

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA

HALLAZGOS ANATOMOPATOLÓGICOS Y BACTERIOLÓGICOS EN
MORTALIDAD DE BOVINOS ASOCIADOS A PARATUBERCULOSIS EN EL
COMPLEJO AGROPECUARIO INDUSTRIAL DE TIZAYUCA, HIDALGO.

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

Medico Veterinario Zootecnista

PRESENTA

Uziel Castillo Velázquez.

Asesores:

MVZ. Dr. Gilberto Chávez Gris.
MVZ. Rafael Soto Castor.

México D. F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

Para mis padres.

A Dios:

Por darme la fuerza, la voluntad y el coraje, para concluir este trabajo

A mi padre:

Por todos los buenos ejemplos, consejos y gestos que nunca se cansa de dar, por confiar siempre en mi, tener el gesto exacto y la palabra correcta para darme fuerza y voluntad, ayudarme a lograr cada una de las metas que me he fijado, gracias por que siempre estuviste ahí y no dejarme despegar los pies de la tierra, gracias mi viejo, erés lo mejor de mi.

A mi madre:

Gracias, por ayudarme a ser una mejor persona, enseñarme las herramientas y valores necesarios para lograr mis metas, gracias por su mirada, sus abrazos y su apoyo en los momentos difíciles, por todas las atenciones y esperanzas depositadas en mi, gracias por ayudarme a conocerme y darme la fuerza que en momentos me hizo falta para llegar hasta este punto.

A mi hermano Uriel:

Gracias por estar conmigo a cada paso que he dado, permitirme caer y exigir levantarme, gracias por permitirme ser tu amigo y hacerme sentir como uno, nunca podre agradecerte todo lo que has hecho por mi, ayudarme a ser una mejor persona, gracias por permitirme conocerte y aun sabiendo lo peor de mi, me trataste como lo mejor de ti. Gracias Uriel.

A mi hermana Adriana:

*Gracias por confiar en mi y hacerme sentir que yo puedo lograr lo que me proponga, gracias por la alegría que siempre le inyectas a la casa haciendo mas alegre la convivencia entre todos. Gracias por darme a los mejores sobrinos que uno podria querer Gracias Adi, **Estebitan y Manelicky**.*

A mis sobrinos:

Gahel:

Gracias por esa mirada llena alegría,, gracias por esa sonrisita tierna y sincera llena de cariño, que cada dia al llegar a casa, me hace sentir que la vida puede ser mejor si tienes esos gestos cada dia.

Memito:

Por sus besitos llenos cariño y sus juegos con los cuales lo hacen a uno sentirse imprescindible y con ganas de ser mejor cada dia.

Agradecimientos:

A la Universidad Nacional Autonoma de Mexico.

A la Faculta de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

A mi jurado.

Al Dr. Gilberto Chavez Girs, gracias por su amistad, su paciencia, y sobre todo su confianza por creer en mi y no dejarme fallar, gracias Dr, mas que un asesor, siempre fue un amigo, que me demostro que el verdadero compromiso es con uno mismo gracias.

Al departamento de Patología, sobre todo a Don Luis Antonio, por su colaboracion en el estudio histológico, a Jaime Eugenio por sus excelentes fotografías y digitalizaciones en el trabajo.

Al departameno de bovinos, al Dr Pedro Cano Celada, por darme la oportunidad de conocer el CAIT.

Al departamento de Microbiología: gracias por ayudarme con mis cultivos y los PCR, sobre todo al Dr Rigo, amigo y ejemplo, gracias por la amistad y los buenos consejos.

A los Doctores de Mtz de la Torre. Al Dr. Cristino, Dr, Miguel, Dr. Braulio Valles, al Dr. Marín, a todos y cada uno de los profesores que siempre estan dispuestos a compartir su experiencia de forma esplendida, gracias por demostrarme lo maravilloso de esta profesión.

Al CAIT, por todas las facilidades para permitir la elaboracion de este trabajo, sobre todo al MVZ. Rafael Soto Castor, al MVZ. Mario Santracruz Aguilar y al Doctor Jose Antonio Vazquez, por compartir su experiencia y su ayuda incondicional.

A Gume por la disposición que siempre tuvo conmigo y por las palmadas de hombro que siempre me obsequio. Si mi Gume, así es.

A Lucy: gracias siempre estare agradecido contigo, de ser una gran amiga te volviste un ejemplo a seguir, gracias por no permitirme renunciar y alentarme a dar el siguiente paso.

A Nadia que fue mi primer amiga en la facultad, y supo y supé que no habia problema yo era el Liendres y ella la Piojos.

A mis amigos: Asunción, Miriam Soraya, Ivan, Karis, Monica Guzman, Mario, Gustavo o como mejor lo conocemos al frijol, al Negro, Sarita, Alvaro, Sagastume, David, al Niño, a Boyzo, al Alex, Abigail, al Oso, Charles, a Luca, a Rojo, Emilio, Ebers, Janet la marinera y al pinche Güero mi mejor amigo y valedor de carrera, gracias Ernesto por permitirme saber que tu eres Ernesto y yo Uziel y que lo demas no hay pedo.

Gracias al Shocker y al Colibri de Cocoyoc, gracias por permitirme compartir con ustedes las mejores vacaciones de mi vida y mostrarme el verdadero valor de la amistad.

Gracias: Jessica, Arai, Junior y Aglae, por demostrarme que lo mejor de la amistad no tiene fechas o duraciones, solamente se necesitan la verdaderas intenciones para echarla a andar.

Gracias a todos los amigos que por alguna razon, mi mala memoria omite, todos son importantes para mi, gracias a todos por esos gestos de apoyo y por que cada vez que los veia en el pasillo me alentaban a echarle los kilos, gracias Banda.

Al programa PAPIIT por su ayuda y compromiso para llevar a cabo este trabajo, que de otra manera se hubiese vuelto imposible. al proyecto IN-208203

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1. Antecedentes históricos.....	2
1.2. Impacto económico de la enfermedad.....	3
1.3. Etiología.....	4
1.3.1. Taxonomía.....	5
1.4. Patogenia de la enfermedad.....	5
1.4.1. Signos clínicos de la enfermedad.....	6
1.4.2. Lesiones asociadas a paratuberculosis.....	7
1.5. Respuesta inmune.....	9
1.6. Diagnóstico.....	9
1.6.1. Diagnóstico anatomopatológico.....	10
1.6.2. Diagnóstico bacteriológico.....	10
1.6.3. Reacción en cadena de la polimerasa.....	11
1.7. Situación de la enfermedad en México.....	12
1.8. Justificación.....	13
2. HIPÓTESIS.....	15
3. OBJETIVOS.....	15
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	16
4.1. Grupo de animales.....	16
4.2. Estudio histopatológico.....	16
4.3. Cultivo.....	17
4.3.1. Procesamiento de las muestras.....	17
4.4. PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).....	17
4.4.1. PCR <i>IS</i> 900.....	18
4.4.2. PCR Tipo Específico.....	18
5. RESULTADOS.....	19
5.1. Estudio anatomopatológico.....	19
5.2. Estudio histológico.....	21
5.3. Estudio bacteriológico.....	23
5.4. PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).....	23
6. DISCUSIÓN.....	25
7. REFERENCIAS.....	31
8. ANEXOS.....	37

Abreviaturas.

Ptb: Paratuberculosis.

Map: *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*.

BAAR: Bacilos Acido Alcohol Resistente.

CAIT: Complejo Agropecuario Industrial Tizayuca.

LAM: Lipidoarabinomanano.

PP: Placa de peyer.

γ IFN: Interferón gamma.

IL-2: Ínterleucina 2

CGM: Células Gigantes Multinucleadas.

IgM: Inmunoglobulina M.

IgG: Inmunoglobulina G.

H.E: Hematoxilina-Eosina.

Z.N: Ziehl-Neelsen.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.

E.C: Establo.

L-J: Löwenstein-Jensen.

CC: Condición Corporal.

Pb: Pares de bases

IS 900: Secuencia de inserción 900.

ELISA: Prueba de inmuno ensayo enzimatico (Enzime-linked immunosorbent assay)

FC: Fijación de complemento

IDGA: Inmuno difusión en gel agar

Resumen.

CASTILLO VELAZQUEZ UZIEL. Hallazgos anatomopatológicos y bacteriológicos en mortalidad de bovinos asociados a paratuberculosis en el Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca, Hidalgo. (Bajo la supervisión de: Dr. Gilberto Chávez Gris y MVZ. Rafael Soto Castor)

La paratuberculosis bovina (Ptb), es una enfermedad crónica infecciosa, causada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*), que genera cuantiosas pérdidas económicas en la industria ganadera. En esta investigación se determinó el porcentaje de animales de desecho con lesiones macroscópicas y microscópicas asociadas a paratuberculosis, así como la identificación de *Map*, mediante aislamiento bacteriológico y la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), a partir de: la válvula ileocecal, linfonodos mesentéricos y otros órganos con lesiones asociadas a la enfermedad en animales muertos del Complejo agropecuario Industrial de Tizayuca, Hidalgo. (CAIT). Se realizó la necropsia en 40 animales, pertenecientes a 29 establos, los cuales fueron estratificados por su tamaño: 1) Pequeños (hasta 180 animales por establo), 2) medianos (de 181 a 300 animales) 3) grandes (mas de 300 animales). Tres animales (7.5%) mostraron lesiones asociadas a Ptb, con presencia de abundantes bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR). Se realizó el cultivo bacteriológico empleando el medio Löwestein-Jensen con micobactina J a partir de la 8ª semana, en un caso y a partir de la 10ª semana en dos vacas. También se realizó la prueba de PCR utilizando iniciadores específicos para la IS900, con la cual se confirmó la presencia de la especie *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en estos aislamientos. A través de una PCR-tipo específico se determinó el polimorfismo genético de dichos aislamientos, demostrando ser del genotipo C. Este es el primer trabajo donde se realiza el aislamiento de *Map* en bovinos lecheros del CAIT y la primera determinación del tipo genético de *Map* de bovinos en México. Adicionalmente, se sugiere que pudiera existir una subestimación de los animales que cursen con paratuberculosis en el CAIT, ya que de manera tradicional solo se realiza su diagnóstico clínico. Por lo que se sugiere establecer estrategias para el diagnóstico y control de esta enfermedad.

1. Introducción.

La paratuberculosis (Ptb) es una enfermedad crónica que afecta a los rumiantes domésticos y silvestres, la cual se caracteriza por causar una enteritis granulomatosa crónica.^{1,2} El agente causal es *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, un bacilo intracelular de 0.5-1.5 µm, ácido alcohol resistente (BAAR).^{1, 3, 4, 5, 6} La importancia de esta enfermedad radica en las pérdidas económicas asociadas a esta.^{3,6}

1.1 Antecedentes históricos.

En 1826 D'Aroval describió una enfermedad que afectaba a bovinos, caracterizada por presentar diarrea crónica y que podía corresponder a un cuadro de paratuberculosis. En 1881 Hansen y Nielsen, describen lesiones macroscópicas intestinales que mostraban engrosamiento y corrugación de la mucosa de bovinos que morían con este tipo de enteritis. Cuatro años después en Dresden, Alemania HA. Johne y L. Frothingham, son los primeros en demostrar la presencia de un bacilo ácido alcohol resistente en lesiones intestinales que no podían distinguirse de los causantes de la tuberculosis, por lo cual lo consideraron como un caso peculiar de tuberculosis en una vaca con enteritis crónica. Sin embargo, en 1906, Bang demostró que se trataba de un proceso diferente a la tuberculosis, a la que denominó Enteritis pseudotuberculosa o Enfermedad de Johne. Para el año de 1910, Twort realiza el primer aislamiento de la bacteria, la cual recibe el nombre de *Mycobacterium enteritidis croniceae pseudotuberculosis bovis Jhone*. Que posteriormente se conoce como *Mycobacterium paratuberculosis* y en 1990 se denominó *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.^{7,8}

La enfermedad en México tuvo sus primeros reportes en 1936, donde se confirmó en bovinos mediante un diagnóstico de la bacteria en heces y la prueba de la Johnina, realizado por Unzueta. En 1974, Bustamante realiza una detección de anticuerpos a *Map*, por medio de la fijación de complemento, para ese mismo año, Garibay contribuye con una prueba doble comparativa a la tuberculina aviar y mamífera para la identificación de reactores de la enfermedad en un hato bovino.^{9, 10, 11}

1.2 Impacto económico de la enfermedad.

Dada la importancia económica y zoonosológica de la paratuberculosis, que impacta de manera severa la producción, se menciona que las pérdidas asociadas a la enfermedad subclínica incluyen: disminución en la eficiencia alimenticia, disminución en la producción, grasa y proteína en leche, disminución del peso al sacrificio de los animales desechados, disminución en la fertilidad, desecho prematuro e incremento en la incidencia de mastitis los cuales son una respuesta a dos mecanismos fisiológicos: el balance energético negativo de energía y una inmunidad celular dañada. El primero debido a una mala absorción intestinal de nutrientes y el segundo, a una alteración en la respuesta celular.¹²

Las pérdidas económicas debido a la enfermedad son considerables. En Victoria, Australia (1994) se estimó que las pérdidas en la industria lechera y cárnica son de 7.5 millones de dólares al año, estas pérdidas se atribuyen o son consecuencia de la muerte animal con signos clínicos o debido a los efectos subclínicos, como disminución de peso, fertilidad y disminución en la producción láctea.^{3, 6, 13}

Se ha estimado en los Estados Unidos (1990), que la enfermedad de Johne resulta en una pérdida de 250 millones de dólares al año, de productividad en la industria lechera. Las pérdidas que provoca en la ganadería son debidas principalmente a la muerte o desecho de los animales, así como la disminución de la productividad, llegándose a estimar que en hatos bovinos con una prevalencia mayor al 5% de paratuberculosis, ocasiona una disminución del 5 al 25% en la producción de leche (Collins 1994).^{14,15}

En el 2005 se realizó el primer trabajo acerca del impacto económico de esta enfermedad en México, el cual fue realizado en 30 establos del CAIT, donde se cuantificaron las pérdidas originadas por esta enfermedad, las cuales por concepto de desecho prematuro tuvo una pérdida de \$3,116,676 mn con un 16.62% de la pérdida total, por concepto de disminución en la producción láctea hubo una pérdida de \$9,009,283 mn con un 48.05% del total, por fallas reproductivas \$4,139,960 mn y un 22.08% de pérdida y por tratamiento médico \$2,483,565 mn con un 13.25% de pérdida, lo cual dio un total de \$18,749,484 mn de pérdidas totales en un periodo comprendido entre diciembre del 2003 a junio 2004. En el mismo estudio se encontró que en establos medianos con un numero de cabezas entre 181 y

300, eran los mas afectados por la paratuberculosis y que esta se mostraba en la 2ª lactancia con un 37.16% de la presentación total.¹⁶

De los animales infectados con *Map* solo un porcentaje presentan signos clínicos y una baja en la producción, debido a ello, de los animales de desecho solo una proporción llegarán con signos y lesiones claras, por lo cual es importante evaluar las lesiones de los animales al sacrificio, pues algunos bovinos pueden no mostrar signos clínicos, aunque si lesiones que sugieran infección a *Map*.^{17,18}

La ausencia de animales con signos clínicos no descarta, la posibilidad de que la paratuberculosis se encuentre presente en una explotación. Únicamente un estudio minucioso de diferentes muestras, mediante una combinación de técnicas de diagnóstico como lo son los diagnósticos anatomopatológico y bacteriológico, permitirán llegar a identificar la infección, ya que durante el periodo prepatente de la enfermedad es normal la ausencia de signos clínicos. En estos casos, la paratuberculosis podría llegar a manifestarse con una disminución de la producción o con una mayor susceptibilidad a padecer trastornos reproductivos o mastitis.^{17,18}

1.3 Etiología.

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* es un bacilo que mide de 1.5 a 2 µm de largo por 0.5 µm de ancho, no móvil que tiende a agruparse, ácido alcohol resistente y a veces puede ser negativo a esa tinción, tiene poca afinidad por la tinción de Gram. Una de sus principales características es su lento crecimiento, y su dependencia de micobactina que es un agente quelante de hierro necesario para su crecimiento *in vitro*, en donde produce colonias con un tamaño que oscila entre 1 a 5 mm de diámetro que pueden ser firmes, suaves, lisas o rugosas con variación en su color de amarillo a naranja. Los medios que con mayor frecuencia se emplean para su cultivo *in vitro* son Löwestein-Jensen, Herrold 7H9 y 7H11 con la adición de micobactina. La micobactina es una molécula lipofílica que se encarga de transportar el hierro a través de las gruesas capas de la pared micobacteriana. El hierro se libera de la micobactina al transformarse de ácido férrico a ácido ferroso el cual se utiliza para el metabolismo intracelular.¹⁹

Este microorganismo se caracteriza por poseer una compleja pared micobacteriana relativamente impermeable, rica en lípidos. Esta pared consiste de una capa interna de

peptidoglicanos, una doble capa interna, asimétrica, con ácidos grasos de cadena larga como son, los ácidos micólicos unidos a arabinogalactán, además de una capa externa de peptidoglicolípidos o ácidos micósidos.²⁰ Su pared celular también posee un glicolípido, el lipoarabinomanano (LAM) que esta asociado a la respuesta inmune celular. Otra de sus características es que puede sobrevivir fuera del animal por periodos prolongados. Se mantiene viable durante 163 días en agua de río, 270 en agua almacenada, y 11 meses en heces de bovino y tierra, y solo 7 días en orina. También sobrevive congelado a -14°C hasta por un año.¹² Con la ayuda de técnicas moleculares se ha determinado que *Map* posee una secuencia única de inserción, la IS900 con 15 a 20 copias por genoma.^{7,8}

1.3.1 Taxonomía.

Pertenece al género *Mycobacterium*, único de la familia *Mycobacteriaceae* y al orden Actinomycetales. Con la introducción de las técnicas para el estudio del genoma del ADN micobacteriano, se establecieron homologías entre diversas cepas de *Mycobacterium paratuberculosis* y las del Complejo *Mycobacterium avium-intracellulare* que oscilaron entre el 78 al 97%. De tal manera se sugirió que *Mycobacterium paratuberculosis* debería de incluirse dentro del Complejo de *M. avium* y quedo como *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.^{7,8}

1.4 Patogenia de la enfermedad.

La vía de transmisión es oral, mediante la ingestión del microorganismo, en agua o alimento contaminado por las heces de animales infectados.^{1,17} Otras posibles vías de infección son la intrauterina y la ingestión de calostros y leche contaminados.^{1,13,18} El periodo de incubación que comprende de los 6 meses a varios años,¹⁸ permite que se observe la eliminación de bacterias a través de heces por más de 18 meses antes de que los signos clínicos sean aparentes. En los casos clínicos, la eliminación de microorganismos puede ser de más de $5 \times 10^{(12)}$ micobacterias al día.¹ Los animales son más susceptibles a la infección en los primeros 30 días de vida y el riesgo de infección se reduce conforme avanza la edad, pero puede continuar hasta los 12 meses de edad.^{1,13} La enfermedad clínica se desarrolla cuando el animal tiene de 2 a 5 años. En la mayoría de las infecciones naturales de Ptb se presume que la respuesta inmune del huésped elimina al

microorganismo, pero una proporción de los animales permanece con la infección y después de una fase subclínica se desarrolla la enfermedad cuando ya son adultos.²

Después de la ingestión de la micobacteria, por endocitosis se introduce a las células M (células membranosas) localizadas en los domos que cubren a las placas de peyer del íleon y yeyuno. Las micobacterias intactas o degradadas son transportadas en vacuolas a través de las células M por transitosis a los macrófagos en áreas subepiteliales e intraepiteliales del tejido linfoide asociado a intestino o placas de Peyer (PP), así como para lámina propia adyacente.^{1,2}

La capacidad de *Map* para sobrevivir dentro de los macrófagos del hospedador es sin duda, esencial para el desarrollo de la enfermedad. El lipidoarabinomanano (LAM), los fosfolípidos, la cera D y otros glicolípidos presentes en la pared micobacteriana, juegan un papel importante en la adhesión e internalización del microorganismo hacia el macrófago y posiblemente también en células epiteliales. Una vez dentro de esta célula, se inhibe la maduración del fagolisosoma posiblemente por inactivación de la bomba de ATPasa, la cual en circunstancias normales, acidificaría el fagosoma.^{21,22,23} Las lesiones iniciales de la enfermedad se observan en el área interfolicular de las PP.²⁴

Posteriormente, las bacterias migran dentro de los macrófagos localizados en la PP hacia los linfonodos mesentéricos y hacia la lámina propia, lo que ocasiona en la mayoría de los casos una intensa respuesta inmune que produce las lesiones, además, de la eliminación de la micobacteria, una vez que se ha establecido la infección intestinal, las micobacterias dentro de los macrófagos pueden migrar vía linfática hacia linfonodos mesentéricos y sitios extra-intestinales, como por ejemplo la glándula mamaria.²³

1.4.1 Signos clínicos de la enfermedad.

El curso clínico de la enfermedad es generalmente de 3 a 6 meses. De acuerdo a los signos clínicos, la eliminación fecal de la bacteria y la respuesta inmunológica que muestra el ganado infectado se han clasificado 4 etapas.²⁵

En la primera etapa no hay signos clínicos (infección silenciosa), ni eliminación de la bacteria o detección de anticuerpos circulantes. En la segunda etapa (infección subclínica) los animales pueden eliminar una baja cantidad de bacterias a veces indetectable en las heces, además de tener una disminución en la producción.

En la etapa tres (enfermedad clínica) los animales gradualmente pierden peso y tienen pérdidas debido a la defecación acuosa. La diarrea es intermitente al principio, la bacteria en las heces y los anticuerpos en sangre son usualmente detectados en esta etapa. La mayoría de los animales, si no son desechados, pasan a la cuarta etapa (enfermedad clínicamente avanzada) caracterizada por una diarrea crónica, profusa y acuosa, emaciación, letargia, anemia, pérdida progresiva de peso hasta llegar a la caquexia y atrofia muscular, donde puede presentarse edema en tejido subcutáneo fundamentalmente a nivel submandibular, así como ascitis, aunque los animales siguen mostrando un apetito normal.²⁶

1.4.2 Lesiones asociadas a paratuberculosis.

Las lesiones macroscópicas se caracterizan por engrosamiento de la mucosa intestinal, principalmente del íleon terminal, yeyuno y ocasionalmente duodeno. Los linfonodos mesentéricos e ileocecales se encuentran aumentados de tamaño, con aspecto edematoso y en ocasiones presentan calcificación. También se puede llegar a presentar linfangiectasia.^{1,2} Se reconocen dos formas de la enfermedad, denominadas paratuberculosis tuberculoide o paucibacilar y paratuberculosis lepromatosa o multibacilar, las cuales difieren en los tipos de células inflamatorias presentes en las lesiones y en la cantidad de BAAR observados. En el tipo tuberculoide, existe engrosamiento moderado en la pared del intestino, en algunas ocasiones con pliegues en la mucosa y dilatación de vasos linfáticos, aunque los cambios no son tan marcados como en el tipo lepromatoso. Al examen histológico el engrosamiento intestinal consiste principalmente en infiltración linfocitaria y algunos granulomas. La presencia de BAAR es escasa. Estos hallazgos sugieren una respuesta inmune celular, con altos niveles de IFN γ e IL-2 y una débil respuesta humoral, al parecer regida por Th1. Por su parte, la forma lepromatosa se caracteriza por un engrosamiento marcado de la pared intestinal, que incluso puede abarcar hasta la última porción del duodeno, con formación de pliegues en la mucosa, edema de la serosa intestinal y dilatación de vasos linfáticos, mientras que los linfonodos mesentéricos se encuentran aumentados de tamaño considerablemente. Microscópicamente, existe engrosamiento de la mucosa intestinal y fusión de vellosidades, debido a sábanas de macrófagos y células gigantes multinucleadas (CGM) que infiltran la lámina propia e incluso la submucosa del intestino, aunque también

existen numerosos linfocitos y neutrófilos. Con la tinción de Ziehl-Neelsen se aprecian numerosos BAAR dentro del citoplasma de macrófagos y CGM. En esta forma de presentación de la enfermedad al parecer se presenta una débil respuesta inmune celular con altos niveles de anticuerpos, lo que sugiere una respuesta inmune basada en Th2.¹

Actualmente, el sistema de clasificación de lesiones propuesto por Pérez, *et al*, (1996) es el más utilizado.²⁷ Cuadro 1.

Tipo de lesión	Características
I	El tipo I consiste en lesiones focales en la zona interfolicular y basal de las placas de peyer compuestas con pequeños granulomas formados por macrófagos y células epitelioides; casi no se observan bacilos ácido-alcohol resistente.
II	El tipo II las lesiones son mas marcadas en las placas de peyer, los granulomas se extienden hacia la mucosa intestinal asociada con las placas de peyer, puede observarse en la zona basal de la lamina propia y en las vellosidades adyacentes a las placas de peyer, y se aprecian algunos bacilos ácido-alcohol resistentes.
III	Del tipo III se reconocen tres subtipos: en donde las lesiones granulomatosas afectan a la mucosa adyacente y no adyacente a las placas de peyer.
IIIa	El subtipo IIIa consiste en granulomas multifocales principalmente en la lámina propia, las cuales involucran mas vellosidades causando su engrosamiento. En la submucosa y serosa se aprecian focos de células inflamatorias, principalmente linfocitos y macrófagos alrededor de vasos linfáticos y sanguíneos, se observan moderados bacilos ácido-alcohol resistentes.
IIIb	El subtipo IIIb se caracteriza por causar una enteritis granulomatosa compuesta por una gran cantidad de células epitelioides, macrófagos y algunas células gigantes distribuidas difusamente, dando un aspecto de mosaico a la mucosa asociada y no asociada a las placas de peyer. Este infiltrado granulomatoso ocasiona atrofia y fusión de vellosidades. Se aprecian numerosos bacilos ácido alcohol resistente.
IIIc	El subtipo IIIc esta compuesto por granulomas compuestos por macrófagos y células gigantes localizadas en las placas de peyer. En la mucosa intestinal predomina infiltrado inflamatorio compuesto por abundantes linfocitos, el cual infiltra la mucosa difusamente hasta la punta de las vellosidades. En la submucosa se aprecia edema y agregados de linfocitos y células plasmáticas, se observan escasos o nulos bacilos ácido alcohol resistente. Se sugiere que estas categorías histopatológicas representan estadios en la patogénesis de la enfermedad. ⁸

Cuadro No 1. Clasificación de lesiones microscópicas de acuerdo a la clasificación de Pérez *et al* (1996).²⁷

1.5 Respuesta inmune.

Los anticuerpos se consideran de poca ayuda en contra de la micobacteria intracelular y las altas concentraciones séricas de anticuerpos son a menudo observadas en la presencia de enfermedad clínica avanzada. Una relación recíproca es reconocida entre la respuesta inmune humoral y la celular en los estadios subclínicos y clínicos de las enfermedades micobacterianas, incluyendo la paratuberculosis.^{28, 22}

La respuesta inmune celular (RIC) se desarrolla relativamente temprano en la infección, y si es efectiva eliminará al organismo y evitara un estado de resistencia. Esta respuesta puede decaer a lo largo del prolongado período de una infección persistente, dando lugar a la proliferación micobacteriana y a la enfermedad asociada con lesiones multibacilares.^{22, 23}

Por largo tiempo se ha reconocido que la respuesta inmune humoral (RIH) no provoca protección contra *Map* y que de hecho, los anticuerpos séricos aparecen hasta etapas avanzadas de la infección, cuando el animal se acerca a la etapa de la enfermedad. En infecciones micobacterianas la RIH parece que se inicia por un aumento en la IgM, seguida por un incremento de IgG, y que varios meses después de que ocurrió la infección, al haber lisis de las células y liberación de antígeno, la RIC se debilita por lo que las micobacterias intracelulares proliferan y se producen los anticuerpos, aunque estos no son útiles para destruir a las micobacterias restantes que todavía están dentro de los macrófagos.^{20, 22, 23}

1.6 Diagnóstico.

El diagnóstico de la paratuberculosis bovina clínica, se basa en los signos clínicos, en la identificación del agente etiológico mediante el cultivo bacteriológico y el análisis patológico. En tanto para detectar la paratuberculosis clínica y subclínica se usan pruebas que miden las reacciones inmunológicas, humoral y celular.²⁹ El diagnóstico post mortem se basa en las lesiones macroscópicas e histopatológicas mediante la tinción de H-E, con la identificación de la bacteria en órganos, mediante la tinción de Z-N. Algunas pruebas diagnósticas presentan problemas de sensibilidad y especificidad como es la prueba de intradermorreacción donde se utilizan derivados proteicos purificados (PPD) que en este caso presentan reacciones cruzadas con otras micobacterias,³⁰ la prueba de fijación de complemento (FC), tiene la desventaja que solo detecta anticuerpos en la fase tardía de la enfermedad y presenta reacciones cruzadas con otras micobacterias,²⁹ la prueba de

inmunodifusión en Gel Agar (IDGA) en comparación con otras pruebas serológicas, presenta una baja sensibilidad, para detectar animales que están eliminando la bacteria,³¹ la prueba de Interferón gamma (IFN γ) tiene baja especificidad y un alto costo, aunque es útil para el diagnóstico de la enfermedad en fases subclínicas,²⁵ la prueba de inmunoensayo enzimático (ELISA) se considera que tiene el mejor balance entre sensibilidad y especificidad, detecta el mayor número de animales con la infección subclínica, aunque también presenta reacciones cruzadas con otras especies de *Mycobacterium*, existe un procedimiento para disminuir estas reacciones, a través de la previa absorción del suero con *M. phlei*, con lo cual aumenta la especificidad y la sensibilidad, dependiendo del punto de corte,³² además de otras que no han sido lo suficientemente desarrolladas, por lo que varios autores consideran que no hay una del todo satisfactoria.³³

1.6.1 Diagnóstico anatomopatológico.

Se han descrito diversos espectros histopatológicos relacionado con la respuesta inmunológica, la cual esta definida por la existencia de 2 formas distintas de la enfermedad; una forma tuberculoide o paucibacilar, con una fuerte respuesta inmune celular caracterizada por pequeños granulomas formados por células epitelioides rodeadas por abundantes linfocitos con escasos o nulos bacilos ácido alcohol resistentes, y una forma lepromatosa o multibacilar, con una fuerte respuesta inmune humoral acompañada por lesiones compuestas por macrófagos con abundantes bacilos ácido alcohol resistentes.³⁴ En la paratuberculosis, igual que en otras micobacteriosis, la respuesta inmune celular esta considerada como el principal mecanismo para controlar la infección.²

1.6.2 Diagnóstico bacteriológico.

El aislamiento ha sido durante casi un siglo la prueba por excelencia para el diagnóstico de la paratuberculosis, debido a que es una prueba altamente especifica, detecta a los animales que están excretando a la bacteria, se recobra al organismo y técnicamente es una prueba simple, desafortunadamente esta prueba presenta algunos inconvenientes como el hecho de que el resultado depende del desarrollo de la bacteria el cual es lento, la sensibilidad del diagnóstico, depende de la habilidad del microbiólogo, baja sensibilidad diagnóstica cuando se realiza a partir de heces, ya que se detectaran únicamente a los animales que

estén excretando al microorganismo, otra desventaja es su alto costo, además de que puede requerir exámenes adicionales para la completa identificación de *Map*.³⁵

Se pueden utilizar diferentes medios con buenos resultados, aunque los más recomendados son medios a base de huevo como el Herrold,³⁶ empleando como descontaminante el cloruro hexa-decil piridino (HPC), en este caso que se utilizaran muestras de bovino. Se menciona que en el caso de caprinos se logran mejores resultados utilizando los medios de Löwenstein-Jensen con y sin micobactina J y sin piruvato de sodio. Aunque también se pueden usar otros a base de suero como el Dubos, o más sintéticos como las diferentes variantes del medio Middlebrook o el de Watson-Reid.^{37, 38,39}

1.6.3 Reacción en cadena de la polimerasa.

El análisis geonómico del DNA, ha facilitado la detección y discriminación de *Map* con el descubrimiento de la secuencia de inserción considerada específica de *Map*, la IS900. Esta secuencia de inserción se repite de 15 a 20 veces en su genoma, tiene un tamaño de 1,451 pares de bases (pb). Se ha demostrado que la IS900 codifica una proteína, posible transposasa, denominada *p43*, de 399 aminoácidos. La conservación de los sitios de inserción de la IS900, así como su exclusividad en *Map*, sugiere que las inserciones de la IS900 determinan el fenotipo de la bacteria.^{7, 8} Las secuencias de inserción se usan comúnmente como diagnóstico para la diferenciación de especies de micobacterias. Comparadas con otras secuencias blanco en el genoma, el uso de secuencias de inserción es ventajosa debido a que la presencia de múltiples copias incrementa la sensibilidad del diagnóstico.^{40, 41}

Por medio de la utilización de la secuencia de inserción específica de *Map*, la IS900 aplicada en el análisis de polimorfismos en los fragmentos de restricción (RFLP) se establecieron diferencias entre cepas, sugiriendo entonces una clasificación de tres diferentes patrones, denominándose C (de la palabra *Cattle*), S (*Sheep*) e I (*Intermediate*) cada uno de estos con diferentes tipos de patrones de restricción.⁴²

1.7 Situación de la enfermedad en México.

La paratuberculosis se encuentra ampliamente distribuida en todo el mundo incluyendo a México, en nuestro país el primer informe de paratuberculosis se determinó en 1936, por Unzueta a través de pruebas de intradermo-reacción.⁹ En 1979, Ramírez *et al.*, aisló por primera ocasión al *Mycobacterium paratuberculosis* en bovinos productores de leche.⁴³ Sin embargo, hasta la fecha se carece de estudios que establezcan la prevalencia de la enfermedad, así como las pérdidas económicas derivadas de su presencia.

Tomando como referencia el trabajo realizado en 72 toros de lidia procedentes del estado de Tlaxcala de los cuales 8 fueron positivos a *Map* (11%), donde se menciona que la válvula ileocecal fue la sección intestinal mas frecuentemente afectada en 5 casos, seguida de los linfonodos mesentéricos en 3 casos mediante un estudio anatomopatológico a paratuberculosis sin mostrar signos clínicos.⁴⁴

En el estado de Guanajuato se realizó un estudio, con el objetivo de conocer la seroprevalencia de la paratuberculosis en el ganado bovino de 8 municipios, tomando como muestra a 115 ranchos dentro de los 8 municipios donde, 33 ranchos (28.70%) tuvieron animales positivos y 82 (71.30%) fueron negativos. Se utilizaron muestras pertenecientes a 411 animales, en donde 44 (10.71%) fueron positivos a la evaluación con la técnica de ELISA. Del total de animales el ganado productor de leche presentó el 30.65% de positivos y el ganado doble propósito el 25%.⁴⁵

Recientemente se realizó un estudio en el CAIT donde se analizaron 1,639 muestras de suero mediante la técnica de ELISA de las cuales 148 fueron seropositivas a *Map* (148/1639), donde se estimó con una confianza del 95%, la proporción de animales positivos a paratuberculosis bovina, la cual se encuentra entre 7.5 y 10.2 % y una prevalencia promedio del 8.87%.¹⁶

La paratuberculosis o enfermedad de Johne es considerada una enfermedad importante, debido a la probable asociación de *Map* en humanos con la enfermedad de Crohn, que es un proceso clínico y anatomopatológico con semejanzas a la enfermedad de Johne. En un estudio en México, se reporta que en el 100% de los pacientes con presentación granulomatosa de la Enfermedad de Crohn y en el 37.5% con presentación lesional no granulomatosa, fueron positivos a *Map* a través de la técnica de hibridación *in situ*.⁴⁶

1.8 Justificación.

En este trabajo, se pretende demostrar la presencia de *Map*, mediante aislamiento micobacteriano en el CAIT, identificar el grupo genético al que pertenecen los aislamientos, esto debido a que una gran parte de la población animal es importada de países con altas tasas de prevalencia como son Estados Unidos, Canadá y Australia. Además de que se cuenta con escasos estudios que determinen o documenten el impacto económico de la paratuberculosis en el país, ya que sus repercusiones económicas no han sido tomadas en cuenta por los ganaderos y productores, ni por las dependencias de gobierno, lo que ha ocasionado que no sean cuantificadas adecuadamente. Asimismo, considerando que las manifestaciones clínicas llegan a ser evidentes en algunos casos, tal vez la relevancia de la enfermedad radica en las pérdidas ocasionadas por animales infectados de manera subclínica, siendo esta una de las más importantes. Dado a lo anterior, se pretende determinar el porcentaje de animales muertos con presencia de lesiones macro y microscópicas sugerentes a Ptb, realizar el cultivo bacteriológico y determinar el grupo genético al que pertenecen los aislamientos.

De acuerdo a los registros del CAIT, las causas de sacrificio más importantes son asociadas a la disminución en la producción de leche, en la tasa de fertilidad, problemas locomotores, además, de la alta tasa de reemplazo anual que oscila entre un 20 a 25%, debido a que son animales altos productores,** aunque no se han realizado estudios complementarios para precisar el diagnóstico, es necesario realizar otros estudios clínicos que nos lleven a determinar con precisión la causa de muerte.

La cuenca esta constituida por 126 establos de los cuales 106 están en producción, 9 vacíos y 11 con animales en periodo de secado y becerras de recría. La cuenca tiene una capacidad para albergar a 30,000 animales, pero solo se tiene una población de 12,000 animales en producción y 9,000 animales de recría, en este año la tasa de mortalidad fue de 5% y la tasa de desecho del 17% total. El tipo de explotación que se lleva a cabo en la cuenca es de tipo intensivo, con ganado estabulado, se realizan prácticas de medicina preventiva, reproducción, alimentación y mejoramiento genético. El tipo de dietas que se ofrecen son de tipo integral y la ordeña es de tipo mecánico.**

Se tiene una producción láctea de 3 600 000 litros semanales, parte de esta producción se reparte con empresas lácteas como: *Alpura, Lala, Santa Clara*, queseros particulares y la

marca propia que es *Real de Tizayuca*. Se tiene instalados programas de vacunación contra: Leptospirosis, Rinotraqueitis Infecciosa Bovina, Diarrea Viral Bovina, Virus Respiratorio Sincitial, Parainfluenza 3 y Clostridiasis entre otras. Además de los programas de control y erradicación de Tuberculosis y Brucelosis. **

** Comunicación personal por el MVZ. Rafael Soto Castor. Coordinador de Servicios Médicos Veterinarios de CAIT. Asociación Ganadera Local de Productores de Leche de Tizayuca Hidalgo. (Marzo 2005)

2. Hipótesis.

- Los animales con lesiones macroscópicas y microscópicas relacionadas a la enfermedad, con abundantes (BAAR), serán positivos al cultivo bacteriológico de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*)

3. Objetivos.

- Determinar el porcentaje de animales de desecho con lesiones macroscópicas y microscópicas asociadas a Ptb.
- Realizar aislamiento de *Map* de cultivos bacteriológicos a partir de válvula ileocecal, linfonodos mesentéricos y otros órganos con lesiones asociadas a Ptb en animales muertos en el CAIT.
- Confirmar por medio de la prueba de PCR la presencia de *Map*, la identificación molecular de los aislamientos, mediante la utilización de iniciadores específicos para la IS900 y una prueba de PCR tipo-específico, para determinar el grupo genético al que pertenecen dichos aislamientos.

4. Material y métodos.

Se llevó a cabo el estudio en el CAIT ubicado en el kilómetro 57 de la carretera federal No.85 México-Pachuca. En la región hay una precipitación pluvial anual de 375 a 450 mm, con épocas de lluvias de abril a octubre, una temperatura media anual de 16°C y una altura sobre el nivel del mar de 2,200 metros, se considera de clima seco estepario. (Clasificación de Kôppen).⁴⁷

4.1. Grupo de animales.

El estudio se realizó a partir del desecho de 29 establos del CAIT con 40 animales en total, que tuvieron como condición para su inclusión en el estudio, el contar con registros para proporcionar datos adicionales en el periodo comprendido entre los meses de octubre de 2004 a junio de 2005. Estos establos fueron seleccionados ya que todos cuentan con registros reproductivos y antecedentes de paratuberculosis, estos dados por antecedentes serológicos de la misma. Se realizó una estratificación de los establos dependiendo del numero de cabezas en: pequeños (menores a 181), medianos (181 a 300) y grandes (mayores a 300).¹⁶

4.2. Estudio histopatológico.

Se tomaron muestras de los animales muertos de los 29 establos que comprende el estudio, para su inclusión las muestras no mostraron cambios post mortem aparentes.

Se tomaron muestras de la válvula ileocecal, linfonodos mesentéricos, así como de otras lesiones observables en otros órganos sugerentes a Ptb, los órganos afectados fueron fijados en formalina amortiguada a pH 7.2-7.6. Se realizaron cortes histológicos de 4µm para su posterior inclusión en parafina, para evidenciar lesiones macroscópicas y microscópicas mediante técnicas histológicas rutinarias como la tinción de Hematoxilina-Eosina y la tinción de Ziehl-Neelsen, para detectar bacterias ácido alcohol resistentes, presentes en las lesiones, que se tomó como condición para su posterior cultivo en el Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

4.3. Cultivo bacteriológico.

Se realizó en el laboratorio de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Bajo condiciones de estricta bioseguridad y en campanas de flujo laminar.

El cultivo bacteriológico se llevó a cabo en los animales que presentaron lesiones sugerentes de Ptb y se encontraron BAAR mediante la tinción de Z-N. A partir de muestras de válvula ileocecal, linfonodos mesentéricos así como de íleon con lesiones aparentes; se realizó el cultivo bacteriológico empleando el medio de Löwestein-Jensen con y sin micobactina J, con la adición de Anfotericina B, Vancomicina y ácido Nalidíxico para evitar su contaminación, fueron incubadas las muestras a 37° C para la posterior revisión del desarrollo de colonias a las 8, 12 y 16 semanas.

4.3.1 Procesamiento de las muestras:

Se raspó la mucosa de los órganos seleccionados con una hoja de bisturí estéril tanto para el intestino como para la válvula ileocecal y los linfonodos mesentéricos, se obtuvo 1g de tejido. Cada una de las muestras se colocaron en un macerador de cristal, tipo *Tenbrook* y se homogenizaron con hexa-decil-piridino, por un lapso de 24 hrs. Una vez esto, se adicionaron los antibióticos antes mencionados y se homogenizaron las muestras dejándolas sedimentar por un lapso de 24 hrs. Posteriormente se tomaron 4 ml de la fase intermedia con una pipeta de transferencia estéril, por ultimo se inocularon los medios de Löwenstein-Jensen con y sin micobactina J y se mantuvieron en incubación a 37° C, durante 16 semanas revisando su desarrollo desde las 8 semanas.

4.4. PCR. (Reacción en cadena de la polimerasa).

A partir del cultivo bacteriológico se realizó la prueba de PCR para confirmar que los aislamientos corresponden a *Map*, a través de la metodología descrita por Estévez (2004)³⁴ y posteriormente, se realizó una PCR-tipo específica para determinar el grupo genético al que corresponden estos aislamientos. Esta prueba se realizó a través de la metodología previamente descrita por Collins *et al* (2002).⁴⁸

4.4.1 PCR IS900

Se utilizó la metodología descrita por Estévez (2004).³⁴ Bajo las siguientes recomendaciones:

Iniciador 1: **5'-CGCTGCTGGAGTTGATTG-3'**.

Iniciador 2: **5'-TTTCCTTCGGTGCCTTTC-3'**.

- 1 ciclo a 95° C por 3 min.
- 25 ciclos a 60° C por 30 seg.
- 25 ciclos a 72° C por 30 seg.
- 25 ciclos a 94° C por 30 seg.
- 1 ciclo a 72° C por 7 min.
- 14 µl H₂O
- 10 µl Enhancer
- 5 µl Buffer
- 3 µl Mg
- 3 µl dNTP's

ADN extraído al hervir suspensión de colonias a 92° C por 20 min.

- 2 µl iniciador 1
- 2 µl iniciador 2
- 10 µl ADN
- 1 µl Polimerasa

4.4.2 PCR-Tipo específico.

Se utilizó la metodología de Collins. MD (2002).⁴⁸ Donde recomienda los siguientes iniciadores: **DMC529**, **DMC531** y **DMC533**. Bajo las siguientes consideraciones:

Se utilizó como iniciador 1 DMC 529:**5'-TTGACAACGTCATTGAGAATCC-3'**.

Como iniciador 2 DMC 531: **5'-TCTTATCGGACTTCTTCTGGC-3'**.

Como iniciador 3 DMC 533: **5'-CGGATTGACCTGCGTTTCAC-3'**

- 1 ciclo a 95°C por 3 min.
- 25 ciclos a 60°C por 30 seg.
- 25 ciclos a 72°C por 30 seg.
- 25 ciclos a 94°C por 30 seg.
- 1 ciclo a 72° C por 7 min.
- 14 µl H₂O
- 10 µl Enhancer
- 5 µl Buffer
- 2 µl Mg
- 1 µl dNTP's
- 2 µl iniciador 1
- 2 µl iniciador 2
- 2 µl iniciador 3
- 10 µl ADN
- 1µl Polimerasa.

5. Resultados.

5.1. Estudio anatomopatológico.

De acuerdo al estudio macroscópico de los animales sacrificados y desechados en el CAIT, las causas de sacrificio mas frecuentes (Cuadro 2) (Anexo 1), se asociaron a fallas reproductivas en 8 casos, lo cual representó un 20% del total del estudio macroscópico, éstas fueron constituidas por desgarre (2/8) y prolapso uterino (1/8), persistencia de quistes foliculares (1/8), piómetra (1/8) y por retención de producto (2/8) y placenta (1/8). Otra causa de mortalidad menos frecuente fueron la reticulitis traumática (4/40) que representó un 10%, entre las mas comunes fueron la retículo-pericarditis en 3 casos, en uno de ellos involucrando al miocardio, y la retículo-hepatitis con un caso. Con un porcentaje similar en cuanto a causa de muerte están las asociadas a Acidosis Láctica Ruminal (4/40) también con un porcentaje total del 10%, entre las comunes fueron, tres casos con neumonía tromboembólica (3/4) y la trombosis séptica de la vena cava posterior (1/4) como secuela de acidosis. La paratuberculosis representó el 4° lugar con un 7.5% (3/40) de los cuales sólo en un caso se apreciaron lesiones macroscópicas sugerentes a esta micobacteriosis, caracterizadas por un moderado engrosamiento de la mucosa intestinal a nivel de ileon, aumento de tamaño de la válvula ileocecal y linfonodos mesentéricos e ileocecales (Fig. 1 y Fig. 2). Otras causas de desecho determinadas por medio del estudio macroscópico que representaron cada una, un 5%, fueron la mastitis clínica (2/40) (Fig. 5), lipidosis hepática (2/40), problemas locomotores que incluyeron a la pododermatitis bacteriana (1/40) y la ruptura de ligamentos pélvicos (1/40), clostridiasis en dos casos, una de tipo intestinal (1/40) y otra de tipo muscular caracterizada por miositis enfisematosa necrótica (1/40). En dos casos no fue posible observar cambios macroscópicos ya que los animales murieron ahogados (2/40) y se realizó la necropsia, ya en un avanzado estado de descomposición de los animales, en este caso también representaron un 5% del total. Otras causas de muerte que se agruparon en el apartado de “otros” fueron aquellas que solo eran casos aislados como edema pulmonar, linfosarcoma visceral, torsión abomasal, impactación abomasal (Fig.4), tuberculosis (Fig. 3), miocarditis abcedativa, timpanismo gaseoso, todas con un solo caso, y en conjunto estas representaron un 17.5% (7/40).

Es destacable que en el 20% restante, no fue posible detectar la causa de muerte por medio de lesiones macroscópicas ya que no mostraban lesiones sugerentes de alguna enfermedad en particular o corroboran un diagnóstico postmortem.

Cuadro No. 2. Principales causas de muerte en el CAIT (agosto/2004 - junio/2005)

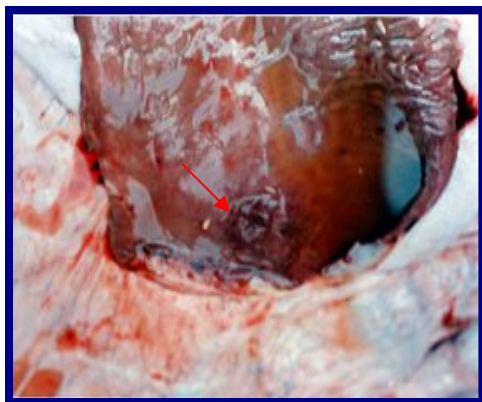
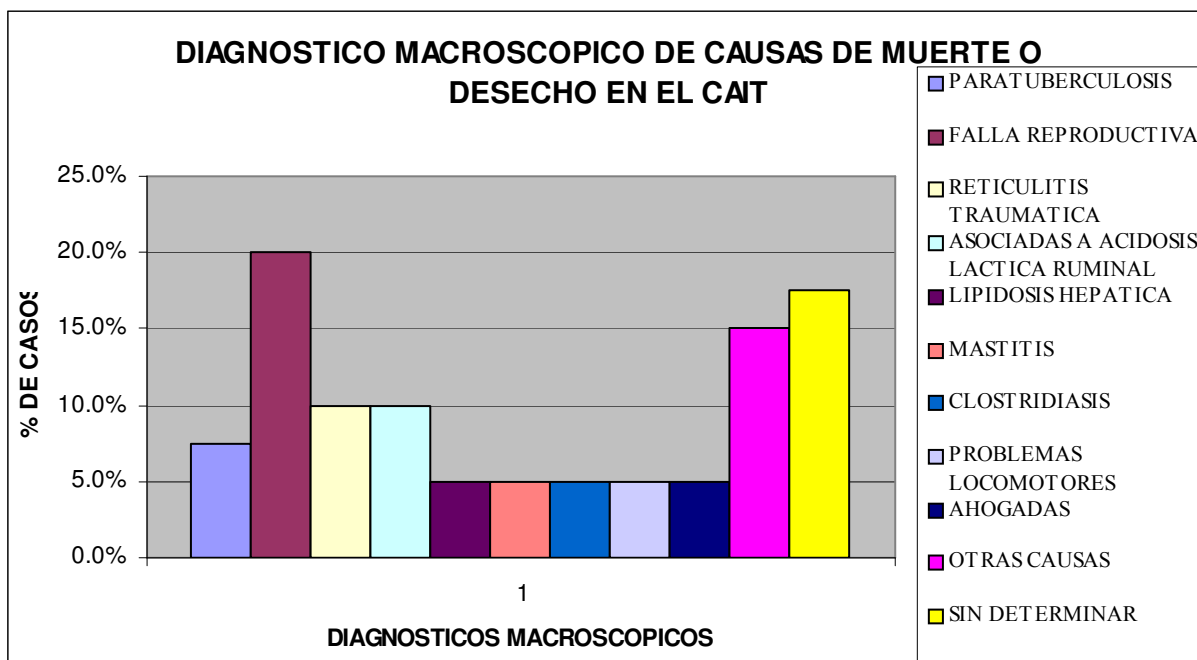


Fig. 1 Válvula ileocecal aumentada de tamaño compatible con Pt. (flecha)

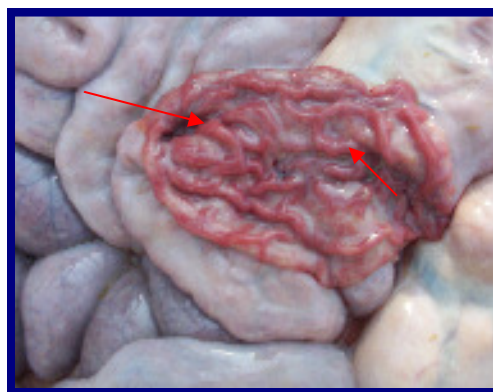


Fig. 2 Engrosamiento de la mucosa intestinal sugerente a Pt. Ileon (flecha)

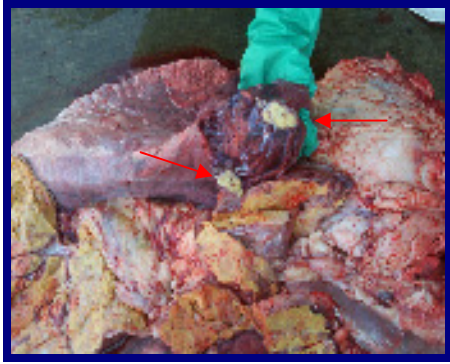


Fig. 3 Lesión tuberculosa en pulmón de bovino. (Flechas)



Fig. 4 Abomaso con presencia de contenido alimentario compacto y deshidratado compatible con impactación abomasal.



Fig. 5 Vaca con mastitis clínica. Lesión inflamatoria en glándula mamaria. (Flecha)

5.2. Estudio histológico.

Se realizó el estudio histopatológico de los 40 casos revisados macroscópicamente, siendo observados solo en tres animales lesiones asociadas a paratuberculosis (anexo 2) (Figuras 6-11). Los tres casos fueron positivos a Z-N, demostrando la presencia de BAAR. En un caso se observó degeneración vacuolar de hígado que fue sugerente a lipidosis hepática.

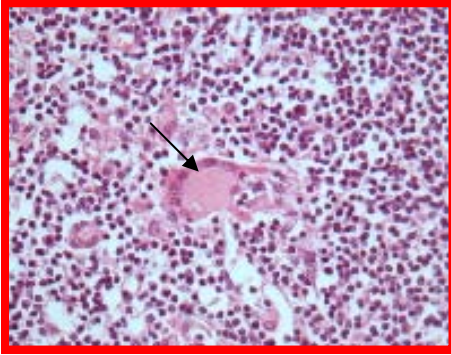


Fig. 6 Lesión granulomatosa en célula gigante.
EC. 144 vaca s/n imagen a 40x. H-E. (Flecha)

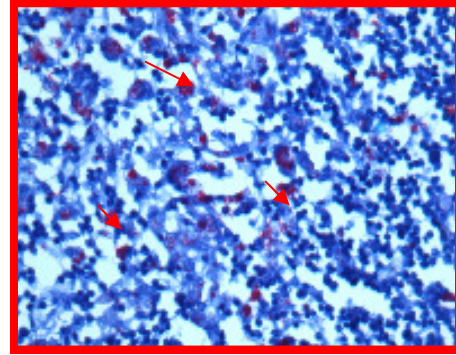


Fig. 7 Moderada cantidad de BAAR.
EC. 144 vaca s/n imagen a 40x. Z-N.
(Flechas)

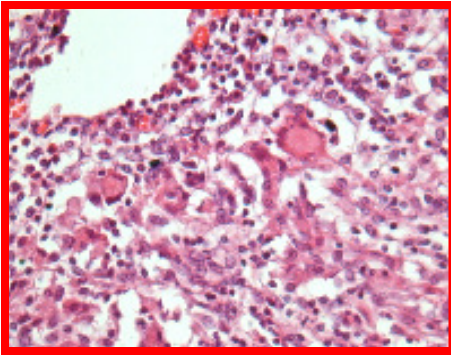


Fig. 8 Vista panorámica de enteritis
granulomatosa en lámina propia íleon.
EC. 149 vaca 836 imagen a 40x. H-E.

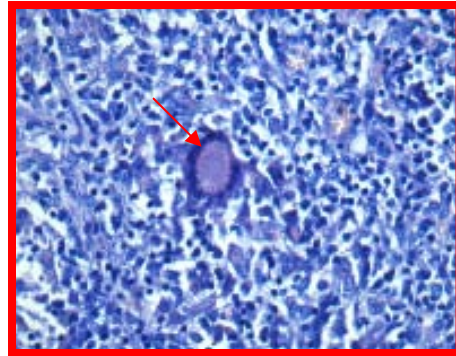


Fig. 9 Célula gigante con BAAR. Íleon
EC. 149 vaca 836 imagen a 40x Z-N. (Flecha)

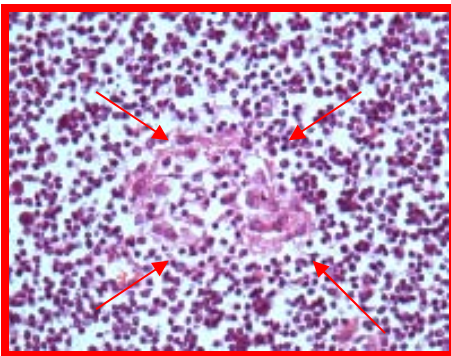


Fig. 10 Detalle de foco granulomatoso.
Válvula ileocecal. EC. 149 vaca 836
Imagen a 40x H-E. (Flechas)

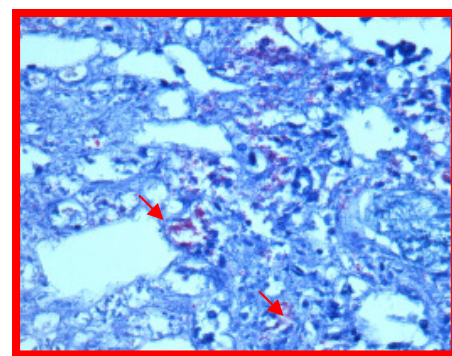


Fig. 11 Abundantes micobacterias en tejido
mal conservado válvula ileocecal. EC. 149
vaca 67. Imagen a 40x. Z-N. (Flechas)

5.3. Estudio bacteriológico.

De los tres casos diagnosticados por histopatología como sugerentes a Ptb, se observaron cultivos positivos entre las 10 y 14 semanas de incubación en todos ellos. Mostrando en estos casos la presencia de colonias de aspecto cremoso entre 1 y 3mm de diámetro (Fig. 12). Se realizó la tinción de Ziehl-Neelsen a los cultivos para evidenciar la presencia de micobacterias y en todas ellas fue posible observar la presencia de abundantes BAAR.

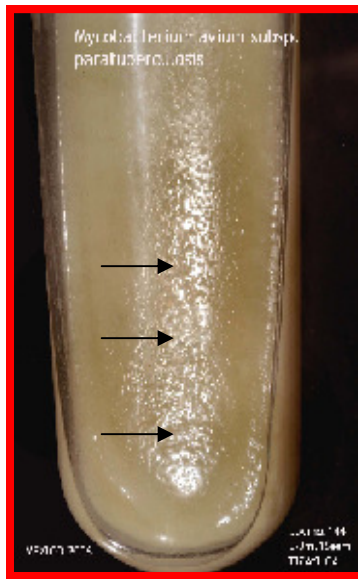


Fig. 12 Desarrollo de colonias
A las 16 semanas de incubación.
Establo 144. Vaca 67. L-J c/micobactina *J.*
(Flechas).

5.4. PCR. (Reacción en cadena de la polimerasa)

Mediante la utilización de iniciadores específicos para la IS900 específica para *Map*, donde se utilizó ADN de los tres aislamientos realizados a los animales del CAIT, se observó en los tres casos una banda de 973 pb, que corresponden al fragmento esperado para *Map*, (Fig. 13). Con lo anterior se confirma la presencia de Ptb en el CAIT. Así mismo, se realizó la prueba de PCR- tipo específico, donde se utilizó un juego de iniciadores, que permitieron la diferenciación del genotipo presente en los aislamientos confirmados de *Map*, en los cuales se observó una banda de 310 pb, en cada una de las muestras, las cuales corresponden al genotipo C. (Fig. 14).

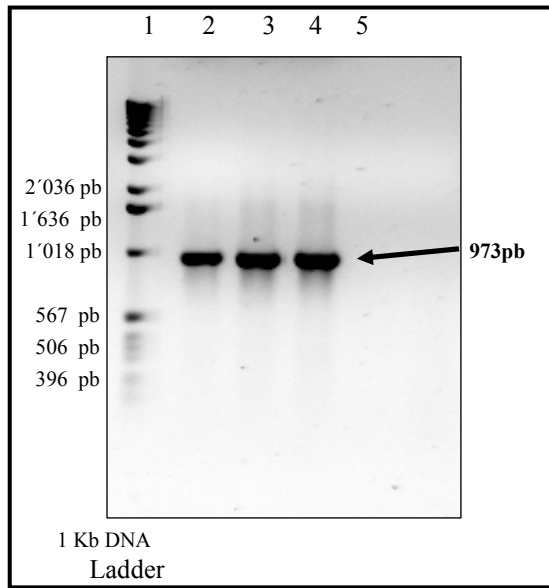


Fig.13. Gel de Agarosa al 1% teñido con Bromuro de Etidio.
 Carril 1. Marcador de peso molecular 1Kb Ladder. Carril 2 Aislamiento de *Map* de Vaca 67. EC 149. Carril 3 Aislamiento de *Map* de Vaca s/n EC 144. Carril 4 Aislamiento de *Map* de Vaca 836. EC 149. Carril 5. Control Negativo.

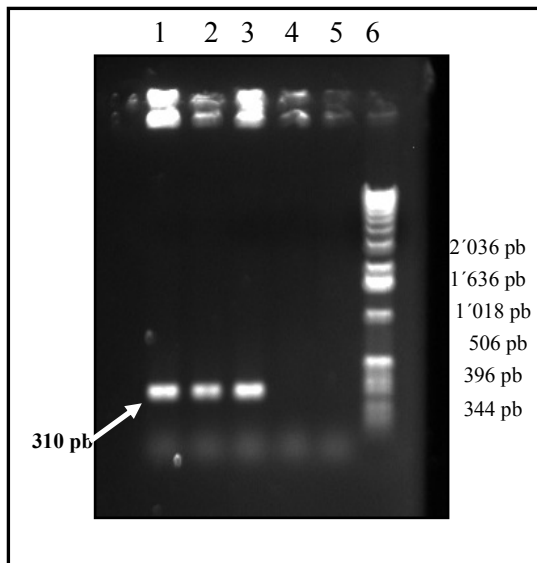


Fig.14 Gel de Agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.
 Carril 1 Aislamiento de *Map* de Vaca 67. EC 149. Carril 2 Aislamiento de *Map* de Vaca s/n EC 144. Carril 3 Aislamiento de *Map* de Vaca 836. EC 149. Carril 4 Control Negativo. Carril 5 Control Negativo. Carril 6. Marcador de peso molecular 1 Kb Ladder.

6. Discusión.

En este trabajo, se sugirió por medio del estudio anatomopatológico en el 80%, las causas de muerte. Se observó que las fallas reproductivas representaron la mayor proporción en los animales desechados ya sea por sacrificio o como causa de muerte con un 20% en el total de los casos. Este resultado concuerda con lo descrito por González (1980),⁴⁹ quien estudió las causas de desecho por problemas reproductivos en el CAIT, indicando que el porcentaje por esta causa correspondió al 24.26% y en su mayoría estos desechos se presentaron en el primer parto de los animales.⁴⁹

En otro estudio realizado por Oble (1986),⁵⁰ en el CAIT se analizaron los registros de 3,244 necropsias realizadas entre los años 1980 a 1984, donde menciona que los trastornos urogenitales, representaron un 7%, mientras que las reticulitis traumáticas un porcentaje del 6.3%, se encontraron 7 casos de paratuberculosis como una causa de desecho de origen multifactorial, esto representó un 0.2% de las causas de muerte. En este estudio engloban a la paratuberculosis, la mastitis, los animales ahogados y los problemas locomotores dentro de los problemas de origen multifactorial, los cuales representaron el 13% del total de muertes.⁵⁰ En este estudio se encontró que las fallas reproductivas representaron un 20% del total de las causas de muerte, las reticulitis traumáticas y las causas asociadas a acidosis láctica ruminal un 10%. En tercer lugar encontramos a la paratuberculosis, como causa de muerte con un 7.5%, la mastitis, los animales ahogados y los problemas locomotores como causa de muerte o desecho, representaron un 5% del total de muertes cada uno. Esta diferencia se podría justificar en el hecho de que en el trabajo realizado por Oble,⁵⁰ se englobaron las lesiones por aparatos y sistemas, sin tomar en cuenta, que muchas lesiones pueden deberse a secuelas o consecuencias de las verdaderas causas de muerte o que, a la necropsia existiera un hallazgo de mayor importancia para explicar la muerte del animal.⁵⁰ Además, de que no se realizaron exámenes complementarios que confirmaran los diagnósticos postmortem y no menciona el tipo de diagnóstico que fue utilizado para llegar a este resultado y básicamente a que ese estudio se realizó utilizando la base de datos del CAIT.⁵⁰ También con un 5% como causa de muertes se mencionó a los problemas por el género *Clostridium*, que en este caso hubo una presentación intestinal y otra quizás

corresponda a una presentación muscular. Los problemas por lipidosis hepática representaron un 5% del total de muertes, pero no se tienen estudios en la cuenca con los cuales se puedan comparar estos resultados.

Otras causas de muerte como fueron, la impactación abomasal, abomasitis ulcerativa, timpanismo, tuberculosis, edema pulmonar, y linfosarcoma visceral, representaron en conjunto un 17.5% de las causas de muerte o sacrificio, este resultado es difícil de comparar con los presentados por Oble,⁵⁰ ya que al igual que los anteriores, los ha agrupado por sistemas, lo cual hace imposible determinar el porcentaje exacto que representa cada una de las causas. Estas causas de muerte son una consecuencia del manejo incorrecto en cuanto instalaciones, nutrición, manejo reproductivo y medicina preventiva, ya que no todos los ganaderos tienen los mismos programas de vacunación y que la mayoría de los casos se solicita al Médico Veterinario encargado, cuando el animal está en un estado avanzado de enfermedad, lo cual propicia que los tratamientos sean ineficientes o no produzcan ninguna mejoría en el animal, o a que el ganadero considera elevado el costo del tratamiento y prefiere enviarlo al rastro. De las causas de muerte antes mencionadas, el porcentaje podría reducirse, con mejores prácticas de manejo ya que están asociadas a problemas tanto en los procedimientos clínicos, así como en lo nutricional, como es el caso de la lipidosis, reticulitis, mastitis, las asociadas a acidosis láctica ruminal, problemas locomotores y sobre todo las relacionadas con las fallas reproductivas como son la infertilidad, persistencia de quistes foliculares y los abortos.⁵¹

Sin embargo, otras causas que provocan el desecho en los bovinos del CAIT están, asociadas a problemas infecciosos, como lo fueron la clostridiasis, la paratuberculosis y los asociados a mastitis. En estos casos es fundamental su confirmación, mediante otras pruebas como puede ser el aislamiento que, en este estudio solo se realizó aislamiento de *Map*, que confirmó la presencia de la enfermedad de Johne o paratuberculosis en el CAIT.

Se han realizado estudios en otros países donde se menciona que el porcentaje de animales con lesiones sugerentes a paratuberculosis es mayor, como el estudio realizado en Frederiksberg, Dinamarca (Huda. 2003)⁵² donde, de 16 animales, 12 tenían antecedentes serológicos de enfermedad y 4 eran negativos, se encontró que el 37.5% presentaron lesiones microscópicas sugerentes a paratuberculosis, se realizó cultivo bacteriológico y solo en un 25% de los animales se logró confirmar la presencia de *Map*.⁵²

En León, España (González *et al.* 2005),⁵³ estudiaron 167 bovinos, todos ellos con antecedentes clínicos y serológicos a paratuberculosis, en un 28% se diagnosticó la enfermedad por los signos clínicos presentes, el 69.46% tenía lesiones microscópicas asociadas a paratuberculosis, se realizó el cultivo bacteriológico, en el cual se logró el aislamiento en el 47.4% del total de animales. En este caso el resultado tan alto de animales positivos al cultivo, se debe a que se realizó el estudio en zonas con altas tasas de infección y antecedentes serológicos y clínicos de la enfermedad.⁵³ Un año antes se realizó un estudio en Maine y Atlántic en Canadá (McKenna *et al.* 2004)⁵⁴ donde se sacrificaron a 984 bovinos productores de leche y se encontró que 134 animales mostraban lesiones macroscópicas sugerentes a Ptb, solo en 7 de ellos (5.2%) se logró evidenciar la presencia de lesiones microscópicas compatibles con la enfermedad, y solo en el 2.74% del total de animales desechados fueron positivos al aislamiento.⁵⁴ En nuestro trabajo observamos que solo el 7.5% de los animales mostró lesiones asociadas a Ptb (3/40), es preciso comentar que de todos los animales muertos, solo uno de ellos, se desecho por sospecha de paratuberculosis, ya que el diagnóstico que se lleva en la cuenca es mas de tipo clínico a base de raspados rectales teñidos mediante la tinción de Z-N. Esto es de gran importancia, pues debemos recordar, que no todos los animales se encuentran eliminando la bacteria y mostrando signos clínicos de esta, esto podría ser un factor en contra ya que los animales infectados comienzan a mostrar signos clínicos hasta etapas tardías de infección, tiempo en el cual ya se pudo estar eliminando y diseminando la bacteria en todo el hato.¹ Sin embargo, este resultado puede ser aun mayor, ya que una gran parte de la población animal, son vendidos en pie a carniceros de la zona o llevados a rastros sin determinar su localización, haciendo imposible obtener las muestras para el estudio, así que solo se pudo obtener las muestras de los animales que murieron dentro de la cuenca, lo cual no representa ni la tercera parte del desecho que se tiene en el CAIT.

En nuestro trabajo los resultados no coinciden con los autores del CAIT, ya que mencionan porcentajes mas bajos en cuanto a la presentación de lesiones microscópicas sugerentes de la enfermedad, pero en ninguno mencionan el tipo de técnica diagnóstica que fue utilizada.^{49,50} Con respecto a los resultados con otros países nuestros resultados son significativamente mas bajos esto se puede deber a las diferentes tasas de infección, la persistencia de la enfermedad en los hatos, las medidas de bioseguridad, antecedentes de la

enfermedad, y lo mas importante es que en este estudio, trabajamos únicamente sobre la mortalidad presentada en la cuenca, esto es un factor importante sobre los resultados arrojados por este estudio, ya que las investigaciones realizadas en otros países, van dirigidas a ésta enfermedad, tal es el caso, que se cuenta con antecedentes serológicos, se tiene bien ubicadas las zonas de prevalencia y trabajan únicamente sobre desecho de animales con signos clínicos, además que se tienen programas voluntarios de control, este tipo de factores son los que permiten que se obtengan resultados mas exactos y bien estimados de la enfermedad.^{52,53,54}

En México, se han realizado pocos estudios en bovinos relacionados con esta enfermedad, que abarquen los aspectos histopatológicos, bacteriológicos y de biología molecular, aunque si se han realizado, utilizando diagnósticos serológicos de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.¹⁶ En un estudio realizado por Aburto en 1987,⁴⁴ se estudiaron a 72 toros de lidia con edades promedio entre los 3.5 a 5 años, provenientes de estados como, Michoacán, Tlaxcala, Guanajuato, Edo de México y Nuevo León, en este estudio se encontró que 8 animales (11.1%) presentaron lesiones microscópicas compatibles con la paratuberculosis sin presentar signos clínicos de enfermedad, y mencionan que la válvula ileocecal y los linfonodos mesentéricos fueron los órganos con mas lesiones observables.⁴⁴

En 1987, González realizó el aislamiento de micobacterias a partir de ganglios linfáticos de 47 animales pertenecientes al CAIT, que presentaban lesiones granulomatosas, en este estudio se logro el aislamiento de 13 muestras lo que representó un porcentaje global del 27.65%, pero en ninguno de estos casos se logro el aislamiento de *Map* ya que no se utilizó el medio adecuado, utilizando como cultivo el medio de Stonebrink-Lesslie, lo cual no permitió el posible crecimiento de *Map*, ya que este necesita medios de cultivo especiales y la adición de micobactina J, con lo cual hubiese sido posible el aislamiento.⁵⁵ En este estudio se lograron aislar otro tipo de micobacterias como son *M. fortuitum* (2), *M. flavescens* (2), *M. phlei* (1), *M. chelonae* (1), *M. ulcerans* (1), *M. gordonae* (1) y *M. triviale* (1), además de estos lograron el cultivo de otros 4 casos, los cuales no fue posible identificar. Este trabajo es discutible debido a que ya se tenía presente la intención del aislamiento de micobacterias, pero no se utilizaron los medios adecuados para el aislamiento de especies con mayor impacto en la producción láctea como lo es *M. bovis*, *M. tuberculosis* y *M. avium* subsp *paratuberculosis*, también otro dato que este estudio no

revela, es el tipo de lesiones granulomatosas, ganglios linfáticos utilizados y lesiones macroscópicas de los animales muertos.⁵⁵

También realizamos el cultivo bacteriológico de las muestras con lesiones sugerentes a Ptb, en todas ellas se logró el crecimiento entre la semana 10 y la 16 coincidiendo con lo que menciona la literatura, que habla de las 8 a las 20 semanas.^{30,43} Esta diferencia en los tiempos de crecimiento se pudo deber a la cantidad de BAAR presentes en los órganos. El cultivo en este estudio se realizó a partir de animales que mostraban lesiones microscópicas sugerentes a Ptb en válvula ileocecal y linfonodo mesentérico con presencia de BAAR, aunque algunos autores mencionan que han logrado aislar la bacteria de animales sin lesiones microscópicas sugerentes de enfermedad.^{53,54} Además, se realizaron pruebas de biología molecular, en este caso, PCR IS900 y una PCR tipo específico con lo cual se confirma la presencia de *Map* en los tres animales y se identifica la variación genética de los aislamientos que, en este caso todos pertenecen al grupo C1, concordando con los estudios realizados en México, Chávez *et al* (2004)⁵⁶ en un estudio con caprinos del Valle de México, lograron la identificación en dos casos, determinando que ambos pertenecían al grupo C1, mencionando que es el tipo más común (74%) de los aislamientos estudiados tanto de origen europeo como de los Estados Unidos de América.⁵⁶ En el mismo año Estévez (2004)³⁴ realizó este tipo de estudios en otras especies como son ovinos y caprinos donde utilizaron iniciadores específicos para la IS900 y mencionan que se logró la identificación de 4 caprinos que se identificaron con el tipo C y 8 ovinos, estos identificándose con los tipos C (2) e I3 (4) así como combinaciones de ambos en un mismo individuo (2).³⁴

Como se mencionó anteriormente se logró evidenciar lesiones sugerentes a Ptb, en el 7.5 % de los casos, en todos ellos se pudo realizar el cultivo y evidenciar a *Map*, mostrando una relación directa con la prevalencia del 8.87% estimada en un estudio serológico con la misma población animal realizado un año antes, (Miranda. 2005)¹⁶ cabe mencionar que 2 muestras pertenecieron al estrato 2 (181 a 300 animales por establo) y 1 al estrato 3 (mas de 300 animales por establo). Es de destacar que en un 20% de los casos, no se pudo determinar o sugerir la causa de muerte ya que, algunos animales no presentaron lesiones macroscópicas sugerentes a alguna enfermedad en particular, presentaban avanzados cambios postmortem o simplemente se necesitaba realizar otro tipo de estudio

complementario, para poder dar un diagnóstico acertado. Además de los problemas que conlleva la enfermedad por sí misma, también predispone a otro tipo de enfermedades y síndromes, los cuales de forma indirecta pueden impactar en el pleno desarrollo de los animales como son la disminución en la producción láctea, la pobre condición corporal, el desecho prematuro, el gasto por tratamiento ineficiente a diarreas y el decomiso de órganos en rastro.^{17, 18}

Otro punto importante que se debe subrayar es la poca importancia que se da a la enfermedad por parte de las autoridades ya que otros países muestran las cuantiosas pérdidas por esta enfermedad y se tienen programas de control. En conclusión, la mayoría de los países han iniciado programas de control, para detener la propagación de la enfermedad, generar hatos y áreas libres de esta misma; sin embargo, uno de los mayores obstáculos en el control de la enfermedad, es la dificultad para identificar animales infectados subclínicamente, la poca información con que se cuenta en esta especie, y que las ordinarias medidas sanitarias para prevenir la introducción de enfermedades infecciosas en el hato, no son funcionales ante la paratuberculosis.²⁵

7. Referencias.

- 1.- Clarke CJ. The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and others species. J Comp Pathol 1997; 116:217-261.
- 2.- Corpa JM, Garrido J, Garcia-Marín JF and Perez V. Classification of lesions observed in natural cases of paratuberculosis in goats. J Comp Pathol 2000;122:255-265.
- 3.- Mainar-Jaime RC, Vazquez-Boland JA. Factors associated whit seroprevalence to *Mycobacterium paratuberculosis* in small ruminant farms in the Madrid region (Spain). Prev Vet Med 1998;34:317-327.
- 4.- Buergelt CD and Ginn PE. The histopathologic diagnosis of subclinical Johne's disease in North American Bison. Vet Microbiol 2000;77:325-331.
- 5.- Muskens J, Bakker D, de Boer J and van Keulen L. Paratuberculosis in sheep: Its possible role in the epidemiology of paratuberculosis in cattle. Vet Microbiol 2000;78:101-109.
- 6.- Wraight MD, McNeil J, Beggs DS, Greenall RK, Humphris TB, Irwin RJ, Jagoe SP et all. Compliance of Victorian dairy farmers whit current calf rearing recommendations for control John's disease. Vet Microbiol 2000;77: 429-442.
- 7.- Thorel MF, Krichevsky M, Levy-Frébault W. Numerical Taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. Bacteriology 1990; 40(30):254-260.
- 8.- Lingling Li, John P. Bannantine, Qing Zhang, Alongkorn Amonsin, Barbara J. May, David Alt, Nilanjana Banerji, Sagarika Kanjilal, and Vivek Kapur. The complete genome sequence of *Mycobacterium. Avium*. Subspecies. *paratuberculosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2005; 102(35): 12344–12349.
- 9.- Unzueta R J. Contribución de la enteritis paratuberculosa bovina en México. (Tesis de licenciatura). México.(DF). Facultad de Medicina Verinaria y Zootecnia. UNAM. 1936.
- 10.- Bustamante J. Detección de anticuerpos de *Mycobacterium paratuberculosis* por

medio de la prueba de fijación de complemento. (Tesis de licenciatura). México.(DF). Facultad de Medicina Verinaria y Zootecnia. UNAM.1974.

11.- Garibay V M. Prueba doble comparativa intradérmica de la tuberculina aviar y mamífera para identificación de reactores a *Mycobacterium paratuberculosis* en un hato de ovinos. (Tesis de licenciatura). México.(DF). Facultad de Medicina Verinaria y Zootecnia. UNAM 1974.

12.- Johnson-Ifearulundu Y., Kannene J.B., Lloyd J.W. Herd level economic analysis of the impact of Paratuberculosis on dairy herds. J Am Vet Med Assoc. 1999; 214: 218-262.

13.- Burrells C, Clarke CJ, Coltson A, Kay JM, Porter J, Little D et al. A study of immunological responses of sheep clinically-affected with paratuberculosis (John's disease). The relationship of blood, mesenteric lymph node and intestinal lymphocyte responses to gross and microscopic pathology. Vet Immunol Immunopathol 1998; 66: 343-358.

14.- Ott, SL., Pozos SJ., Wagner BA.. Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. Prev Vet Med. 1999 Jun 11;40(3-4):179-92.

15.- Collins, M.T. Clinical approach to control of bovine paratuberculosis. J Am Vet Med Assoc.1994;204:208-210

16.- Miranda B. MV. Evaluación del impacto económico de la paratuberculosis en ganado bovino lechero (sistema intensivo), en el Complejo Agropecuario Industrial Tizayuca, Hidalgo. (Tesis de maestría). México.(DF). Facultad de Medicina Verinaria y Zootecnia. UNAM. 2005.

17.- Benedictus G, Dijkhuizen AA y Stelwagen J. Economic losses due to paratuberculosis in dairy cattle. Vet Rec. 1987;121:142-146.

18.- Chiodini RJ, Van Kruiningen HJ y Merkal RS. Ruminant Paratuberculosis (John's disease): The current status and future prospects. Cornell Vet. 1984;74: 218-262.

19.- Macham, L.; Ratledge, C. and Nocton, J. Extracellular iron acquisition by mycobacteria: role of exochelins and evidence against the participation of mycobactin. Infect Immun. 1975;12: 1242-1251.

20.- Clarke, C. J. Paratuberculosis and molecular biology. Vet Journal.1997;153: 245-247.

21.-Bercovier, H. Molecular basis of pathogenicity in mycobacterial infections. Proceedings of the 5th Inter Colloq Paratuberculosis. 1997. USA.1997. p 5-29.

- 22.- Edwards, D Kirkpatrick C. H. The immunology of mycobacterial diseases. Am J Respir Dis. 1986;134: 1062-1071.
- 23.- Sweeney, R. Pathogenesis and immunology of paratuberculosis. Proceedings of the 5th Inter Colloq Paratuberculosis. 1997. USA. 1997. p 1-4.
- 24.- Chávez GG. Estudio comparativo de las lesiones y de la respuesta inmunológica observadas en corderos infectados experimentalmente con *Mycobacterium paratuberculosis* y *Mycobacterium avium* sp. *silvaticum*. (Tesis Doctoral.) Zaragoza (Aragón) España. Universidad de Zaragoza.1993.
- 25.- Olsen I. Sguoardóttir OG. Djónne B. Paratuberculosis with special reference to cattle a review. Vet. Quarterly 2002; 24 (1). Pp 12-28.
- 26.- Whitlock. RH, Buergelt C. preclinical and clinical manifestations of Paratuberculosis (including pathology) Vet Clin North Am . Food Animal Practice 1996; 12(2):345-356.
- 27.- Pérez V., García Marín JF., Badiola JJ. Description and classification of different types of lesion associated with natural paratuberculosis infection in sheep. J Comp. Path; 1996; 114:107-122.
- 28.- Domínguez M. Características anatomopatológicas, hallazgos bacteriológicos y respuesta inmune posteriores a un año de la inmunización de un rebaño caprino con antecedentes de paratuberculosis. (Tesis de maestría). México.(DF). Facultad de Medicina Verinaria y Zootecnia. UNAM. 2000.
- 29.- Hietala SK. The options in diagnosis ruminant paratuberculosis. Vet Med 1992; November:1122-1139.
- 30.- Collins MT. Diagnosis of paratuberculosis. Vet Clin North Am. Food. Animal. Practice 1996;12:357-371
- 31.- Colgrove GS., Thoen CO., Blackburn BO., Murphy CD. Paratuberculosis in cattle: a comparison of three serologic test with results of fecal culture. Vet. Microbiology 1989; 19:183-189.
- 32.- Yokomizo Y., Merkal RS., Lyle PAS. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine immunoglobulin G1 antibody to a protoplasmic antigen of *Mycobacterium paratuberculosis*. American J Vet Res 1983; 44(11):2205-2207.
- 33.- Whittington R. An overview of paratuberculosis diagnosis test. Proceedings of the seventh International Colloquium on Paratuberculosis. June 2002. Bilbao, Spain:2002.

p 131-135.

34.-Estevez DI. Identificación de aislamiento de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* en pequeños rumiantes de México mediante RFLP. (Tesis de maestría). México.(DF). Facultad de Medicina Verinaria y Zootecnia. UNAM. 2004.

35.- Collins. M.T. and B.Y. Zhao, Comparison of the commercial serum antibody ELISA, gamma-interferon test kit, and radiometric fecal culture for early diagnosis of paratuberculosis in experimentally infected Holstein calves In: R.J. Chiodini, M.T. Collins and E.O.E. Bassey, Editors, *Proceedings of the Fourth International Colloquium on Paratuberculosis* 1995. Rehoboth, MA, USA. 1995. p 67-76.

36.- Chiodini RJ, Van Kruinigen HJ. The prevalence of paratuberculosis in culled New England cattle. *Cornell Vet.* 1986;76: 91-104.

37.- Gunnarsson E y Fodstad FH. Analysis of antigens in *Mycobacterium paratuberculosis*. *Acta Vet Scand.* 1979;20:200-215.

38.- Damato JJ., Collins MT. Growth of *Mycobacterium paratuberculosis* in radiometric, Middlebrook and egg-based media. *Vet Microbiol.* 1990; 22:31-42.

39.- Morrison NE. Circumvention of the mycobactin of *Mycobacterium paratuberculosis*. *J Bacteriol.* 1965;89:762-769.

40.- Green E., Tizard M., Moss M., Thompson J., Winterbourne D. Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Cronhn's disease isolated of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Nucleic Acids Res.*1989;17(22):9063-9073.

41.- Pavlik I., Horvathova a., Dvorska L., Bartl J., Svastova P., Du Maine R., Rychlik I. Standardization of restriction fragment length polymorphism analysis for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *J. Microbiol. Met.* 1999;38(1-2):155-167.

42.- Collins DM., Gabric DM., De Lisle GW. Identification of two groups of *Mycobacterium. paratuberculosis* strains by restriction endonuclese analysis and DNA hibridization. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1591-1596.

43.- Ramírez C, Trigo E, Suárez F, Merkal R. Aislamiento e identificación de *Mycobacterium paratuberculosis* en México. *Téc. Pec. Méx.* 1979;36:74-75.

44.- Abúrto Fernández EM. Diagnóstico de paratuberculosis en toros lidiados en la plaza México durante los meses de octubre, noviembre y diciembre de 1987. (Tesis de licenciatura). México.(DF). Facultad de Medicina Verinaria y Zootecnia. UNAM 1987.

- 45.- Santillán FMA, Córdova LD. Guzmán RCC. López RJ. Rosado RMI. Mojarro FJF. Zermeño EA. Situación epidemiológica de la paratuberculosis en ganado bovino del estado de Guanajuato, México. Memorias de la XXXIX reunión anual de investigación pecuaria; 2003 Octubre 27-31. DF. México. 2003. p 37.
- 46.- Favila Humara LC. Detección de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* Mediante Hibridación *in situ* en secciones intestinales de rumiantes con paratuberculosis y Humanos con Enfermedad de Crohn. (Tesis de licenciatura). México.(DF). Facultad de Medicina Verinaria y Zootecnia. UNAM. 2004.
- 47.- García E. Modificaciones al sistema de clasificación climática de kopen. 2ª. Ed. México (DF); Facultad de Economía, UNAM, 1974.
- 48.- Collins M.D., De Zoete M., Cavaignae S.M. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Strains from Cattle and Sheep Can Be Distinguished by a PCR Test Based on a Novel DNA Sequence Difference. J Clin Microbiol. 2002 December; Vol. 40(12): pp.4760–4762.
- 49.- González H. Causas de desecho por problemas reproductivos en vacas de la raza Holstein de la Cuenca Lechera de Tizayuca Hidalgo. (Tesis de licenciatura). México.(DF). Facultad de Medicina Verinaria y Zootecnia. UNAM. 1980.
- 50.- Oble H. I. Análisis de las causas de mortalidad de bovinos adultos en el Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca Hidalgo, de 1980 a 1984. (Tesis de licenciatura). México.(DF). Facultad de Medicina Verinaria y Zootecnia. UNAM 1986.
- 51.- Bradford. P. Smith. Male Reproductive Disorders. In Large Animal Internal Medicine. 2a ed. Ed Mosby. 1996 p 1566-1576..
- 52.- Huda. A., Jensen. H.E. Comparison of Histopathology of Tissues and rectal contents, and interferon gamma and serum antibody responses for the Diagnosis of Bovine Paratuberculosis. J Comp Pat. 2003. Vol. 129 Issue 4. Pp 259-267.
- 53.- Gonzalez. J., Geije. M. V., Garcia-Pariente., Verna. A., Corpa. J. M., Reyes. L .E. et al Histopathological Classification of Lesions associated whit Natural Paratuberculosis infection. J Comp Pat. 2005; Vol.133 Issue 2-3:184-196.
- 54.- McKenna. S. L.B., Keefe. G. P., Barkema. H. W., McClure. J., VanLeeuwen. J. A., Hanna. P., et al. Cow-Level prevalence of Paratuberculosis in Culled Dairy Cows in Atlantic Cánada and Maine. J Dairy Sc. 2004; 87:3770-3777.

- 55.- González. L. aislamiento de micobacterias a partir de ganglios linfáticos y lesiones granulomatosas de bovinos DDP (+) en la cuenca lechera de Tizayuca. Hidalgo(Tesis de licenciatura). México.(DF). Facultad de Medicina Verinaria y Zootecnia. UNAM. 1987.
- 56.- Chávez GG., Trigo T. FJ., Svastova P., Pavlik I. Identificación del polimorfismo genético de aislamientos de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* de caprinos del Centro de México. Vet Méx. 2004;Vol 35 (1):75-82.

8. Anexos.

Anexo.1

Resultados de estudio anatómico-patológico.

Los resultados obtenidos en el estudio histopatológico demuestran que solo 3 animales de los 40 que se tomaron muestras, mostraron lesiones de enteritis y linfadenitis granulomatosas así como tinción positiva a Z-N al demostrar la presencia BAAR.

2.1 Vaca sin número, Establo 144, segundo parto. Mostró una condición corporal (CC) de 2.5. a la inspección postmortem, lo más relevante fue la impactación y presencia de contenido alimentario compacto y deshidratado, por lo que se sugirió como causa de muerte una impactación abomasal aguda. Sin embargo, al estudio histopatológico se observó a nivel del linfonodo mesentérico la presencia de macrófagos con relación a un vaso linfático indicativo de linfadenitis granulomatosa. con células gigantes en corteza en linfonodo mesentérico y una lesión granulomatosa en tejido linfoide infiltrado por linfocitos y macrófagos, esto en la válvula ileocecal. Con presencia de BAAR

2.2 Vaca número 836 del establo 149 con número de caso T04/11-1, (CC)1.5. Los únicos cambios que se apreciaron fueron discreto engrosamiento del ID y aumento de tamaño de linfonodos mesentéricos así como mineralización de la aorta. Al estudio histológico se encontró una mala conservación de intestino aunque se apreció infiltrado granulomatoso en la lámina propia y al ZN se observaron moderada cantidad de BAAR. En linfonodo mesentérico a nivel de la corteza se apreció una reacción granulomatosa con abundantes células gigantes con escasas micobacterias al ZN Ambas lesiones indicativas de enteritis granulomatosa y linfadenitis granulomatosa respectivamente.

2.3 Vaca 67 del establo 149 con número de caso T04/11-17, (CC) 2.4, con clostridiasis como causa de muerte. En el estudio histológico se observó infiltración linfocitaria con enteritis granulomatosa en válvula ileocecal y una escasa presencia de BAAR.

2.4 Vaca sin número, Establo 208, tercer parto. Con número de caso T04-11/A (CC) 2.4 con mastitis como causa de muerte; a la necropsia se observó inflamación de la glándula mamaria con exudado purulento, inflamación de linfonodos retromamarios y enrojecimiento de pezones. En el estudio histológico no se observaron lesiones sugestivas a paratuberculosis en los órganos seleccionados para el estudio.

2.5 Vaca 67. Establo 140. Tercer parto. Con numero de caso T04-11/C. (CC) 2.6, con causa de desecho de repetidora, a la necropsia se observaron los ovarios de tamaño normal y una ligeras adherencias en el endometrio, en el estudio histológico no se observaron lesiones granulomatosas o de otro tipo en los órganos seleccionados que en este caso fueron ciego y válvula ileocecal sugerentes a paratuberculosis.

2.6 Vaca 120 azul. Establo 125. Tercer parto, recién parida. Con numero de caso T04-11/D1 y T04-11/D2 (CC) 1.8, con lipidosis hepática como causa de muerte, a la necropsia las lesiones más aparentes fueron hepatomegalia con bordes redondeados, con un aspecto grasoso de color amarillo pálido y una consistencia friable que se deshacía al tacto. Al estudio histológico se observo una vacuolización discreta en hígado y sin lesiones en los órganos que nos interesan como válvula ileocecal y linfonodo mesentérico.

2.7 Vaca 60. Establo 147. Primer parto. Con numero de caso T04-11/E. (CC) 2.2 con causa de muerte de ahogamiento. A la necropsia se observo una abundante cantidad de agua en los pulmones y cambios autolíticos en los demás órganos ya que se refirió que la vaca había muerto atorada en el bebedero en la madrugada. Al estudio histológico se mostraron los órganos autolíticos.

2.8 Vaca 3216. Establo 183. Primer parto. Con numero de caso T04-11/F (CC) 1.8 con endotoxemia por retención de producto como causa de muerte. A la necropsia se encontró la presencia de un feto muerto a termino, el cual al ser parto gemelar no observaron la presencia de este, en la madre se observaron numerosas hemorragias y desgarre uterino, la madre llevo a la sala en un estado avanzado de descomposición y cambios autolíticos. Al estudio histológico no se observaron lesiones en los órganos seleccionados sugerentes a paratuberculosis.

2.9 Vaca 630. Establo 204. Cuarto parto. Con número de caso T04-11/G (CC) 3.2 con impactación ruminal como causa de muerte. A la necropsia se observó en el abomaso la presencia de abundante contenido alimenticio deshidratado y compacto, desprendimiento de mucosa abomasal y un ligero grado de deshidratación en el animal. Al estudio histológico solo se observó una ligera inflamación en el intestino delgado a nivel de íleon.

2.10 Vaca sin número. Establo 196. Cuarto parto. Con numero de caso T04-11/H (CC) 3.5 A la necropsia se observó la presencia de abundantes focos de necrosis caseosa en linfonodos mediastínicos y bronquiales así como abundantes abscesos tuberculosos por lo

cual se diagnosticó como causa de muerte tuberculosis. Al estudio histológico no se observaron lesiones compatibles con paratuberculosis de los órganos seleccionados.

2.11 Vaca 536. Establo 136. Segundo parto. Con número de caso T04-11/I (CC) 3.3 a la necropsia se observaron los pulmones severamente enrojecidos, hinchados y con presencia de fibrina y líquido seroso en bronquios y bronquiolos, la causa de muerte fue diagnosticado como edema pulmonar. Al estudio histopatológico no se evidenciaron lesiones sugerentes a paratuberculosis.

2.12 Vaca 700. Establo 149. Primer parto. Con número de caso T04-11/J (CC) 2.4 a la necropsia se observó a nivel de intestino, enrojecimiento de la mucosa, inflamación de submucosa con contenido intestinal acuoso de color amarillo y la presencia de abundante moco, por lo cual se diagnosticó una enteritis catarral como causa de muerte. Al estudio histológico se observó hiperemia, ligera infiltración de neutrófilos, linfocitos y macrófagos, en intestino delgado a nivel de íleon y sin lesiones sugerentes de enfermedad en válvula ileocecal.

2.13 Vaca c118. Establo 119. Cuarto parto. Con número de caso T04-11/K (CC) 3, a la necropsia se observaron múltiples abscesos y presencia de fibrina en pulmón, con presencia de inflamación en vías respiratorias altas, además de material espumoso en tráquea, en este caso la causa de muerte fue una neumonía abscedativa. Al estudio histológico no se observaron lesiones en los órganos seleccionados para evidenciar la presencia de paratuberculosis.

2.14 Vaca 200. Establo 158. Tercer parto. Con número de caso T04-11/L (CC) 3.1, al estudio postmortem se encontró la ruptura de las capas uterinas, presencia de sangre coagulada en útero con un olor fétido y abundante fibrina por lo cual se sugirió como causa de muerte un desgarramiento uterino. En el estudio histológico no se observaron lesiones sugestivas a paratuberculosis.

2.15 Vaquilla sin número asignado. Establo 198. Con número de caso T04-11/M (CC) 2.3 a la necropsia se encontró una dilatación y hipertrofia del ventrículo derecho aunque no se sugirió ninguna causa de muerte. Al estudio histológico no se observaron lesiones compatibles con paratuberculosis.

2.16 Vaca 542. Establo 194. Quinto parto. Con número de caso T04-11/N (CC) 3.7 al estudio postmortem se encontró dilatación excesiva del rumen con presencia de gas,

presencia de la línea timpánica en esófago con presencia de congestión y hemorragias equimóticas dando como resultado de la necropsia un timpanismo gaseoso agudo. Al estudio histológico se encontró autólisis de los órganos.

2.17 Vaca sin número. Establo 151. Con número de caso T04-11/O (CC) 3.3 al estudio postmortem se encontró la presencia de un alambre que llegó hasta el pericardio. En el saco pericárdico había la presencia de 2 a 3 litros de material fibrino-purulento, así como engrosamiento de la pared pericárdica, cabe mencionar que el alambre atravesó desde retículo hasta pericardio pasando por diafragma con lo cual se diagnosticó como causa de muerte una retículo-pericarditis traumática. En el estudio histológico no se encontraron lesiones sugerentes de paratuberculosis.

2.18 Vaca 823. Establo 194. Tercer parto. Con número de caso T04-11/P y T04-11/P1 (CC) 3.8 a la necropsia se encontró en abomaso úlceras perforantes con lesiones delimitadas con necrosis, hemorragias y engrosamiento de la pared abomasal, en intestino delgado se encontró la presencia de una gran cantidad de sangre digerida por lo cual se dio como causa de muerte una abomasitis ulcerativa. Al estudio histológico no se encontraron lesiones compatibles con paratuberculosis.

2.19 Vaca 51. Establo 117. Con número de caso T04-11/Q (CC) 3.1 al estudio postmortem se encontraron masas de color grisáceo de consistencia dura en intestino que ocluía parcialmente la luz de este y algunas de presentación difusa en peritoneo, por lo cual se dio como causa de muerte linfosarcoma visceral, además de que ya se tenía el antecedente de la presencia de esta patología en el estable. Al estudio histológico se observó un infiltrado leucocitario en submucosa con agregados eosinofílicos y macrófagos tanto en válvula ileocecal así como en linfonodo mesentérico.

2.20 Vaca 163. Establo 196. Con número de caso T04-11/R. En este caso se tomó la muestra por parte del encargado del área de necropsia y no se pudo obtener la causa de muerte, ni la condición corporal ya que este animal fue enviado a la sala de necropsias en día domingo y la necropsia fue hecha por el clínico encargado del estable en cuestión. Al estudio histológico se observó en válvula ileocecal un infiltrado por eosinófilos en lámina propia y en linfonodo mesentérico infiltración por eosinófilos en lámina propia y submucosa.

2.21 Vaca 268. Establo 200. Con numero de caso T04-11/T (CC) 3.8 al estudio postmortem se encontró protusión del útero con aumento de tamaño, edema e inflamación, cabe mencionar que el animal presentaba una anemia aguda por perdida de sangre por lo cual se dio como causa de muerte prolapso uterino y como lesión concomitante la hipovolemia. Al estudio histológico no se observaron lesiones compatibles con paratuberculosis.

2.22 Vaca sin número. Establo 158. Con número de caso T04-11/U (CC) 3.5 a la necropsia no se observaron lesiones en órganos pues el animal había sido sacrificado por infertilidad, ya que hasta la fecha de tres gestaciones, las tres habían terminado en abortos tempranos.

A la histología no se observaron lesiones sugerentes a paratuberculosis.

2.23 Vaca 956. Establo 209. Con numero de caso T04-11/V. En este caso tampoco se definió la causa de muerte ni la CC ya que se realizo la necropsia por parte del clínico en guardia en el fin de semana. Al estudio histológico se observaron células mononucleares en submucosa de válvula ileocecal.

2.24 Vaca 205. Establo 158. Segundo parto. Con numero de caso T04-11/W y T04-11/W1 (CC) 3.7 a la necropsia se observo en abomaso la torsión de este sobre el rumen, excesiva concentración de gas, formada por la fermentación del alimento y la incapacidad para ser liberado, acompañado de múltiples hemorragias equimóticas en la serosa del abomaso, con ligera presencia de fibrina, por lo cual se dio como causa de muerte una torsión de abomaso. Al estudio histológico no se observaron lesiones compatibles con paratuberculosis.

2.25 Vaca 904 Bco. Establo 183. Tercer parto. Con numero de caso T04-11/X (CC) 3.8 en el estudio postmortem se encontró en glándula mamaria grandes cavidades llenas de exudado purulento y pequeñas áreas de diferentes colores, también se observo reacción inflamatoria alrededor del conducto galactóforo y la cisterna de la leche. La lesión se presento de forma bilateral asimétrica, los linfonodos retromamarios y supramarios se encontraban inflamados y aumentados de tamaño. Al estudio histológico no se encontraron lesiones compatibles con paratuberculosis.

2.26 Vaca 762 ama. Establo 165. Quinto parto. Con numero de caso T04-11/Y (CC) 2.8

A la necropsia se encontró que los órganos se localizaban en buen estado y sin lesiones aparentes, solo en el miembro posterior derecho se encontraron abscesos en el espacio interdigital con presencia de material necrótico y olor fétido, además de un ligero

desprendimiento de la capa cornea de los cascos, por lo cual se refirió como causa sacrificio una pododermatitis bacteriana. Al estudio histológico no se encontraron lesiones que sugirieran la presencia de la enfermedad.

2.27 Vaca sin número. Establo 184. Con numero de caso T04-11/3 y T04-11/3a (CC) 3.5 al estudio postmortem se encontró en músculo cardiaco inflamación, edema y áreas con abundantes abscesos localizados, por lo cual se sugirió la causa de muerte como una miocarditis abscedativa. Al estudio histológico se observó una infiltración por eosinófilos, linfocitos y células cebadas en submucosa de linfonodos mesentéricos y necrosis en centros germinales en válvula ileocecal.

2.28 Vaca 366. Establo 209. Segundo parto. Con numero de caso T04-11/4 (CC) 3.1 al estudio postmortem se encontró la perforación del hígado por un alambre en este órgano se localizaron abscesos multifocales con presencia de material caseoso de color verde olivo, infartos de color blanco y hemorragias, en retículo se localizó el origen del alambre, además de desprendimiento de la mucosa y la presencia de material sanguinolento en gran cantidad, por lo cual se dio como causa de muerte una retículo-hepatitis traumática. En el estudio histológico se encontró en válvula ileocecal hemorragia y necrosis, además de tejido de granulación, edema en submucosa y la presencia de un parásito el cual no fue identificado.

2.29 Vaca 329. Establo 204. Tercer parto. Con numero de caso T04-11/5 (CC) 4.1 en el estudio postmortem se recibió a la vaca todavía con el útero prolapsado, al hacer la inspección se encontró una importante movilización de grasas en el peritoneo y se refirió que el animal había sido sacrificado, por las pocas posibilidades de volver a quedar gestante y la baja producción láctea sostenida por la vaca en lactaciones anteriores al estudio histológico no se encontraron lesiones sugerentes de paratuberculosis.

2.30 Vaca 1429. Establo 196. Segundo parto. Con número de caso T04-11/6 (CC) 3.8 al estudio postmortem solo se encontró que “la vaca se había partido” esto es por la ruptura de los ligamentos pélvicos al momento de la parición y la vaca ya no se pudo parar por lo cual fue desechada. Al estudio histológico se encontró en ciego infiltración por eosinófilos, linfocitos y células plasmáticas en mucosa y submucosa.

2.31 Vaca 528. Establo 182. Tercer parto. Con número de caso T04-11/7 (CC) 3.3 al estudio postmortem se encontró en el aparato reproductor un quiste tubo-ovárico,

distensión del oviducto con presencia de líquido y múltiples adherencias en la serosa uterina, por lo cual no se estableció una causa de muerte precisa ya que varios factores estaban involucrados. Al estudio histológico se encontró infiltración por eosinófilos en linfonodo mesentérico y válvula ileocecal aunque ninguna de las lesiones fueron sugerentes de paratuberculosis.

2.32 Vaca 698. Establo 117. Cuarto parto. Con numero de caso T04-11/8 (CC) 1.8 al estudio postmortem solo se encontró una condición corporal muy pobre por lo cual no era apta para entrar a un programa de sincronización ya que el animal tenía así ya varios meses y no ganaba peso por lo cual fue desechada de la cuenca. En el estudio histológico no se encontraron lesiones sugerentes de paratuberculosis.

2.33 Vaca c 40 ama. Establo 119. Segundo parto. Con numero de caso T04-11/9 (CC) 3.2 al estudio postmortem se encontró el útero con gran cantidad de material purulento aproximadamente 10 a 12 litros, en la mucosa uterina se observaron grumos de este mismo material, con presencia de tejido placentario. En el estudio histológico no se observaron lesiones compatibles con paratuberculosis.

2.34 Vaca 112. Establo 134. Con numero de caso T04-11/10. En este caso no fue posible observar las lesiones macroscópicas ya que el animal fue enviado a la sala de necropsias después del horario que generalmente se utilizaba para esperar la llegada de los animales y solo se nos fue reportada la causa de muerte por el patólogo que realizó la necropsia, la cual fue dada como trombosis séptica de vena cava posterior.

Al estudio histológico no se encontraron lesiones sugerentes de paratuberculosis.

2.35 Vaca 344. Establo 200. Segundo parto. Con número de caso T04-11/11 (CC) 3.6 al estudio postmortem se encontró presencia de material alimenticio de color negro, con gran cantidad de líquido, coloración negruzca de mucosa ruminal además de grandes zonas de desprendimiento de la mucosa, con lo cual se sugirió como causa de muerte una acidosis ruminal aguda. Al estudio histológico se observó infiltrado linfocitario y células plasmáticas alrededor de vasos linfáticos y edema en submucosa de válvula ileocecal.

2.36 Vaca 475. Establo 117. Tercer parto. Con numero de caso T04-11/12 (CC) 3.4 en el estudio postmortem se observaron lesiones abscedativas con una distribución multifocal en los pulmones con un diámetro, que oscilaba entre los 5 milímetros hasta los 3 centímetros, además de una ligera pleuritis fibrinosa, lesiones por las cuales se dio como causa de

muerte una neumonía trombo-embólica. Al estudio histológico solo se logro observar en el ileon una infiltración linfocitaria en submucosa, linfocitos y células plasmáticas en lámina propia.

2.37 Becerra sin número asignado. Establo 189. Con numero de caso T04-11/13 (CC) 2.5 al estudio postmortem solo se observo una ligera necrosis de bronquial con presencia de agua por lo cual se dio como causa de muerte ahogamiento, esto pudo haberse dado por el hacinamiento que existe en el área de recría. Al estudio histológico no se observaron lesiones sugerentes a la paratuberculosis.

2.38 Vaca 392. Establo 182. Tercer parto. Con numero de caso T04-11/14 (CC) 3 al estudio postmortem se observo la perforación del saco pericárdico así como del miocardio y del diafragma por parte de un alambre que provenía del retículo, en el miocardio se observo una miocarditis abscedativa, en saco pericárdico adherencias y engrosamiento, así como la presencia de material sanguinolento en poca cantidad, en el retículo solo se observaron hemorragias equimóticas por lo cual se diagnostico la causa de muerte como una retículo-miocarditis traumática y miocarditis abscedativa. Al estudio histológico se observó infiltrado eosinofilico en lámina propia de válvula ileocecal.

2.39 Vaca 731. Establo 165. Segundo parto. Con numero de caso T04-11/15 (CC) 3.5 en la necropsia se pudo observar una movilización masiva de la grasa en peritoneo, en el hígado un color amarillo pálido con una marcada brillantes de este, al tacto se mostraba friable y aumentado de tamaño. Al estudio histológico no se observaron lesiones sugestivas a paratuberculosis.

2.40 Vaca 503. Establo 153. Con numero de caso T04-11/16. En este caso no fue posible observar las lesiones macroscópicas ya que la muestra fue tomada por el encargado de la sala de necropsias y no fue posible obtener la causa de muerte. Al estudio histológico se observo un infiltrado moderado de eosinófilos en válvula ileocecal.

Anexo. 2

Resultados de estudio histológico.

3.1 Vaca sin número, Establo 144, con número de caso T04-11/S al estudio histopatológico se observó a nivel del linfonodo mesentérico la presencia de macrófagos con relación a un vaso linfático indicativo de linfadenitis granulomatosa con células gigantes en corteza en linfonodo mesentérico y una lesión granulomatosa en tejido linfoide infiltrado por linfocitos y macrófagos, esto en la válvula ileocecal. Con presencia de BAAR.

3.2 Vaca número 836 del establo 149 con número de caso T04-11/1. Al estudio histológico se encontró una mala conservación de intestino aunque se apreció infiltrado granulomatoso en la lámina propia y al Z-N se observó moderada cantidad de BAAR. En linfonodo mesentérico a nivel de la corteza se apreció una reacción granulomatosa con abundantes células gigantes y escasas micobacterias al Z-N. Ambas lesiones indicativas de enteritis granulomatosa y linfadenitis granulomatosa respectivamente.

3.3 Vaca 67 del establo 149 con numero de caso T04/11-17. En el estudio histológico se observo infiltración linfocitaria con enteritis granulomatosa en válvula ileocecal y una escasa presencia de BAAR.

3.4 Vaca 120 azul, del establo 125, con número de caso T04-11/D en el estudio histológico solo se observo vacuolización discreta del hígado.