento de los aspectos inmunológicos de la Paratuberculosis ovina mediante el estudio de la respuesta humoral y celular local, Tesis Doctoral, Universidad de Zaragoza (1992).
77. Power, S., Haagsma, J. and Smyth, D.: Paratuberculosis in farmed red deer (*Cervus elaphus*) in Ireland, *Vet. Rec.*, 27:213-219 (1993).
78. Prince, M.: Paratuberculosis in dairy cattle, *Vet. Rec.*, 17:383 (1987).
79. Ramírez, C., González, R. A. y Palafox, I.: Paratuberculosis en un rancho de ganado de lidia. *Vet. Mex.*, 16:109-112 (1985).
80. Ramírez, C., Trigo, E., Suárez, F. y Merkal, R. S.: Aislamiento e identificación de *Mycobacterium paratuberculosis* en México, *Téc. Pec. Méx.*, 36:74-76 (1979).
81. Ramírez, P.: Serological survey of sheep and goats in Mexico for paratuberculosis. *Asociación Latinoamericana de Microbiología*. 25:56 (1983).

82. Rathnamohan, T., Norris, M., Mitchel, G. and Spencer, T.: A reappraisal of the complement fixation using soluble *M. avium* antigen for the detection of *M. paratuberculosis* infection in cattle, *Aus. Vet. J.*, 63:133-134 (1986).
83. Ridge, S., Morgan, I., Sockett, D., Collins, M., Condron, R., Skilbeck, N. and Webber, J.: Comparison of the Johnes absorbed EIA and the complement fixation test for the diagnosis of Johnes's disease in cattle, *Aus. Vet. J.*, 68:253-257 (1991).
84. Ringdal, G.: Johnes's disease in pigs, *Nord Vet. Med.*, 15:217-238 (1963).
85. Ritacco, V., López, B., Becerra, L. and Errico, F.: Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis, *Res. Vet. Sci.*, 50:365-367 (1991).
86. Rhode, R., Shulaw, W., Hueston, W., Bech-Nielsen, S., Haibel, G. and Hoffis, G.: Isolation of *M. paratuberculosis* from washed bovine ova after in vitro exposure, *Am. J. Vet. Res.*, 5:708-710 (1990).

87. Rothel, J., Jones, S., Corner, Cox, J and Wood, P.: A sandwich enzyme immunoassay for bovine gamma-interferon and its use for the detection of tuberculosis in cattle, *Aus. Vet. J.*, 67:134-137 (1990).
88. Rothel, J., Jones, S., Corner, Cox, J and Wood, P.: The gamma-interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis in cattle conditions affecting the production of gamma-interferon in whole blood culture, *Aus. Vet. J.*, 69:1-4 (1992).
89. Saxegaard, F.: Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from intestinal mucosa and mesenteric lymph nodes of goats by use selective Dubos Medium. *J. Clin. Microbiol.*, 22:312-313 (1985).
90. Saxegaard, F. and Baess, I.: Relationship between *M. avium*, *M. paratuberculosis* and "wood pigeon mycobacteria", determined by means of DNA-DNA hybridization, *A. P. M. I. S.*, 96:37-42 (1988).
91. Saxegaard, F., Baess, I. and Jantzen, E.: Characterization of clinical isolates of *M. paratuberculosis* by DNA-DNA hybridization and cellular fatty acid analysis, *A. P. M. I. S.*, 96:497-502 (1988).

92. Seitz, S. E., Heider, L. E., Hueston, W. D., Bech-Nielsen, S., Rings, D. M. and Spangler, L.: Bovine fetal infection with *Mycobacterium paratuberculosis*, J. A. V. M. A., 194: 1423-1426 (1989).
93. Selwyn, P. and Hathaway, S.: A study of the prevalence and economic significance of diseases and defects of slaughtered farmed deer, N. Z. Vet. J., 38:94-97 (1990).
94. Shermann, D., Bray, B., Gay, J. and Bates, F.: Evaluation of the agar gel immunodiffusion test for diagnosis of subclinical paratuberculosis in cattle, Am. J. Vet. Res., 50:526-530 (1989).
95. Shermann, D., Gay, J., Buoley, D. and Nelson, G.: Comparison of the complement-fixation and agar gel immunodiffusion test for diagnosis of subclinical bovine paratuberculosis, Am. J. Vet. Res., 51:461-465 (1990).
96. Shermann, D. and Gezon, H.: Comparison of agar gel immunodiffusion and fecal culture for identification of goats with paratuberculosis, J.A.V.M.A., 177:1208-1211 (1980).
97. Shulaw, W., Bech-Nielsen, M., Rings, D., Getzy, D. and Woodruff, T.: Serodiagnosis of the paratuberculosis in sheep by use of agar gel immunodiffusion, Am. J. Vet. Res., 54:13-19 (1993).

98. Sockett, D., Carr, D. and Collins, M.: Evaluation of conventional and radiometric fecal culture and a comercial DNA probe for the diagnosis of *M. paratuberculosis*, *Can. J. Vet. Res.*, 56:148-153 (1992).
99. Sockett, D., Conrad, T., Chester, T and Collins, M.: Evaluation of four serological tests for bovine paratuberculosis, *J. Clin. Microbiol.*, 30:1134-1139 (1992).
100. Spangler, E., Heider, L., Bech-Nielsen, S. and Dorn, R.: Serological enzyme-linked immunosorbent assay responses of calves vaccinated with a killed *M. paratuberculosis* vaccine, *Am. J. Vet. Res.*, 52:1197-1200 (1991).
101. Stumpff, Ch. D.: Practiced application of procedures to control pratuberculosis en cattle, *Memorias del Siumposium Internacional de Tuberculosis y Paratuberculosis*, Ciudad de México, 1988.
102. Sugden, E., Corner, A., Sammagh, B., Brooks, B., Turcotte, C., Nielsen, K., Stewart, R. and Duncan J.: Serodiagnosis of ovine paratuberculosis, using lipoarabinomannan in enzyme-linked immunosorbent assay, *Am. J. Vet. Res.*, 50:850-854 (1989).
103. Summers, B.: Laboratory diagnosis of Johne's disease: A potencial source of error. *Vet. Record.*, 108:166-167 (1981).

104. Thoen, Ch. O.: Johne's disease (Paratuberculosis): New Research Developments, Memorias del Siumposium Internacional de Tuberculosis y Paratuberculosis, Ciudad de México, 1988.
105. Thoen, Ch. O.: Paratuberculosis in animals in the americas - An Overview, Memorias del Siumposium Internacional de Tuberculosis y Paratuberculosis, Ciudad de México, 1988.
106. Thoen, Ch. O. and Moore, L.: Control of Johne's disease in four comercial dairy herds in Iowa, J. Vet. Diagn. Invest., 1:223-226 (1989).
107. Thorel, M.: Review of the ocurrence of mycobactin dependence among Mycobacteria species, Ann. Rech. Vet., 15:405-409 (1984).
108. Trigo, F. J.: Diagnóstico de la paratuberculosis. (Enfermedad de Johne). Vet. Mex., 10:239-245 (1979).
109. Tsai, S., Hutchinson, L. and Zarkowe, A.: Comparision of Dot immunobinding assay, enzyme-linked immunosorbent assay and immunodiffusion for serodiagnosis of Paratuberculosis, Can. J. Vet. Res., 53:405-410 (1989).
110. Tsukamura, M.: Identification of Mycobacteria. Research Laboratory of the National Sanatorium Chubuchest Hosp. Japan. (1975).

111. Unzueta, R. J.: Contribución al estudio de la Enteritis Paratuberculosa en México. Tesis de Licenciatura. Fac. de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F. (1936).
111. Van Boxter, R., Lambreth, R. and Collins, M.: Effect of polyoxyethylene sorbate compounds (Tweens) on colonial morphology, growth, and ultrastructure of *M. paratuberculosis*, A.P.M.I.S., 98:901-908 (1990).
112. Van der Giessen, J., Haring, R., Vauclare, E., Eger, A., Haagsma, J. and Zeijst, A.: Evaluation of the abilities of three diagnostic tests based on the polymerase chain reaction to detect *M. paratuberculosis* in cattle: application in a control program, *J. Clin. Microbiol.*, 30:1216-1219 (1992).
113. Van Kruiningen, H., Chiodini, R., Thayder, W., Coutu, J., Merkal, R. and Runnels, P.: Experimental disease in infants goats induced by a *Mycobacterium* isolated from a patient with Crohn's disease. A preliminary report, *Dig. Dis. Sci.*, 31:1351-1360 (1986).
114. Vary, P., Andersen, P., Green, E., Hermon-Taylor, J. and McFadden, J.: Use of a highly specific DNA probes and the polymerase chain reaction to detect *M. paratuberculosis* in Johne's Disease, *J. Clin. Microbiol.*, 28:933-937 (1990).

115. Vestal, R. A.: Procedures for isolation and identification of mycobacteria. Center for Disease Control. Atlanta, Georgia. (1981).
116. Vihan, V., Singh, N. and Singh, S.: Preliminary observations on fecal culture test for the detection of *M. paratuberculosis* in goats, *Indian J. anim. Sci.*, 59:1522-1524 (1989).
117. Whipple, D., Merkal, R. S: Modifications in the techniques for cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis*. Proc. 86th Annual Meet. U. S. Animal Health Association, pp. 519-522 (1982).
118. Wilks, C., Taylor, T. and Russell, E.: Isolation of mycobacteria inducing cross-reactions in the complement fixation test for Johne's disease, *Res. V. Sci.*, 30:323-327 (1981).
119. Williams, E. S., De Martini, J. C. y Snyder, S. P.: Lymphocyte blastogenesis, complement fixation and fecal culture as diagnostic test for paratuberculosis in North American wild ruminants and domestic sheep. *Am. J. Vet. Res.*, 46(11):2317-2321 (1985).
120. Winegar, G. O.: Import/export requirements for paratuberculosis United States of America, *Memorias del Siumposium Internacional de Tuberculosis y Paratuberculosis*, Ciudad de México, 1988.

121. Wood, P., Corner, L. and Plackett, P.: Development of a simple, rapid in vitro cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of gamma interferon, Res. V. Sci., 49:46-49 (1990).
122. Wood, P., Corner, L., Rothel, J., Baldock, C., Jones, S., Cousins, D., McCormick, B., Francis, B., Creeper, J. and Tweddle, N.: Field comparison of the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis, Aus. Vet. J., 68:286-290 (1991).
123. Woodruff, T., Shulaw, W., Bech-Nielsen, S., Hoffsis, G., Spangler, E. and Heider, L.: Serodiagnosis of bovine paratuberculosis by use of a dot enzyme-linked immunosorbent assay, Am. J. Vet. Res., 52:217-221 (1991).
124. Woolcock, B.: Bacterial infection and immunity in domestic animals. Elsevier Scientific Publishing Company. Amsterdam. (1979).
125. Yokomizo, Y., Merkal, R. S. and Lyle, S.: Enzyme - linked immunosorbent assay for detection of bovine immunoglobulin G1 antibody to a protoplasmatic antigen of M. paratuberculosis, Am. J. Vet. Res., 44:2205-2207 (1983).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

126. Yokomizo, Y., Yugi, H. and Merkal, R.: A method for avoiding false-positive reactions in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculosis, *Jpn. J. Vet. Sci.*, 47:111-119 (1983).
127. Yoshimura, H. and Graham, D.: Nucleic acid hybridization studies of mycobactin-dependent mycobacteria, *J. Clin. Microbiol.*, 26:1309-1312 (1988).