



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA

**ATLAS ANATOMOPATOLÓGICO DE PARATUBERCULOSIS
EN RUMIANTES.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

AZAF MORENO TORRES

Asesores:

Dr. Gilberto Chávez Gris

M. en C. Edith Maldonado Castro



México, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Dedicatoria

- A mi Mamá: María Elizabeth Torres Alfaro y a Papá: Juan Carlos Moreno Constantino por su apoyo incondicional durante toda mi formación personal y profesional.
- A mi hermano Carlos porque siempre me preguntas y aprendemos juntos.
- A Stephanie, porque siempre estás en los buenos y malos momentos conmigo, no me dejas caer y gracias a ti he logrado muchas cosas. Te amo.
- A mi abuelita, Ascención Alfaro Vera † por compartirme desde pequeño su sentido del cuidado hacia los animales y su importancia para la vida de las personas. A mi abuelito, Santiago Torres González por contarme todas esas historias que me incitaron a tomar este camino profesional.
- A mi Tío Memo † porque siempre fuiste un gran ejemplo a seguir tanto personalmente como profesionalmente.
- A mi demás familia por su apoyo moral.
- A mis amigos, que siempre hemos tenido la curiosidad de saber nuestros destinos aunque los caminos que tomamos son distintos y aún así me brindan su grandioso apoyo moral y económico en cierta medida. Ustedes saben quienes son...
- A mi “zoológico personal”, que también gracias a ellos me interesé en esta carrera:
Gatos: Takito †, Puppet †, Bati †, Maruja, Timmy, Sabrina, Clemencia, Tobi, Dante
Perros: Rambo †, Pelusa, Orion
Y al sinfín de hámsteres, peces, tortugas, ranas y periquitos australianos propios y ajenos que han estado a mi cuidado durante toda mi vida. Gracias a todos ustedes por brindarme su invaluable compañía.
- A todos los animales vivos que fueron útiles en el aprendizaje durante toda mi formación profesional y a los cadáveres que he diseccionado y tomado muestras, son grandes maestros.
- Y finalmente: A todos los incrédulos, envidiosos, y demás gente nociva que he encontrado en el camino: Aquí está mi trabajo, y por sí mismo habla de un gran esfuerzo conjunto que sin los que me quieren y aprecian nunca lo hubiese logrado...

Agradecimientos

- A mis asesores Dr. Gilberto Chávez Gris y a la M. en C. Edith Maldonado Castro por permitirme realizar el trabajo de tesis bajo su asesoría. Agradezco sus enseñanzas, consejos, tiempo invertido y apoyo.
- Este proyecto fue financiado por el proyecto PAPIIT IT225211-3 “**Desarrollo de Sistemas para el Diagnóstico en Suero y Leche en Rumiantes Afectado por Paratuberculosis**”
- A los miembros del jurado: Dra. Elizabeth Morales Salinas, Mtro. Adolfo Kunio Yabuta Osorio, Mtro. Gerardo Salas Garrido y MVZ Epa. Filemón Cruz Ceballos por los puntos de vista y consejos otorgados para la realización de esta tesis.
- Al Sr. Jaime Eugenio Córdova por su apoyo en la toma de fotografías y fotomicrografías del material antiguo y nuevo, su edición y corrección digital.
- A los compañeros egresados de licenciatura: Erika Torres Ramos, Isabel Estévez Denaires, egresada de maestría Victoria Elizabeth Castrellón Ahumada, cursando maestría en este momento: Jacqueline López Yurame, Sergio I. Vázquez Arvizu, de Servicio Social Aída Olguín Barrera y tesista de licenciatura Raúl Armando Reséndiz Pozos por el apoyo con la toma de algunas fotos, fotomicrografías, organización y consejos para la realización del presente trabajo.
- Al Dr. Alejandro De la Peña Moctezuma, MVZ Mario Hidalgo Ruiz y a la MVZ Ana Lilia Villegas Vázquez por sus enseñanzas y sus valiosos consejos de trabajo.
- Al macroproyecto de CONACYT— INIFAP **Detección de causas de infertilidad en ganado bovino lechero en México** coordinado por la Dra. Laura Hernández Andrade por haberme brindado mi primer empleo en el área de diagnóstico.
- A la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por brindarme muchas herramientas para obtener conocimiento de diversas áreas de la salud animal durante la licenciatura, y por permitirme culminar mis estudios de licenciatura.

- A la Unidad de Servicios de Diagnóstico y Constatación del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en el Altiplano de la FMVZ-UNAM y al Departamento de Patología de la FMVZ-UNAM por las facilidades otorgadas para la realización del presente trabajo.
- Al Dr. Fernando Paolicchi, quien amablemente proporcionó las fotos de lesiones de paratuberculosis en ciervo.



Miembros del equipo de trabajo: (De izquierda a derecha, fila inferior): MVZ Verónica Blásquez Vázquez, MVZ Jacqueline López Yurame, M. en C. Edith Maldonado Castro, Dr. Gilberto Chávez Gris, MVZ Érika Torres Ramos, pMVZ Aída Olguín Barrera (De izquierda a derecha, fila superior): MVZ Sergio I. Vázquez Arvizu, pMVZ Rodrigo Antonio Ordoñez Pérez, pMVZ Azaf Moreno Torres, pMVZ Raúl Reséndiz Pozos.

CONTENIDO

Resumen.....	1
Introducción.....	2
Diagnóstico anatomopatológico	
Diagnóstico Macroscópico.....	6
Diagnóstico Microscópico.....	23
Inmunohistoquímica.....	37
Aislamiento Bacteriológico.....	40
Diagnóstico Serológico	
ELISA.....	43
Inmunodifusión en Gel de Agar.....	46
Diagnóstico Molecular	
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	47
Análisis de Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP).....	49
Revisión Sistemática.....	51
Análisis de la Información.....	52
Abreviaturas.....	57
Apéndice.....	58
Referencias Bibliográficas.....	79

Índice de imágenes

Imagen	Página
Figura 1. Esquema de la estructura de la pared celular de las micobacterias. A: Ácidos grasos de cadena corta. B: Ácidos grasos de cadena larga. C: Lipoarabinomanano. D: Micolato. E: Arabinogalactano. F: Peptidoglicano. G: Mánósidos de fosfatidilinositol. H: Membrana celular.2
Figura 2. Mapa de distribución de paratuberculosis en México 2004-20093
Figura 3. Toro de lidia con diarrea asociada a PTB.4
Figura 4. Vaca con edema submandibular , signo presente en PTB.4
Figura 5. A) Ingreso de MAP a través de leche o queso contaminado B) es ingerido C) produciendo la Enfermedad de Crohn, afectando intestino delgado y grueso.5
Figura 6. Animales emaciados por PTB A) Oveja pelibuey, B) Cierva [Cortesía Dr. Fernando Paolicchi], C) Cabra alpino francesa6
Figura 7. Inspección de intestino delgado7
Figura 8. La inspección de intestino delgado y grueso debe realizarse en el siguiente orden: (1) Válvula ileocecal a partir del ciego (2). Linfonodos mesentéricos, en busca de aumento de tamaño y/o fusión (3). Íleon (3). (4) Yeyuno. Finalmente debe inspeccionarse duodeno, que es la estructura intestinal que tiene al páncreas adyacente. Este tipo de inspección se realiza invaria-7
Figura 9. Edema en intestino delgado. Obsérvese la prominencia de los vasos sanguíneos y linfáticos. (Flechas) así como degeneración de grasa mesentérica, observable con un aspecto húmedo. (Círculo)10
Figura 10. Linfangiectasia moderada en intestino delgado (Flecha)10
Figura 11. Vasos linfáticos tortuosos, sugerente a Linfangitis y linfangiectasia de moderadas a graves. Obsérvense los vasos linfáticos no afectados (Flechas delgadas) en comparación con vasos engrosados y aumentados de10
Figura 12. Obsérvese el aspecto brillante de la capa serosa donde existe linfangiectasia (Círculo) y el mesenterio edematoso (Flecha)11

Imagen	Página
Figura 13. Edema y linfangiectasia grave en mesenterio (Flecha) e intestino delgado. Obsérvese la prominencia de los vasos linfáticos.	11
Figura 14. Separación de ciego para inspección y toma de muestras para histopatología	12
Figura 15. Separación de válvula ileocecal para inspección y toma de muestra para histopatología	12
Figura 16. Ciego engrosado . Es perceptible el engrosamiento de mucosa sin realizar la apertura del órgano (Línea). Obsérvese también el linfonodo ileocecal aumentado de tamaño (Flecha). Para referencia de órgano normal, ver figura	12
Figura 17. Válvula ileocecal (Círculo) y ciego con engrosamiento de la mucosa, que se observa con aspecto corrugado.	13
Figura 18. Se observa aumento de tamaño de linfonodos mesentéricos (1).	13
Figura 19. Extracción de linfonodo aumentado de tamaño para su estudio histopatológico	14
Figura 20. Fusión de linfonodos mesentéricos (Flecha)	14
Figura 21. Linfadenomegalia y fusión de linfonodos mesentéricos con presentación grave (Flechas)	14
Figura 22. Corte longitudinal de linfonodo mesentérico de cabra con reactividad asociada a lesión granulomatosa así como calcificación de la zona cortical (Flechas)	15
Figura 23. Linfonodos de ciervo cortados longitudinalmente donde se muestra calcificación de la zona cortical (Flechas). [Cortesía Dr. Fernando Paolicchi]	15
Figura 24. Engrosamiento a lo largo del intestino debido a la mucosa afectada, perceptible sin realizar la apertura del órgano. (*)	16
Figura 25. Engrosamiento segmental de la mucosa ileal perceptible aún sin la apertura del intestino (Línea)	16
Figura 26. Engrosamiento de la mucosa intestinal en intestino de oveja. Se observa en (a) con aspecto difuso y (b) zonal.	17
Figura 27. Engrosamiento de la mucosa intestinal con presentación zonal. (Rectángulo).	17
Figura 28. Engrosamiento de la mucosa intestinal con presentación zonal.	18
Figura 29. Engrosamiento de la mucosa intestinal a nivel de íleon con presentación difusa	18

Imagen	Página
Figura 30. Engrosamiento de la mucosa intestinal con presentación difusa	18
Figura 31. A) Intestino de cabra con engrosamiento de mucosa , conservado al estirar la porción de órgano. B) Intestino congestionado , mismo que pierde el aspecto corrugado al estirar la porción de órgano.	18
Figura 32. Obsérvese el borde antimesentérico de una sección de íleon de una oveja joven (óvalo). Se observa turgente, ligeramente blanquecino y granular. Esto corresponde al tejido linfoide asociado a íleon	19
Figura 33. A la apertura del intestino de oveja joven observamos el tejido linfoide asociado a íleon . Éste se observa en el borde antimesentérico, la mucosa se observa normal en el borde mesentérico. No confundir con engrosamientos causados por PTB.	19
Figura 34. Caso de paratuberculosis con necrosis intestinal , asociada con <i>Escherichia coli</i>	20
Figura 35. Además de la mucosa del ciego engrosada , lo cual es sugerente de PTB se pueden apreciar <i>Trichuris ovis</i> (Pinzas) causando alta producción de moco y lesiones hemorrágicas	20
Figura 36. Porción de intestino delgado de un cabrito con engrosamiento nodular en la mucosa, se descarta paratuberculosis debido a la edad de presentación del cuadro clínico.	20
Figura 37. Ovino (Izquierda) que presenta un absceso en linfonodo submandibular , probablemente causado por <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	21
Figura 38. Abscesos hepáticos causados por <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	22
Figura 39. Corte histológico de intestino, donde puede apreciarse acúmulo de macrófagos (Lesión granulomatosa). Tinción H-E, 100 aumentos	23
Figura 40 . Se observan macrófagos con núcleo excéntrico, denominados células epitelioides (Flecha). Tinción H-E, 400 aumentos	23
Figura 41. Células gigantes (Flechas) Tinción H-E. 1000 aumentos	24
Figura 42. Corte histológico de intestino delgado, donde se observan macrófagos en lámina propia. (Flecha) Tinción H-E, 400 aumentos.	24
Figura 43a. Corte histológico donde se observa vaso linfático con macrófagos en su interior (1), linfangitis granulomatosa y (2), edema en capa serosa del intestino delgado , en (a), tinción H-E, 100 aumentos. Figura 43b. Detalle de la imagen 43a donde en (1) se observan macrófagos en el interior de la luz y (2) células mononucleares en la periferia del vaso linfático . Tinción H-E, 400 aumentos.	25
Figura 44. Macrófagos presentes en linfonodo . Tinción H-E, 400 aumentos. Se muestra el acercamiento de un macrófago con pocos BAAR en su interior con tinción Z-N a 1000 aumentos.	25

Imagen	Página
Figura 45. BAAR (Flecha) observados dentro de macrófagos. Tinción de Ziehl-Neelsen. 400 aumentos26
Figura 46. BAAR. Se observan intracelulares o adyacentes a los macrófagos, de color rojo o ligeramente rosas. Tinción de Ziehl-Neelsen. 100 aumentos26
Figura 47. Coccidias engrosando las vellosidades intestinales (Flechas). Obsérvese en las demás vellosidades la presencia de oocistos (Tinción H-E, 100 aumentos). El recuadro indica aumento de la sección señalada con flechas a 400 aumentos.35
Figura 48. Coccidias del género <i>Eimeria</i> spp. afectando las criptas intestinales. <i>Eimeria</i> presenta 4 ooquistes con 2 esporozoítos [Círculo] Tinción H-E, 400 aumentos.35
Figura 49. Esquizogonia de <i>Eimeria</i> spp alojada en submucosa, en tinción H-E y distintos aumentos: (1) [Flecha] 100 aumentos (2) gametos a 1000 aumentos36
Figura 50. Macrófagos marcados con antilisozima en segmento interfoliular (Flecha). Dilución 1:100. Técnica ABC (Avidin-Biotin-Complex). 400 aumentos.38
Figura 51. Macrófagos en mucosa y lámina propia (Marrón) marcados con IL-10 en dilución 1:50. Técnica ABC (Avidin-Biotin-Complex). 100 aumentos. Se presenta un detalle en 400 aumentos para demostrar la presencia de macrófagos marcados.38
Figura 52. Células epitelioides (Asteriscos) marcadas con Anti-P35 en dilución 1:100. Técnica ABC (Avidin-Biotin-Complex). 400 aumentos39
Figura 53. Células epitelioides, que se observan de color marrón marcadas con iNOS en dilución 1:200. Técnica ABC (Avidin-Biotin-Complex). 400 aumentos39
Figura 54. Medio Löwenstein—Jensen con varias colonias de MAP (óvalos).40
Figura 55. Medio Löwenstein—Jensen con algunas colonias de MAP (Círculo)40
Figura 56. Medio Löwenstein— Jensen identificado con el número de la muestra del animal correspondiente y fecha de siembra, dicha muestra fue positiva a PTB en pruebas diagnósticas complementarias como ELISA y PCR. El desarrollo bacteriano se llevó a cabo en el fondo del medio, observándose como puntilleo blanco (Círculos).41
Figura 57. BAAR agrupados sugerentes a MAP tomados a partir de cultivo. En los círculos se observan acúmulos de BAAR causados por el factor de acordonamiento, mismo que es descrito más adelante. Tinción Ziehl – Neelsen.1000 aumentos.41
Figura 58. Raspado de mucosa intestinal realizado post-mortem con BAAR dispuestos en acúmulos (Flecha). Tinción Z-N. 1000 aumentos.42
Figura 59. Raspado de mucosa intestinal realizado post-mortem con BAAR. Se observan en acúmulos. Tinción Z-N 1000 aumentos.42

Imagen	Página
Figura 60. Prueba de ELISA en placa de fondo plano de 96 pozos. Puede observarse en A: Testigo positivo B: Testigo negativo C: Testigo Blanco y D: Muestras sospechosas con resultado positivo.44
Figura 61. Lector de ELISA. Espectrofotómetro donde se realiza la lectura de la prueba.44
Figura 62. Placa de ELISA ingresando al lector automatizado para su lectura.45
Figura 63. Lector de ELISA conectado a una computadora. Los resultados son expresados en Densidades ópticas, los cuales son arrojados en una base de datos con la utilización de un software.45
Figura 64. IDGA positiva (Círculo), donde las líneas de complejos antígeno-anticuerpo se observan de color blanco (Flechas rojas). A) testigos positivos, B) testigos negativos, C) sueros problema. Al centro, el pozo donde se coloca el antígeno.46
Figura 65. Fotografía de gel de agarosa al 1%, donde se observan productos de amplificación mediante PCR para la detección de MAP. MPM: Marcador de peso molecular 100pb	
Carril 1. Muestra 1 donde se ven fragmentos de amplificación mediante PCR que corresponden a un producto de 310 pb que corresponde a la cepa tipo “C” y a su vez también se amplifica un producto de 164 pb considerada como cepa “S” y/o “I” al utilizar iniciadores de tipo específico.48
Carril 2. Muestra 2 donde se observa un producto de amplificación mediante PCR utilizando los iniciadores de tipo específico donde el producto obtenido de 310 pb corresponde a la cepa de tipo “C”.	
Figura 66. RFLP usando ADN de Map, basado en la secuencia IS900 digerida con la endonucleasa <i>BstEII</i> de ADN de Map. Los tipos de RFLP encontrados son: C1, C33, I3, C1/I3, C18 y C18/I3.49
Figura 67. Hay que evitar usar los corrales como estercoleros y favorecer la limpieza de éstos.52
Figura 68. Semental ovino en exhibición y cabra amamantando, con una condición corporal adecuada, que podrían tener paratuberculosis de manera subclínica.55

Índice de cuadros

Cuadro	Página
Cuadro 1. Secuencia de examen macroscópico y obtención de muestras de intestino para histopatología	8
Cuadro 2. Clasificación de lesiones microscópicas de paratuberculosis	27
Cuadro 3. Sensibilidad y especificidad de la prueba de ELISA para bovinos, ovinos y caprinos.	43
Cuadro 4. Días empleados en la obtención de resultados y costos de las pruebas complementarias para MAP	50

Resumen

MORENO TORRES AZAF. Atlas anatomopatológico de paratuberculosis en rumiantes. (Bajo la dirección del MVZ, Dr. Gilberto Chávez Gris y la MVZ, M. en C. Edith Maldonado Castro)

El presente trabajo pretende ser una herramienta principalmente visual que facilite la comprensión del diagnóstico de la paratuberculosis para Médicos Veterinarios Zootecnistas, estudiantes, técnicos de laboratorio y productores, ya que no existen publicaciones en el ámbito nacional y son escasos los trabajos internacionales que aborden solamente a la paratuberculosis. Se describe al agente causal *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, los signos característicos de la enfermedad como la emaciación, edema submandibular como en cavidades, que lo hacen indiferenciable a simple vista con otras enfermedades; así como su impacto tanto económico como en la salud pública. Se describen los hallazgos anatomopatológicos macroscópicos y microscópicos característicos como son la enteritis y linfadenitis granulomatosas. También se muestran las eventuales complicaciones con otros procesos infecciosos, su diagnóstico diferencial como coccidiosis. Se muestran las características histológicas de la enteritis granulomatosa con la participación de macrófagos, linfocitos y células gigantes, hallazgos compatibles con inflamación crónica. Se presentan tinciones de Ziehl-Neelsen para observar bacilos ácido-alcohol resistentes, así como la clasificación histopatológica de las lesiones de PTB y otras pruebas diagnósticas de PTB como son aislamiento bacteriológico, ELISA, IDGA y PCR, indicando su sensibilidad y especificidad, como ventajas y desventajas. Se menciona la situación de PTB en México.

Las imágenes fueron obtenidas del acervo del Dr. Gilberto Chávez Gris, que data de hace 20 años. La información complementaria proviene de fuentes bibliográficas como son libros y artículos científicos así como de medios electrónicos.

Introducción

La paratuberculosis (PTB) o enfermedad de Johne es un proceso infeccioso causado por *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (MAP), es un bacilo ácido alcohol resistente (BAAR) y la ácido alcohol resistencia tanto de MAP como de otras micobacterias es debida a la presencia de pared compuesta por lipoarabinomanano, ácidos micólicos, arabinogalactano y ácidos grasos de cadena larga¹, que también brindan resistencia al ambiente, asegurando la supervivencia a enzimas de los macrófagos y esto les proporciona la facultad de convertirse en bacterias intracelulares. (Figura 1)

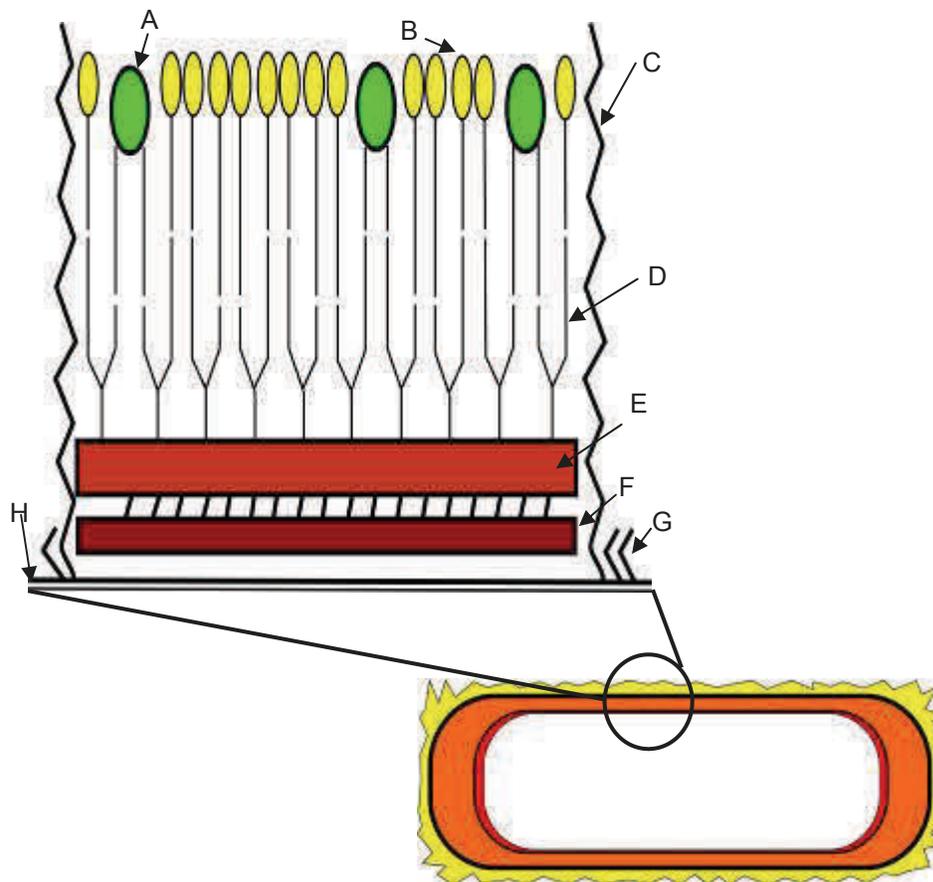


Figura 1. **Esquema de la estructura de la pared celular de las micobacterias.** A: Ácidos grasos de cadena corta. B: Ácidos grasos de cadena larga. C: Lipoarabinomanano. D: Micolato. E: Arabinogalactano. F: Peptidoglicano. G: Mánósidos de fosfatidilinositol. H: Membrana celular.

La distribución de la enfermedad es mundial y está presente en México (Figura 2). La infección es muy común en rumiantes tanto domésticos como silvestres, así como en no rumiantes de vida silvestre, tales como comadrejas, conejos, liebres, osos, zorros, entre otros².

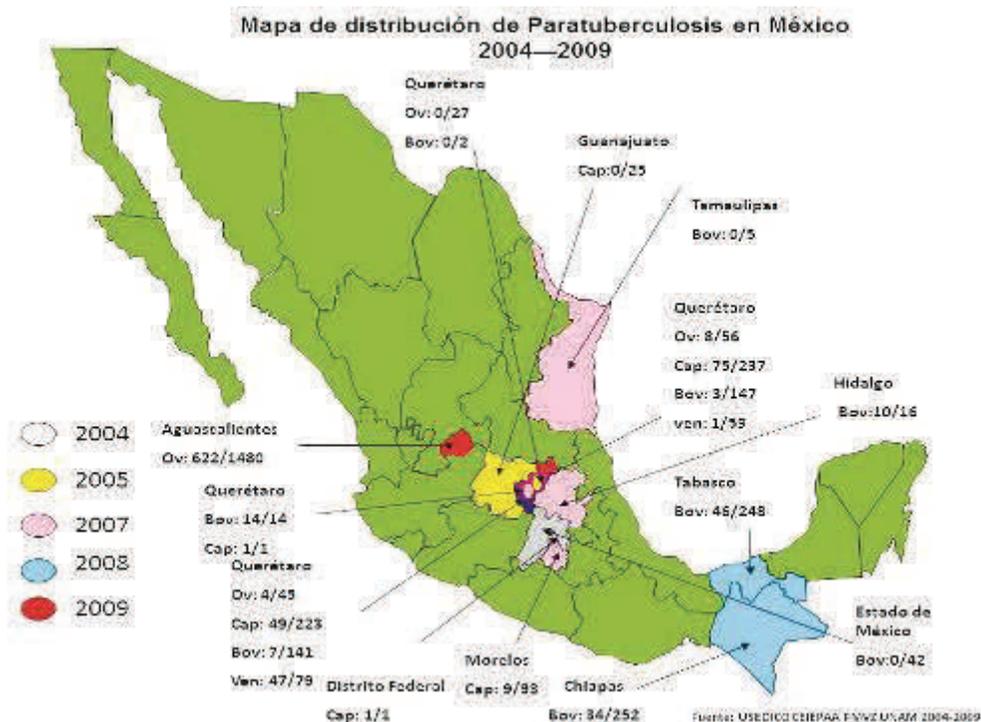


Figura 2. Mapa de distribución de paratuberculosis en México 2004-2009

En el cuadro clínico clásico de PTB se presenta un engrosamiento de la mucosa intestinal debida a una enteritis granulomatosa. MAP puede estar presente en heces, orina, leche, semen e incluso atravesar la barrera placentaria³ tanto en animales que presentan clínicamente la enfermedad, como en animales que la presentan de manera subclínica. El contagio se presenta por ingestión de alimentos contaminados con heces que tienen el microorganismo. Existe una mayor susceptibilidad a la infección es en los primeros días de vida³, sin embargo, los signos clínicos de la enfermedad se presentan hasta después de

los dos años de vida ⁴.

Los animales afectados por PTB presentan pérdida de peso debido a la pérdida progresiva de masa muscular y atrofia de tejido adiposo produciendo una condición corporal deficiente; otro signo característico es la diarrea intermitente (Figura 3), causada por la inflamación del intestino. Sin embargo, hay que confirmar el diagnóstico ya que estos signos no son exclusivos de la PTB. La linfangitis y linfangiectasia produce la obstrucción de vasos linfáticos y esto provoca la salida de líquidos por la luz intestinal, así como la merma de la presión osmótica sanguínea en animales emaciados⁴. También puede presentarse edema a nivel submandibular (Figura 4) como en cavidades torácica y abdominal debido a hipoproteïnemia. Es importante mencionar que el apetito de los animales no se observa afectado.



Figura 3. Toro de lidia con diarrea asociada a PTB.



Figura 4. Vaca con edema submandibular, signo presente en PTB.

La paratuberculosis impacta de manera importante en la producción animal al generar disminución en la producción láctea, así como el desecho precoz de animales⁵. También se relaciona con problemas de baja fertilidad y predisposición a la mastitis. Los estudios de distribución y prevalencia en bovinos indican que la paratuberculosis ocasiona pérdidas económicas anuales de 3 a 10% en los adultos, sobretodo a partir del segundo año de vida⁶.

Existen estudios que asocian a MAP como el causante de la Enfermedad de Crohn (EC) en los humanos, este proceso no tiene cura conocida y quien la padece tiene una calidad de vida pobre causada por los síntomas. Los síntomas de la EC son malestar general, hiporexia, pérdida de peso corporal, dolor abdominal, diarrea, fiebre leve y persistente^{7,8}. Las lesiones que el microorganismo causa en tracto gastrointestinal son: enteritis crónica proliferativa o bien enteritis ulcerativa^{9,10}. Se especula que la vía de entrada de MAP en humanos es por ingestión del microorganismo en alimentos contaminados como pudieran ser la leche y la carne^{11,12} (Figura 5).

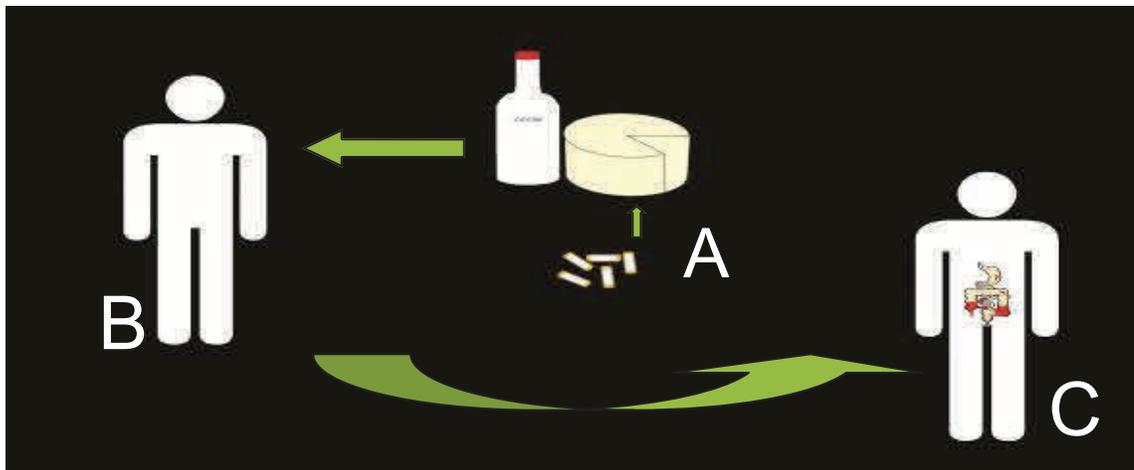


Figura 5. A) Ingreso de MAP a través de leche o queso contaminado B) es ingerido C) produciendo la Enfermedad de Crohn, afectando intestino delgado y grueso.

Diagnóstico de paratuberculosis

Las lesiones macroscópicas y microscópicas son de gran utilidad en el diagnóstico de la PTB, así como otros procedimientos diagnósticos, que empleados solo o en combinación ayudan a tener un diagnóstico oportuno.

Diagnóstico anatomopatológico

Diagnóstico Macroscópico

MAP puede causar lesiones con diferente grado de afección acompañando o no con un cuadro clínico de emaciación (Figura 6), diarrea, edema submandibular, ascitis, hidrotórax e hidropericardio.



Figura 6. **Animales emaciados por PTB** A) Oveja pelibuey, B) Cierva [Cortesía Dr. Fernando Paolicchi], C) Cabra alpino francesa

Por definición, la necropsia es el examen sistemático de un cadáver en búsqueda de lesiones, siendo una herramienta diagnóstica importante y de apoyo a otros procedimientos de diagnóstico. Los procedimientos de necropsia utilizados pueden variar entre especies y el tipo de rutina utilizada para su realización dependerá de quien ejecuta la necropsia, la disponibilidad de materiales y equipos para su realización, el estado de conservación del cadáver y las necesidades de quien solicita la necropsia. Por ello en el presente trabajo se hace énfasis en la importancia de la inspección del aparato digestivo de rumiantes debido a la aceleración de los cambios *post-mortem* que sufre el tubo digestivo.



Figura 7. **Inspección de intestino delgado**

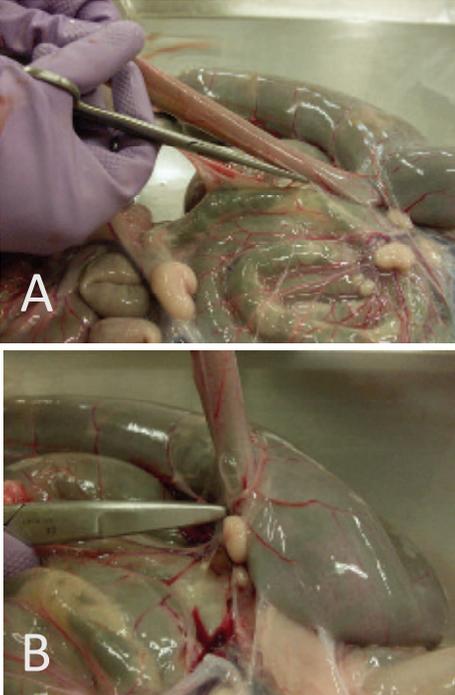
Debido a lo anterior cuando se presenta la oportunidad de realizar una necropsia de un animal con sospecha de paratuberculosis es importante realizar la inspección del intestino delgado (Figura 7) en sus tres porciones: duodeno, yeyuno e íleon, así como los linfonodos mesentéricos siguiendo el orden descrito en la figura 8. Se presenta en el cuadro 1 la secuencia a seguir para la toma de la válvula ileocecal.



Figura 8. **La inspección de intestino delgado y grueso debe realizarse en el siguiente orden: (1) Válvula ileocecal a partir del ciego (2). Linfonodos mesentéricos, en busca de aumento de tamaño y/o fusión (3). Íleon (3). (4) Yeyuno.** Finalmente debe inspeccionarse duodeno, que es la estructura intestinal que tiene al páncreas adyacente. Este tipo de inspección se realiza invariablemente, en cualquier especie de rumiante sometido a necropsia.

Cuadro 1.

Secuencia de examen macroscópico y obtención de muestras de intestino para histopatología

<i>Imagen descriptiva</i>	<i>Descripción del procedimiento</i>
	Se localiza el ciego y se separa del mesenterio hasta llegar a su unión con el íleon
	A) Se separa el íleon del mesenterio, respetando los linfonodos. B) El objetivo es llegar a la unión con el ciego (Inferior).
	Ya separados ciego e íleon, realizar un corte para separar y aislar el ciego, de aproximadamente 1.5 cm a partir de la unión ileocecal al íleon.

Cuadro 1. (Continúa)

<i>Imagen descriptiva</i>	<i>Descripción del procedimiento</i>
	<p>Realizar un par de cortes laterales al fragmento de íleon restante y rodear su contorno para localizar y tomar la válvula ileocecal. Enjuagar cuidadosamente con agua corriente, recordando que las mucosas son muy valiosas para su estudio macroscópico y microscópico.</p>
	<p>La válvula ileocecal de un animal sin cambios patológicos aparentes en intestino se observa lisa, estrecha en la luz del órgano y de un color rosado brillante (Círculo)</p>

Las lesiones que sugieren PTB a la necropsia son el engrosamiento de mucosa intestinal con distribución zonal a difusa, linfadenomegalia mesentérica con o sin fusión de linfonodos, linfangitis y linfangiectasia de moderada a grave, estas lesiones se presentan fundamentalmente en las fases finales. Cuando existe linfangiectasia se observan los vasos linfáticos blanquecinos, turgentes y tortuosos. (Figuras 9, 10, 11, 12 y 13)

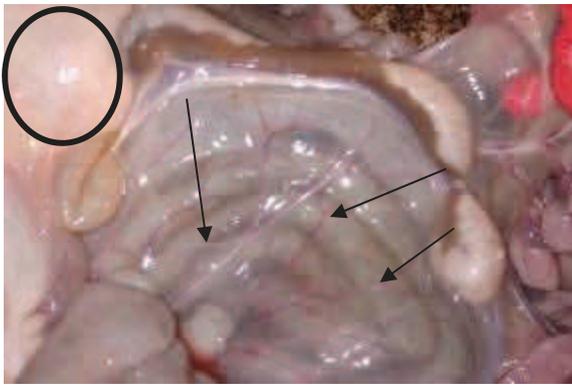


Figura 9. **Edema en intestino delgado.** Obsérvese la prominencia de los vasos sanguíneos y linfáticos. (Flechas) así como degeneración de grasa mesentérica, observable con un aspecto húmedo. (Círculo)

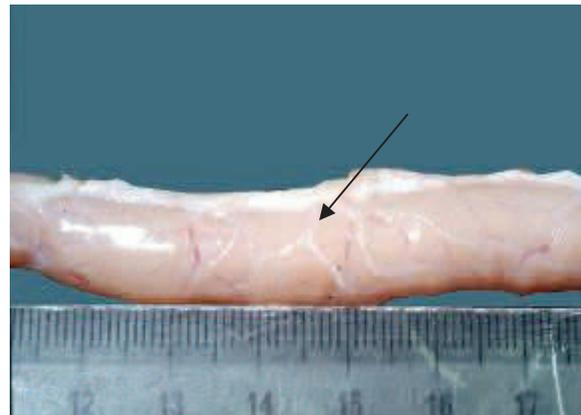


Figura 10. **Linfangiectasia moderada en intestino delgado** (flecha)

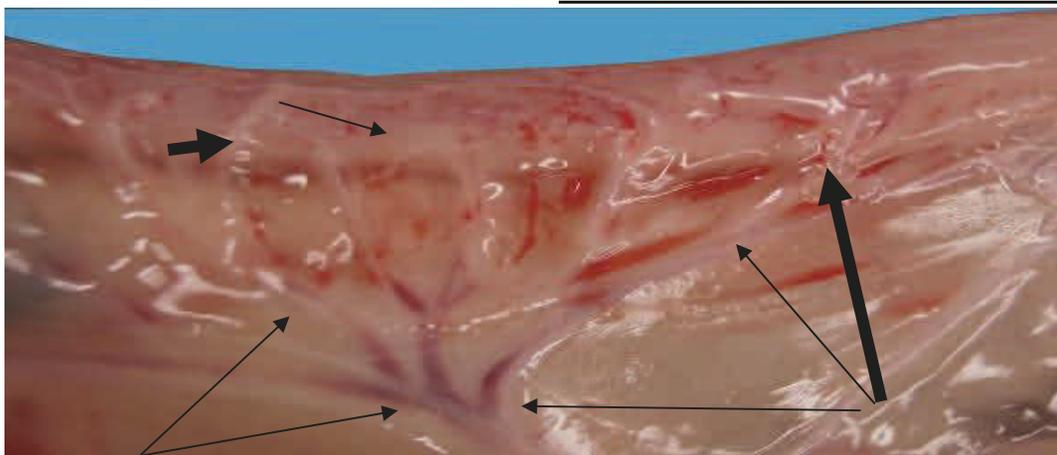


Figura 11. **Vasos linfáticos tortuosos, sugerente a Linfangitis y linfangiectasia de moderadas a graves.** Obsérvense los vasos linfáticos no afectados (flechas delgadas) en comparación con vasos engrosados y aumentados de tamaño los marcados con flechas gruesas.

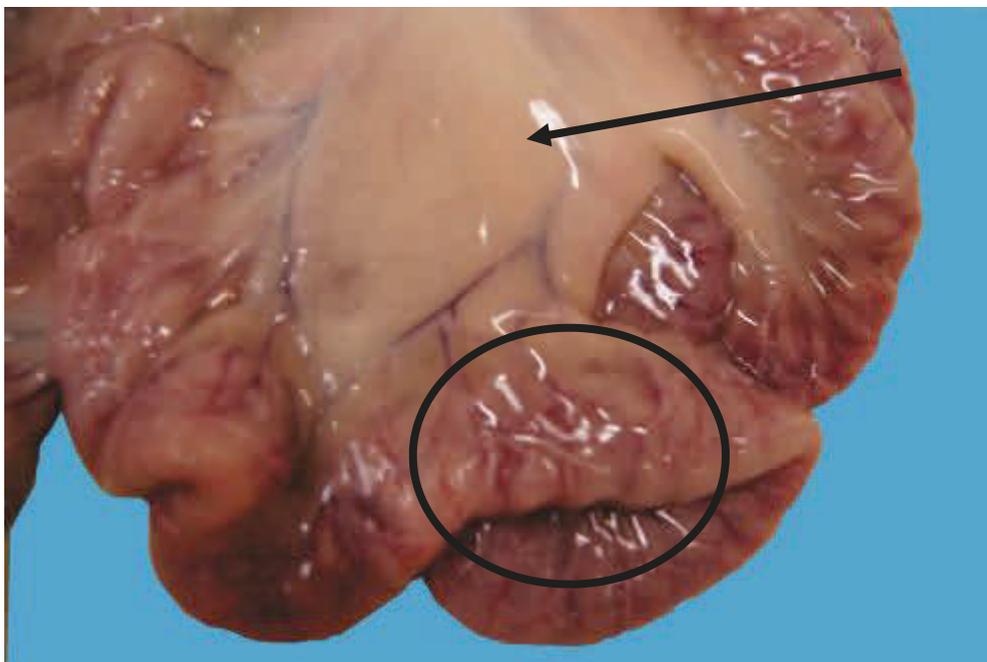


Figura 12. Obsérvese el aspecto brillante de la **capa serosa** donde existe **linfangiectasia** (Círculo) y el **mesenterio edematoso** (Flecha)

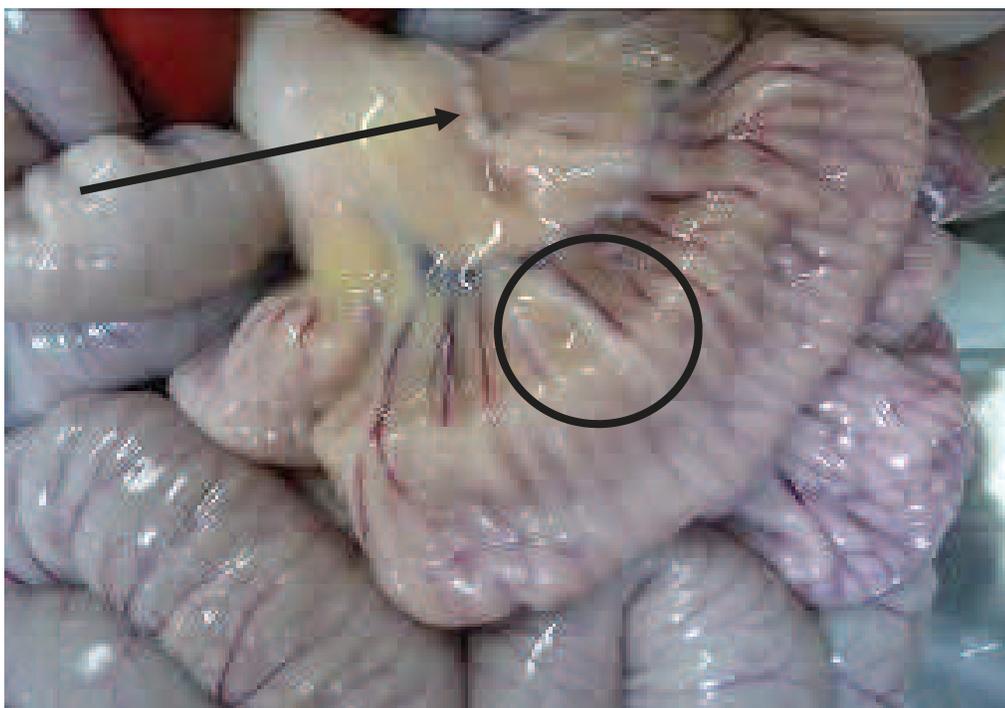


Figura 13. **Edema y linfangiectasia grave en mesenterio** (Flecha) e intestino delgado. Obsérvese la prominencia de los vasos linfáticos.

Es importante realizar la inspección sistemática durante la necropsia para la toma de muestras a partir de lesiones sugerentes a PTB, sin embargo en caso de no encontrar estas lesiones pueden tomarse muestras de tejido linfoide asociado a mucosa de yeyuno, íleon, válvula ileocecal (Figura 14) y ciego (Figura 15)¹³ para su estudio histológico donde se pueden observar lesiones granulomatosas compatibles con PTB. En las figuras 16 y 17 se muestran engrosamientos de la mucosa de válvula ileocecal y ciego. Otro hallazgo a la necropsia sugerente a PTB es el aumento de tamaño y fusión de los linfonodos mesentéricos, particularmente el ileocecal³ (Figuras 18, 19, 20 y 21)



Figura 14. **Separación de ciego** para inspección y toma de muestras para histopatología



Figura 15. **Separación de válvula ileocecal** para inspección y toma de muestra para histopatología



Figura 16. **Ciego engrosado**. Es perceptible el engrosamiento de mucosa sin realizar la apertura del órgano (Línea). Obsérvese también el linfonodo ileocecal aumentado de tamaño (Flecha). Para referencia de órgano normal, ver figura 8

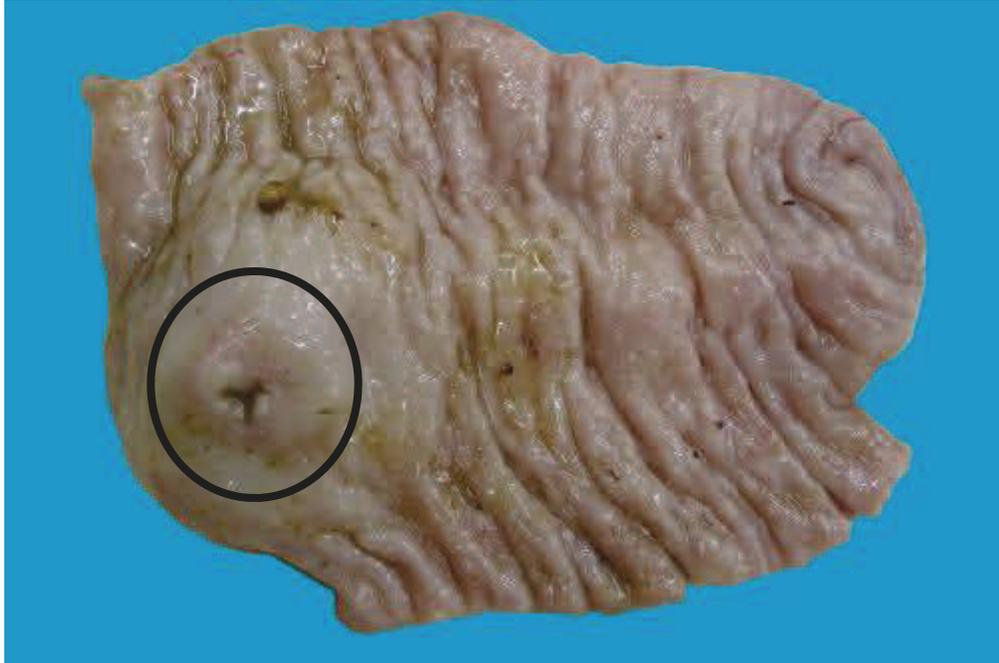


Figura 17. **Válvula ileocecal (Círculo) y ciego con engrosamiento de la mucosa, que se observa con aspecto corrugado.**

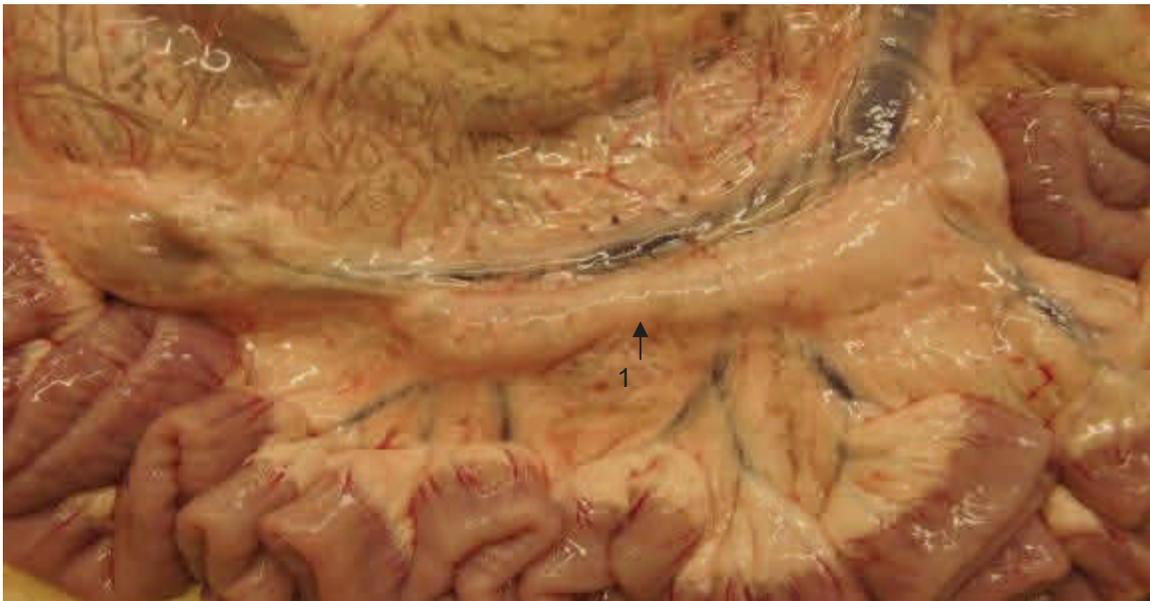


Figura 18. Se observa aumento de tamaño de **linfonodos mesentéricos (1).**

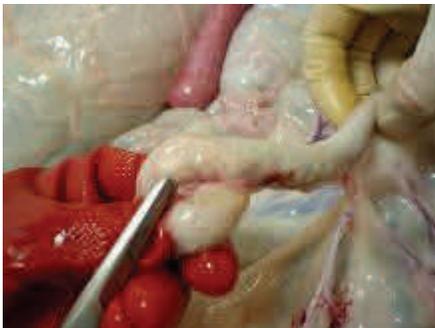


Figura 19. **Extracción de linfonodo aumentado de tamaño para su estudio histopatológico**



Figura 20. **Fusión de linfonodos mesentéricos (Flecha).**

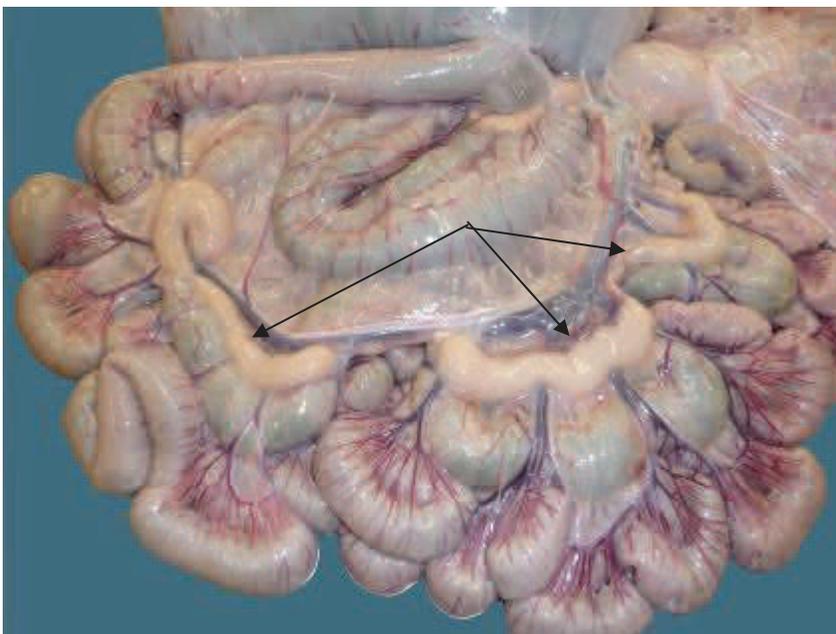


Figura 21. **Linfadenomegalia y fusión de linfonodos mesentéricos con presentación grave (Flechas)**

Un hallazgo a la necropsia en caprinos y ciervos es la presencia de focos de calcificación de mucosa intestinal, submucosa y los linfonodos mesentéricos adyacentes al sitio de lesión¹⁴, éstos se observan de color blanquecino o de color arena (Figura 22 y 23).

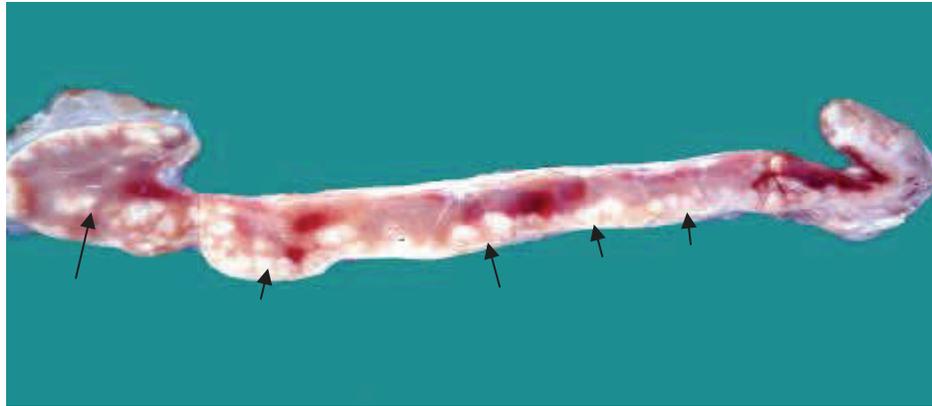


Figura 22. **Corte longitudinal de linfonodo mesentérico de cabra** con reactividad asociada a lesión granulomatosa así como calcificación de la zona cortical (Flechas)

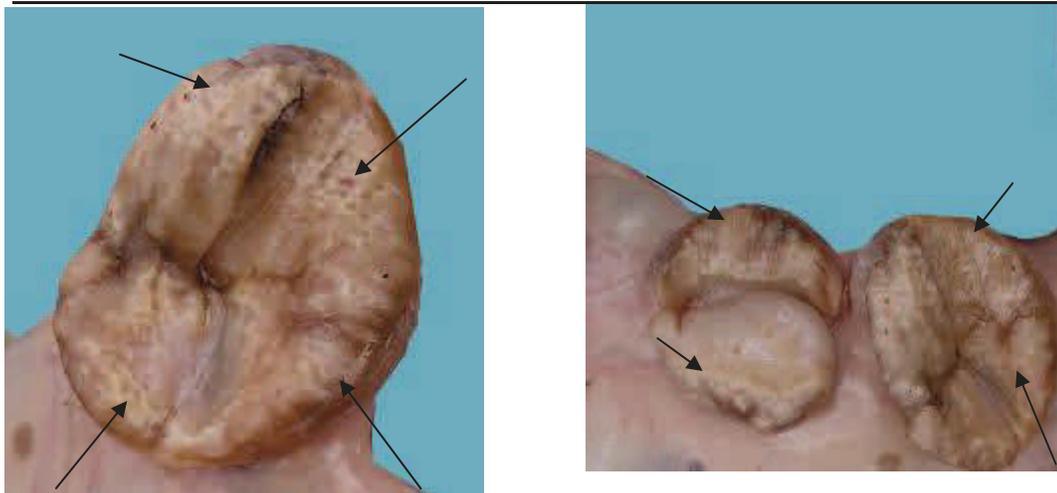


Figura 23. **Linfonodos de ciervo cortados longitudinalmente** donde se muestra calcificación de la zona cortical (Flechas). [Cortesía Dr. Fernando Paolicchi]

Al observar el intestino delgado es perceptible el engrosamiento de la mucosa intestinal sin realizar la apertura del intestino tanto de manera segmental como difusa (Figuras 24 y 25), y al realizar la apertura del órgano se puede encontrar la mucosa con un aspecto corrugado con presentaciones de leve a grave (Figuras 26, 27, 28, 29 y 30). Es importante diferenciar el engrosamiento de la mucosa de un intestino mucosa de un intestino afectado por paratuberculosis de un intestino normal contraído post mortem, ya que en el primer caso, los pliegues no desaparecen al estirar el segmento de intestino. (figura 31). El diagnóstico macroscópico de paratuberculosis es fácil y rápido si se realiza por personal capacitado.

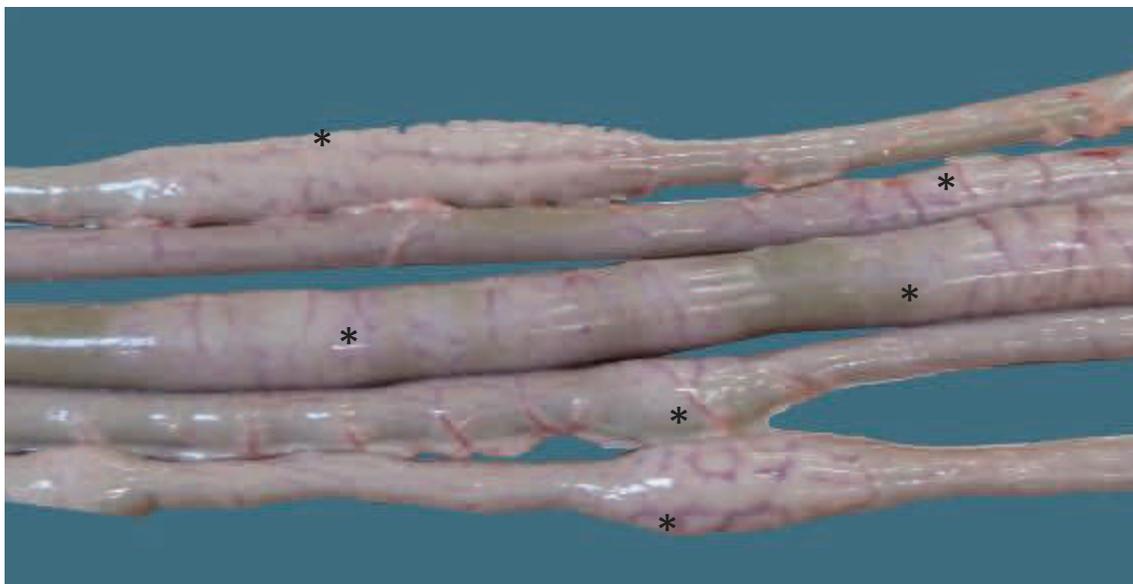


Figura 24. **Engrosamiento a lo largo del intestino** debido a la mucosa afectada, perceptible sin realizar la apertura del órgano. (*)

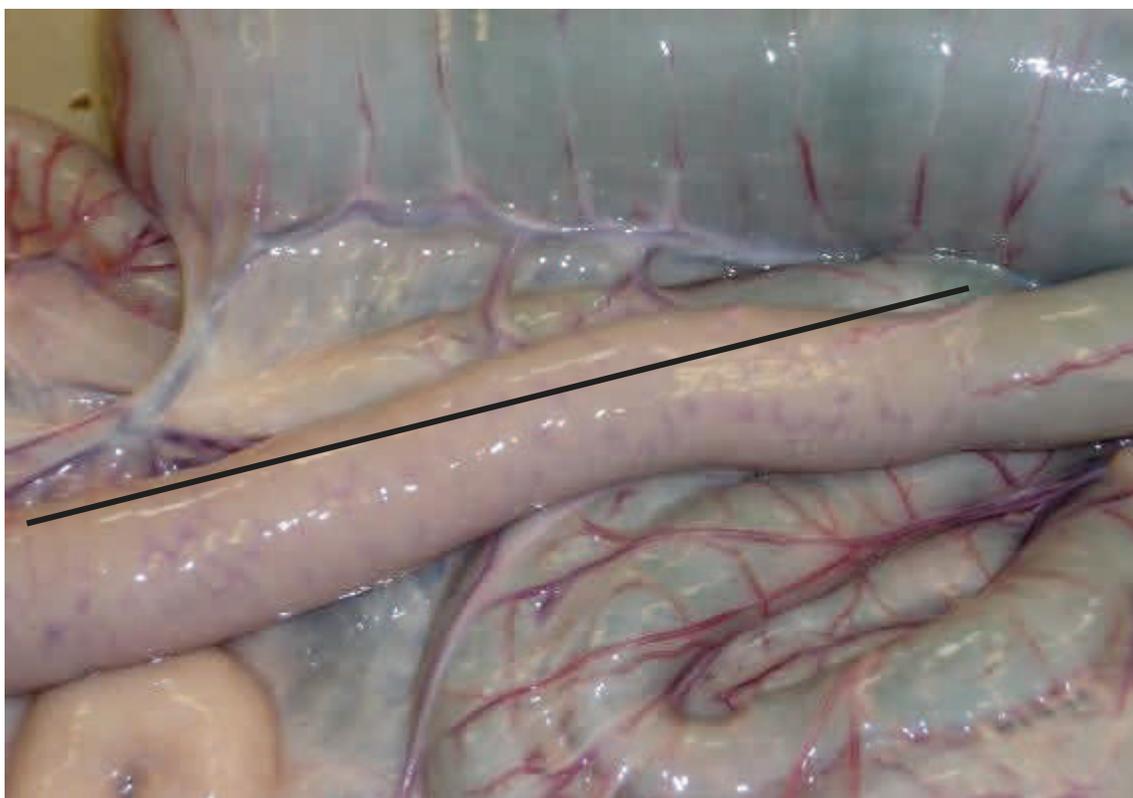


Figura 25. **Engrosamiento segmental de la mucosa ileal** perceptible aún sin la apertura del intestino (Línea)

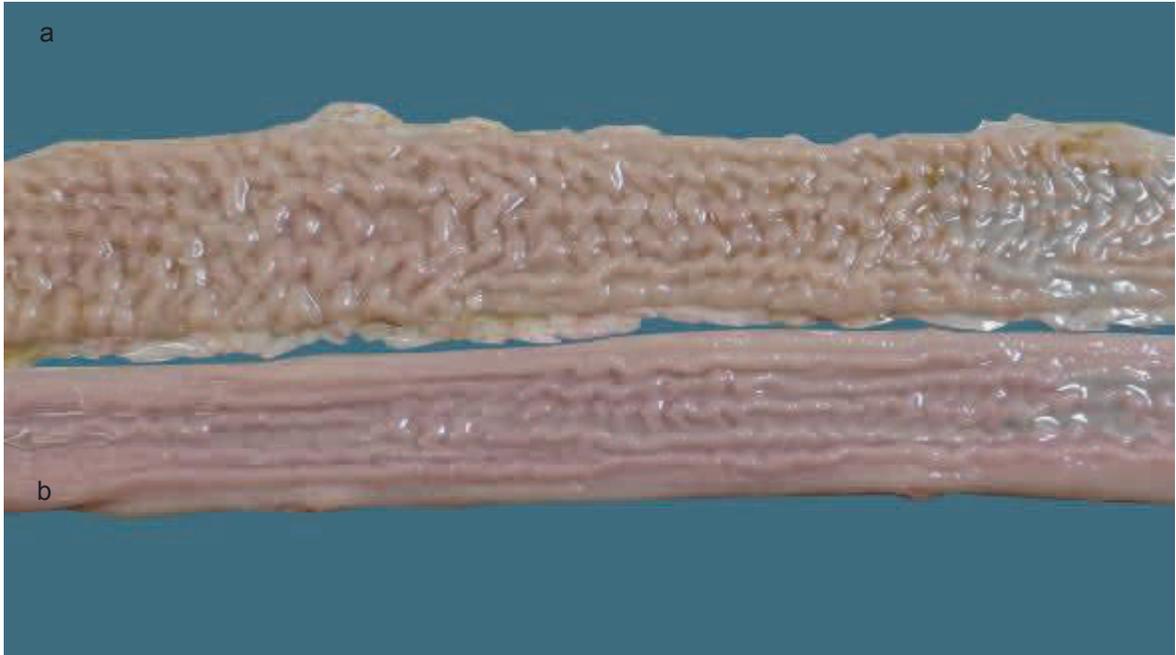


Figura 26. **Engrosamiento de la mucosa intestinal** en intestino de oveja. Se observa en (a) con aspecto difuso y (b) zonal.

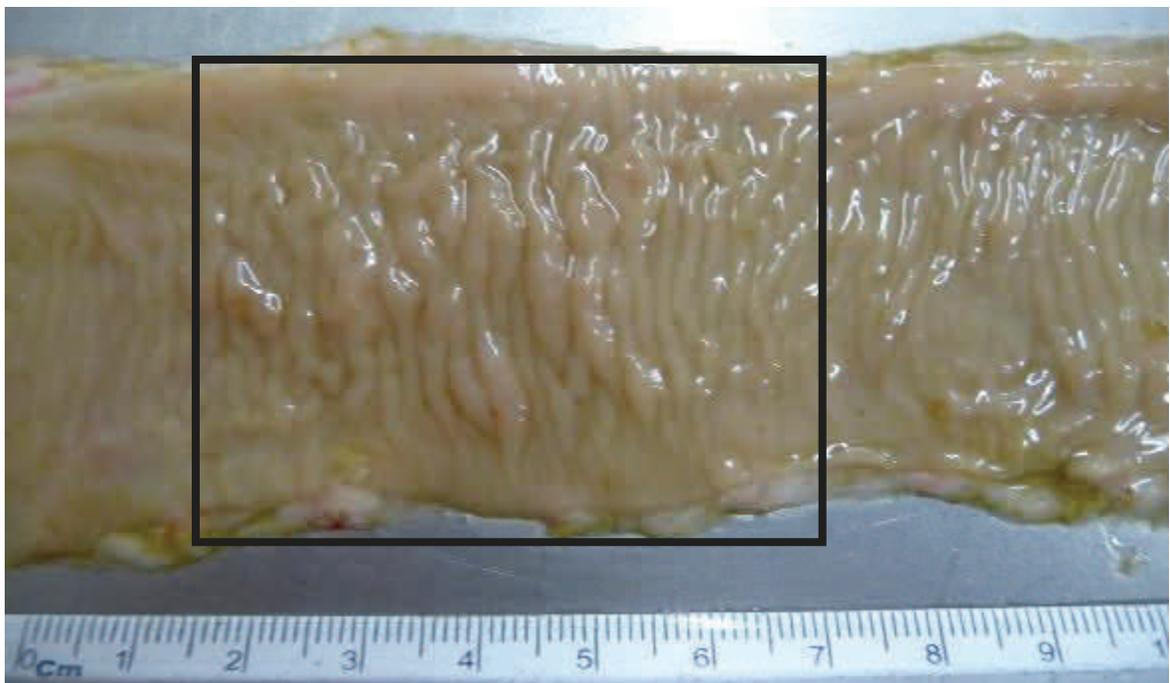


Figura 27. **Engrosamiento de la mucosa intestinal** con presentación zonal. (Rectángulo).



Figura 28. **Engrosamiento de la mucosa intestinal** con presentación zonal.



Figura 29. **Engrosamiento de la mucosa intestinal** a nivel de íleon con presentación difusa

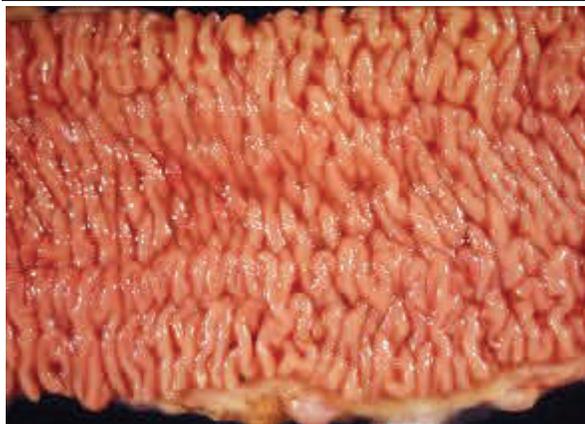


Figura 30. **Engrosamiento de la mucosa intestinal** con presentación difusa

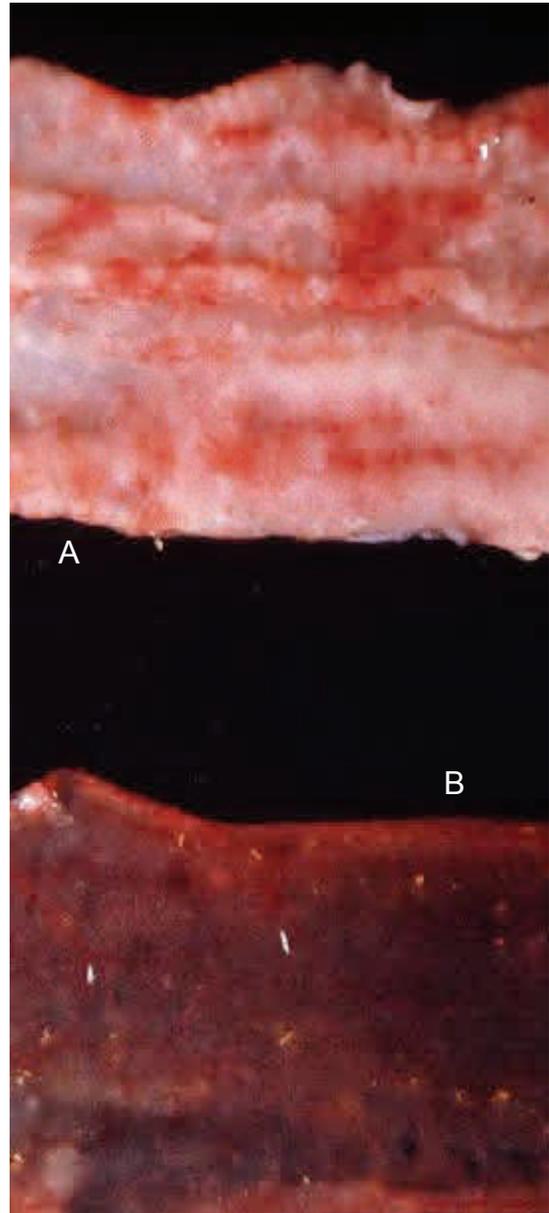


Figura 31. A) **Intestino de cabra con engrosamiento de mucosa**, conservado al estirar la porción de órgano. B) **Intestino congestionado**, mismo que pierde el aspecto corrugado al estirar la porción de órgano.

En ovinos jóvenes existe una estructura linfoide asociada a la mucosa intestinal que es timo-dependiente y produce en su mayor parte IgM¹⁵, localizada cerca de la unión ileocecal abarcando toda la extensión del íleon, la cual es aproximadamente de 1.5m. Esta estructura observa sin abrir el íleon de color blanquecina (Figura 32) y al realizar la apertura puede observarse como una estructura corrugada pero ésta tiene una consistencia suave (Figura 33). Cabe señalar que esta estructura al ser timo-dependiente involuciona con la edad del animal y no es observable en animales adultos.

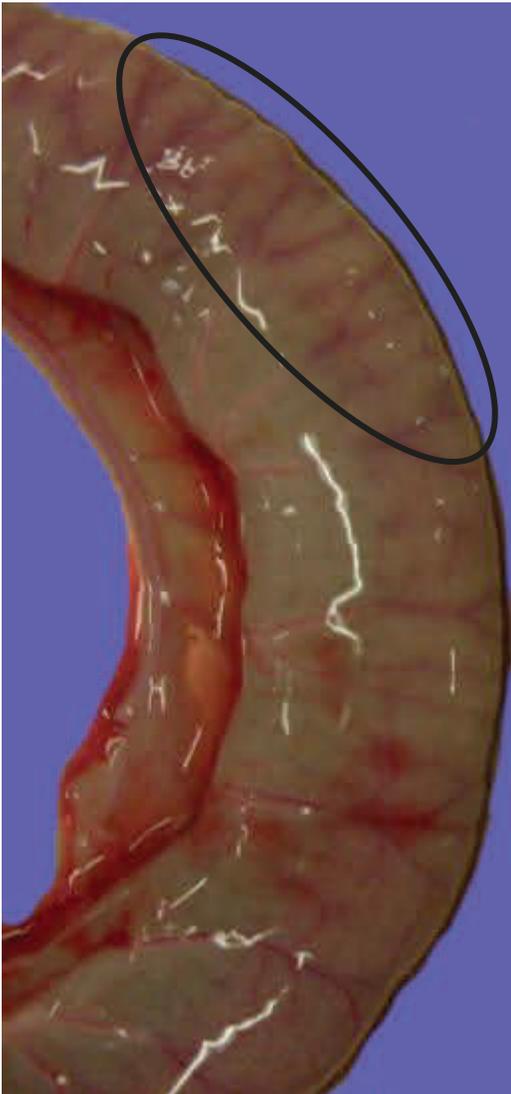


Figura 32. Obsérvese el **borde antimesentérico** de una sección de íleon de una oveja joven (óvalo). Se observa turgente, ligeramente blanquecino y granular. Esto corresponde al **tejido linfoide asociado a íleon**.

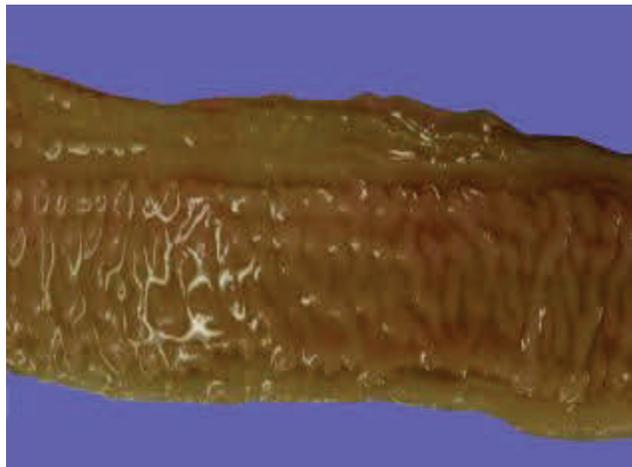


Figura 33. A la apertura del intestino de oveja joven observamos el **tejido linfoide asociado a íleon**. Éste se observa en el borde antimesentérico, la mucosa se observa normal en el borde mesentérico. No confundir con engrosamientos causados por PTB.

Cabe señalar que hay casos sospechosos a paratuberculosis que pueden complicarse con otras enfermedades por ejemplo infecciones bacterianas secundarias (Figura 34) y parasitosis causadas por nematodos (Figura 35). PTB puede confundirse con una infección por protozoarios del género *Eimeria* e *Isospora* spp. debido al engrosamiento que ocasiona en la mucosa (Figura 36). La diferencia radica en la edad de presentación de la enfermedad, debido a que en un cuadro de coccidiosis los signos clínicos se presentan desde edades tempranas. Debido a lo anterior, en caso de afección intestinal donde se observa el engrosamiento de la mucosa intestinal en animales jóvenes es necesario realizar flotación o estudio histopatológico y así confirmar el diagnóstico diferencial.

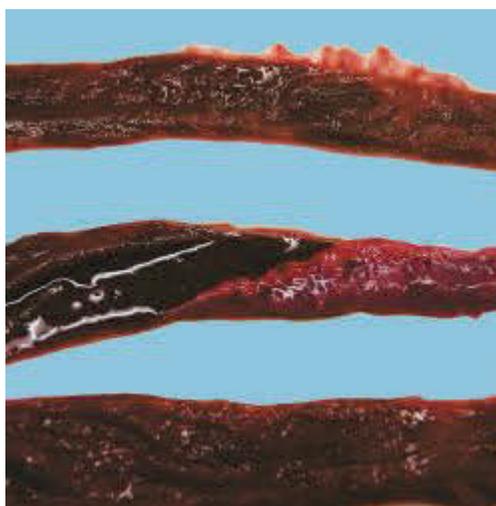


Figura 34. Caso de paratuberculosis con **necrosis intestinal**, asociada con *Escherichia coli*.



Figura 35. Además de la **mucosa del ciego engrosada**, lo cual es sugerente de PTB se pueden apreciar *Trichuris ovis* (Pinzas) causando alta producción de moco y lesiones hemorrágicas



Figura 36. Porción de intestino delgado de un cabrito con **engrosamiento nodular** en la mucosa, se descarta paratuberculosis debido a la edad de presentación del cuadro clínico.

Otra enfermedad diferencial de paratuberculosis en ovinos y caprinos es linfadenitis caseosa, provocada por *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Esta bacteria Gram positiva causa abscesos caseosos en linfonodos, hígado, bazo, órganos tubulares y en disposición paravertebral. Puede haber confusión al pensar que paratuberculosis es sinónimo de pseudotuberculosis, lo cual no es correcto; ya que MAP y *Corynebacterium* pertenecen al grupo de bacilos ácido-alcohol resistentes denominado CMN (*Corynebacterium* - *Mycobacterium* - *Nocardia*), pero el cuadro clínico y la etiología es totalmente diferente en MAP y Pseudotuberculosis, en donde MAP no provoca abscesos. En las figuras 37 y 38 observamos abscesos provocados por *Corynebacterium pseudotuberculosis*.



Figura 37. Ovino (Izquierda) que presenta un **absceso en linfonodo submandibular**, probablemente causado por *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

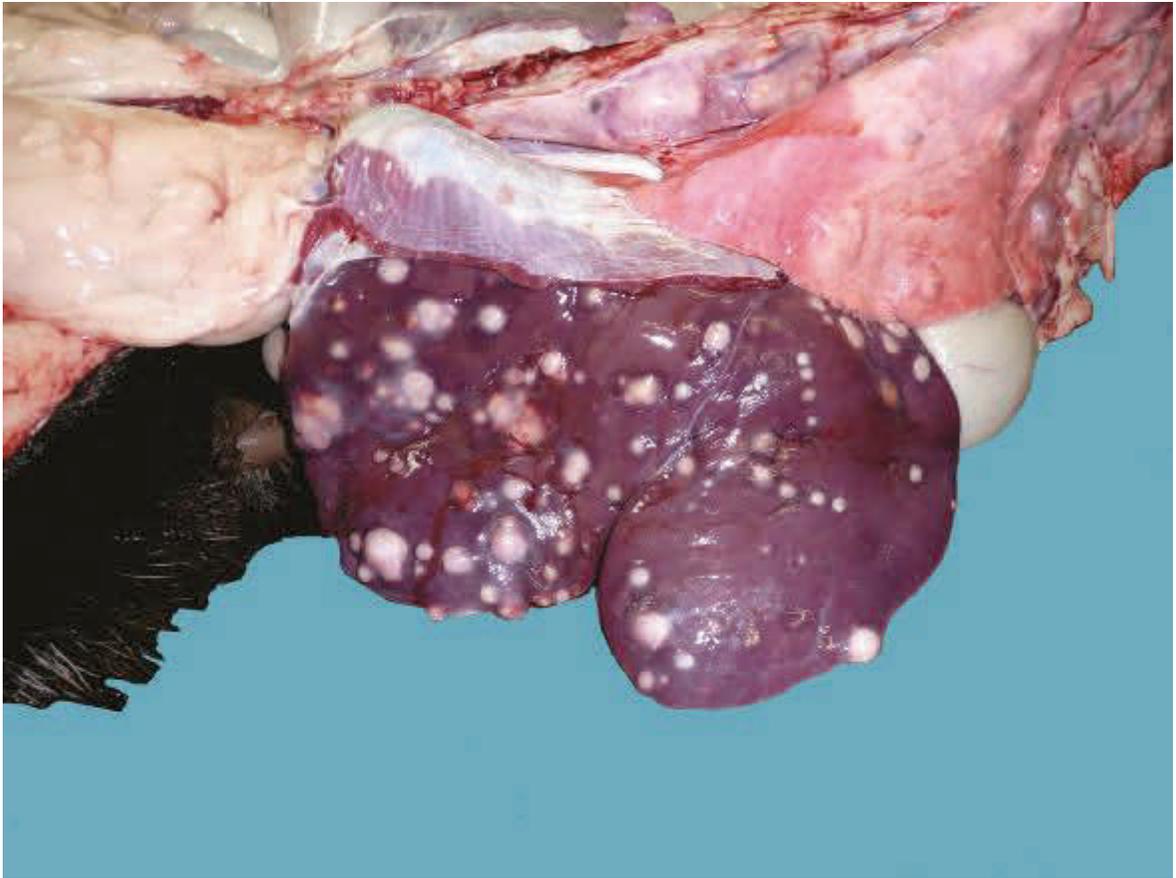


Figura 38. **Abscesos hepáticos** causados por *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

Diagnóstico Microscópico

La histopatología es una herramienta fundamental para realizar el diagnóstico de paratuberculosis. Primordialmente, la reacción granulomatosa es causada por microorganismos que no pueden ser contrarrestados por la inmunidad humoral, en este caso por tratarse de un microorganismo intracelular, causando una reacción de hipersensibilidad crónica, también conocida como hipersensibilidad tipo IV. Esta comienza por la liberación de citocinas, que funcionan como opsoninas, las cuales provienen de linfocitos T sensibilizados con un antígeno, lo cual lleva a la acumulación de macrófagos (Figura 39), mismos que pueden ser observados de una forma ovoide con núcleo excéntrico conocida como célula epitelioide (Figura 40), o bien, fusionados formando células gigantes (Figura 41). La finalidad de esta contención es para delimitar cuerpos extraños o microorganismos y posteriormente estas células puedan ser eliminadas con ayuda de las células NK (por sus siglas en inglés, natural killer, que son otro tipo de linfocitos encargados de eliminar a los macrófagos que consiguieron fagocitar al antígeno¹⁶.

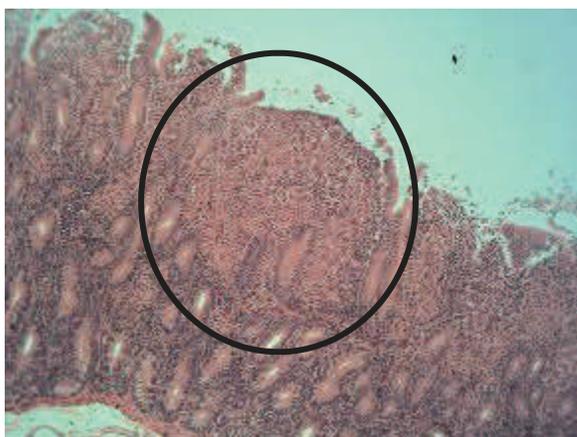


Figura 39. Corte histológico de intestino, donde puede apreciarse acúmulo de macrófagos (**Lesión granulomatosa**).

Tinción H-E, 100 aumentos

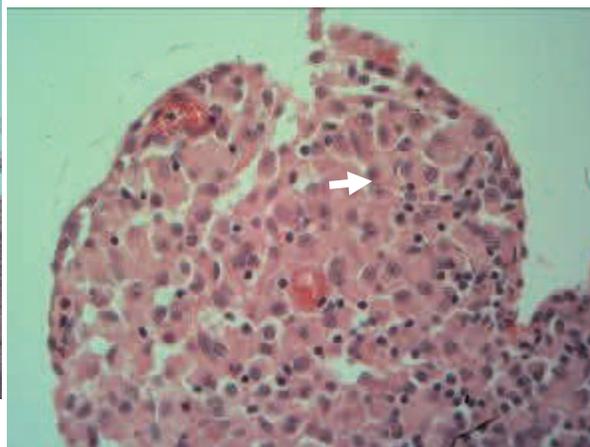


Figura 40 . Se observan macrófagos con núcleo excéntrico, denominados **células epitelioides** (Flecha). Tinción H-E, 400 aumentos

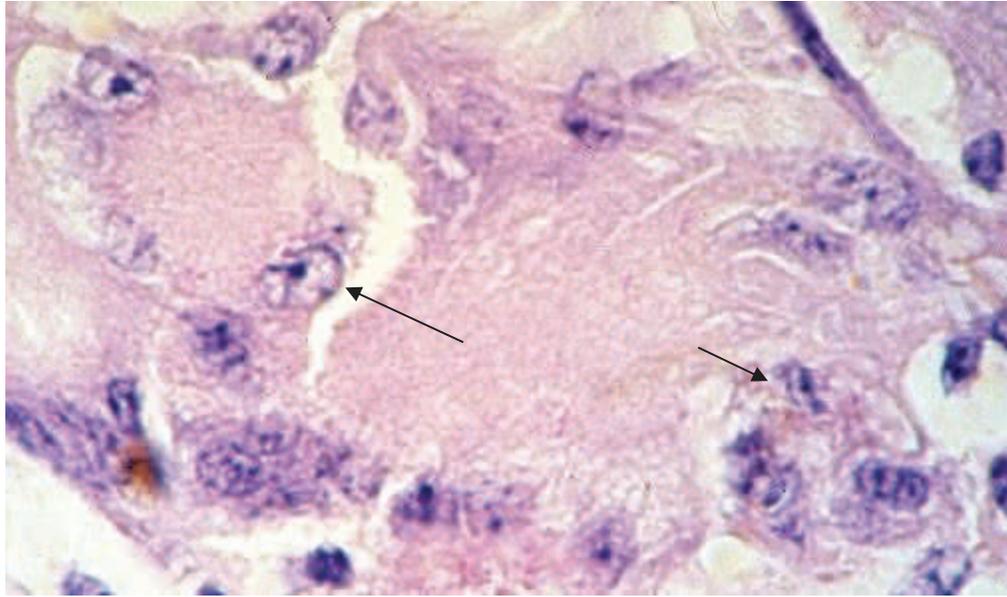


Figura 41. **Células gigantes** (Flechas) Tinción H-E. 1000 aumentos

La lesión característica de paratuberculosis es la enteritis granulomatosa. Está caracterizada por un acúmulo de macrófagos y células epitelioides en lámina propia de la mucosa (Figura 42) también afecta submucosa e incluso serosa y subserosa. El evento inflamatorio provoca en casos avanzados engrosamiento de vellosidades¹⁴.

Otra lesión sugerente a paratuberculosis en la observación histopatológica es la presencia de linfangitis y linfangiectasia¹⁴ (Figura 43)

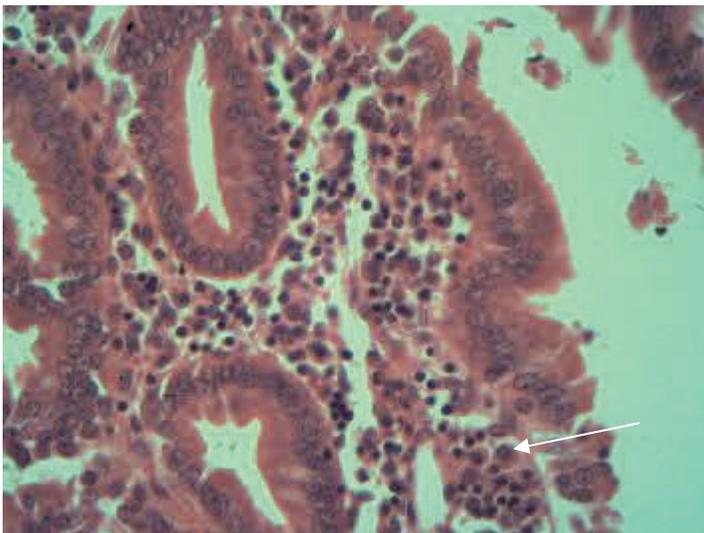


Figura 42. Corte histológico de intestino delgado, donde se observan **macrófagos** en lámina propia. (Flecha) Tinción H-E, 400 aumentos.

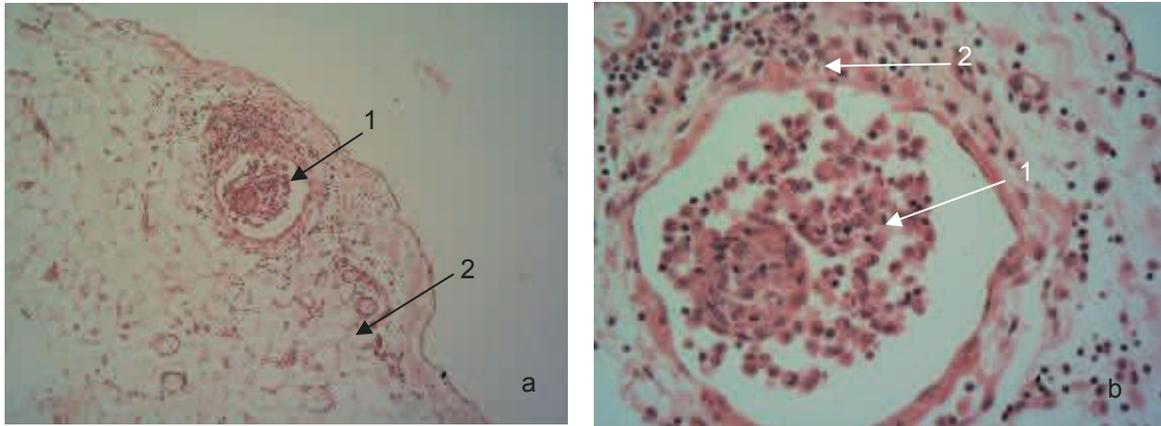


Figura 43a. Corte histológico donde se observa vaso linfático con macrófagos en su interior (1), **linfangitis granulomatosa** y (2), **edema en capa serosa del intestino delgado**, en (a), tinción H-E, 100 aumentos. Figura 43b. Detalle de la imagen 43a donde en (1) **se observan macrófagos en el interior de la luz** y (2) **células mononucleares en la periferia del vaso linfático**. Tinción H-E, 400 aumentos.

Puede existir reacción granulomatosa focal o multifocal en tejido linfoide asociado a intestino, así como en linfonodos mesentéricos (Figuras 44) . En la lesión se pueden encontrar BAAR intracelularmente empleando la Tinción Z-N, observándose las micobacterias de color rojo o morado. (Figuras 45 y 46)

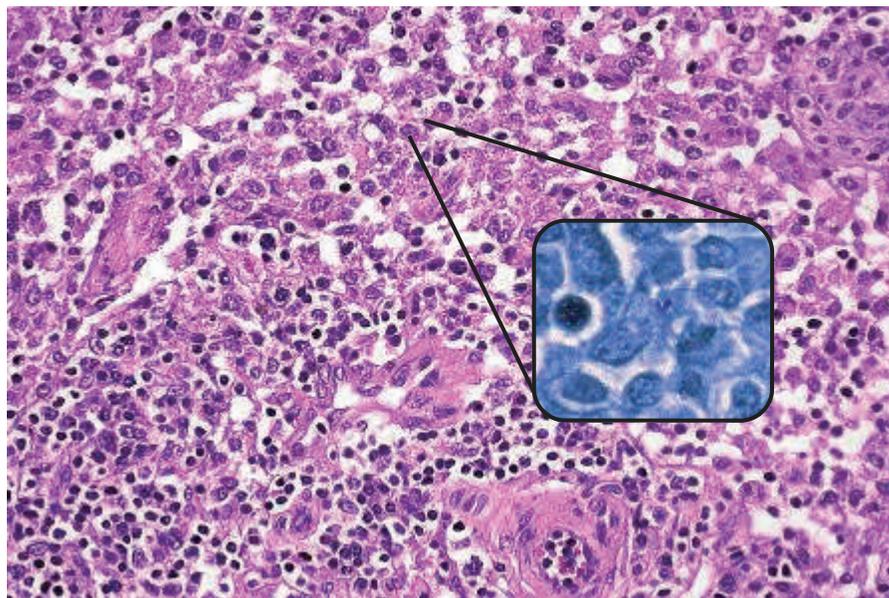


Figura 44. **Macrófagos presentes en linfonodo**. Tinción H-E, 400 aumentos. Se muestra el acercamiento de un macrófago con pocos BAAR en su interior con tinción Z-N a 1000 aumentos.

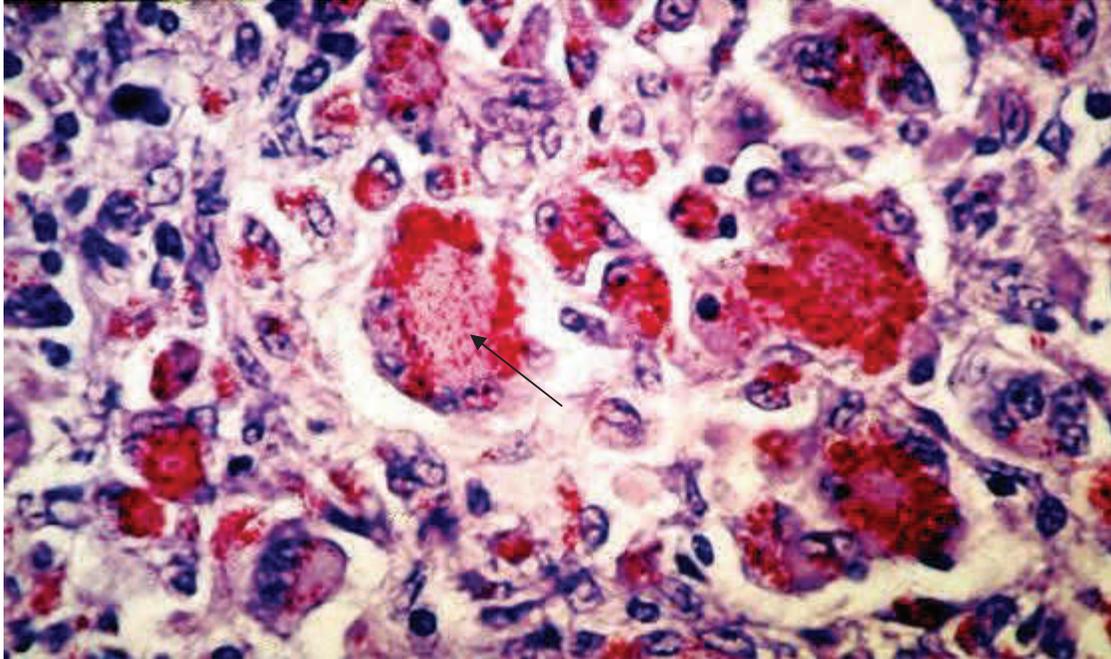


Figura 45. **BAAR (Flecha) observados dentro de macrófagos.** Tinción de Ziehl-Neelsen. 400 aumentos

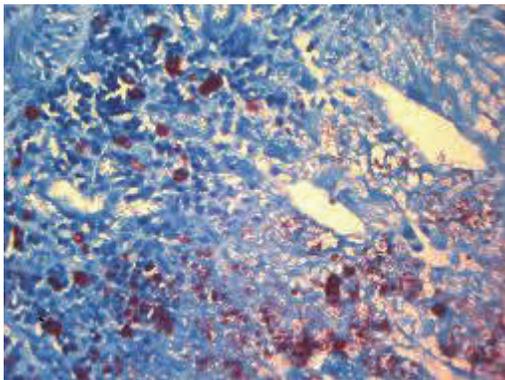


Figura 46. **BAAR.** Se observan intracelulares o adyacentes a los macrófagos, de color rojo o ligeramente rosas. Tinción de Ziehl-Neelsen. 100 aumentos

La protección contra MAP depende de la respuesta inmune celular. Se describen dos formas distintas de la enfermedad: Una forma tuberculoide ó paucibacilar caracterizada por pequeños granulomas formados por células epitelioides rodeados por abundantes linfocitos con escasos o nulos BAAR; y una forma lepromatoide o multibacilar caracterizada por lesiones compuestas por macrófagos con abundantes BAAR. Cabe mencionar que existe una clasificación dividida en 3 categorías de las lesiones microscópicas asociadas a paratuberculosis .

Se sugiere que estas lesiones histológicas intestinales se asocian a estadios de la enfermedad¹⁷. En el cuadro 2 se ilustran estas lesiones, categorías y subcategorías conforme la gravedad de dichas lesiones.

Cuadro 2.

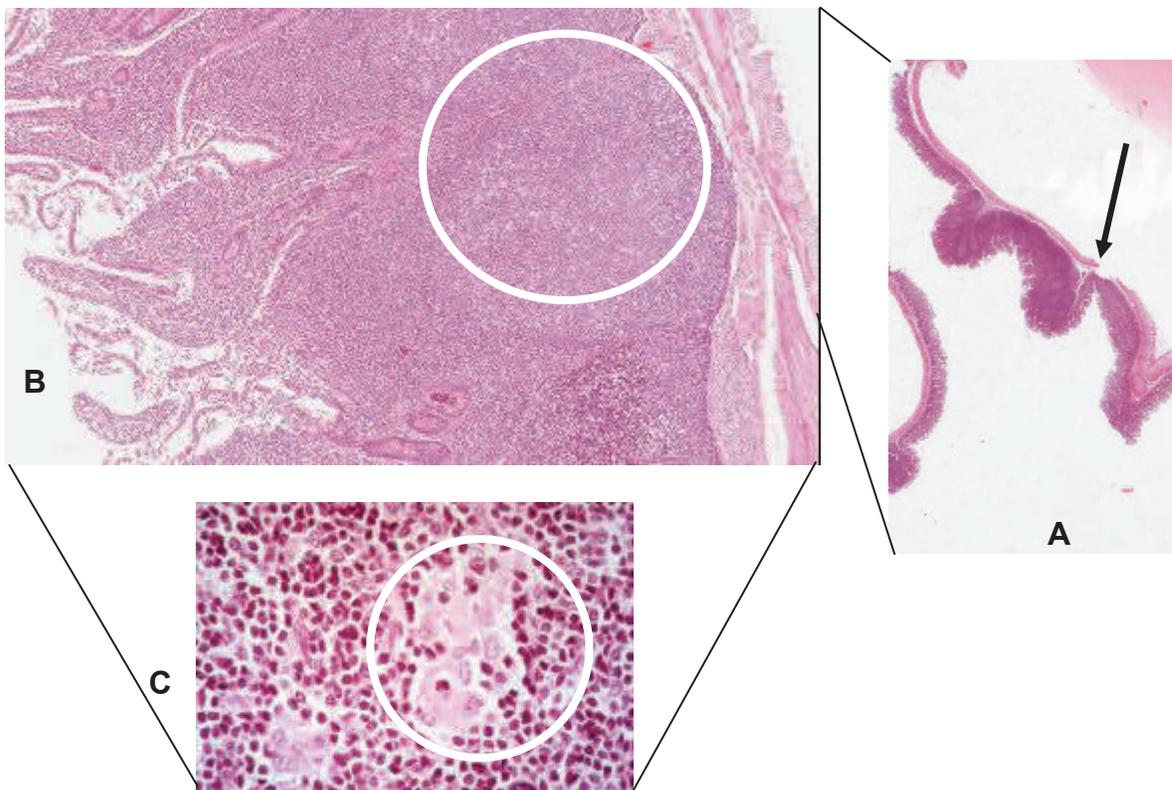
Clasificación de lesiones microscópicas de paratuberculosis¹⁷

Clasificación de la lesión

Características de la lesión

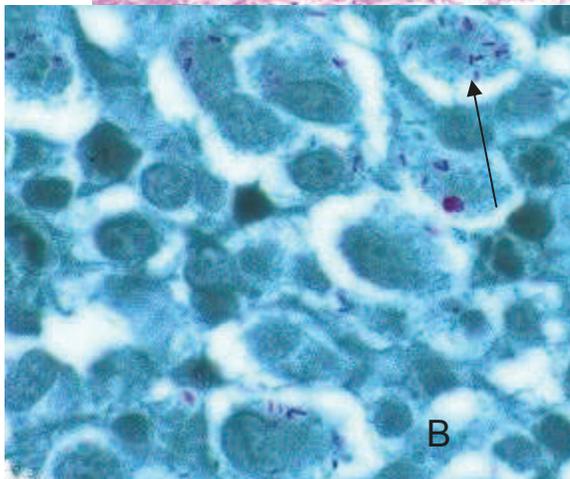
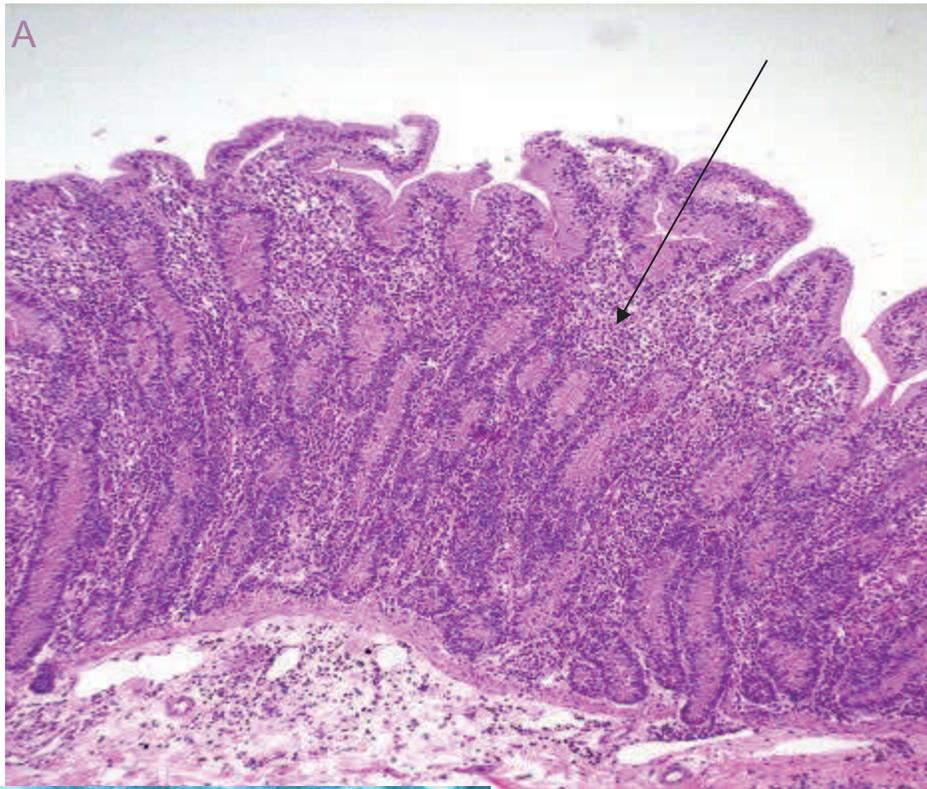
Tipo I

A) Lesiones focales en la porción basal (Flecha) Tinción H-E 4 aumentos y B) interfolicular (círculo) de tejido linfoide asociado a intestino. Tinción H-E 40 aumentos C) lesiones granulomatosas compuestas por macrófagos y células epitelioides. No se observan BAAR. Tinción H-E. 400 aumentos



Clasificación de la lesión**Características de la lesión****Tipo II**

A) La lesión granulomatosa se extiende hacia la mucosa adyacente al tejido linfoide asociado. Pueden observarse en la porción basal de la lámina propia de las vellosidades intestinales. (Flecha)
Tinción H-E. 100 aumentos



B) En secciones del mismo corte se aprecian algunos BAAR de color morado (Flecha) Tinción Z-N / Verde Brillante. 1000 aumentos.

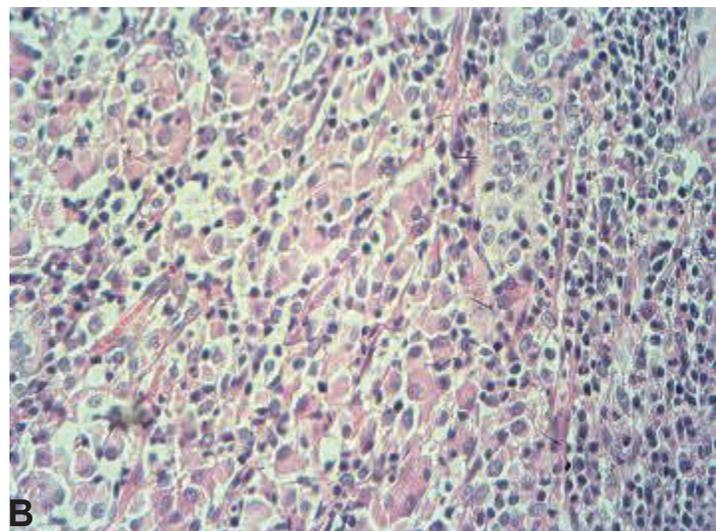
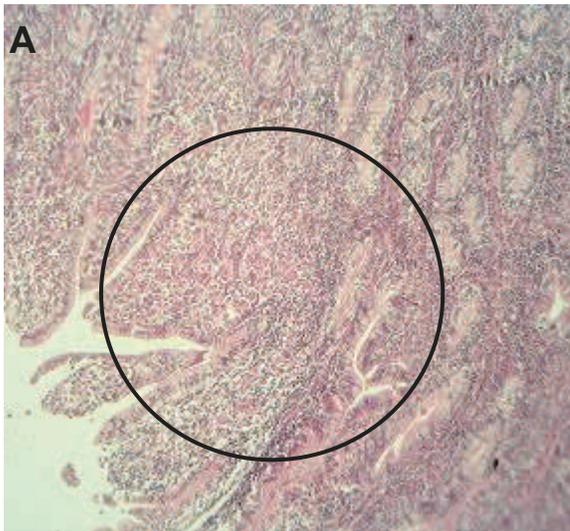
Cuadro 1. (Continúa)

Tipo III

Se reconocen 3 subtipos: Las lesiones granulomatosas afectan la mucosa adyacente y no adyacente al tejido linfoide asociado

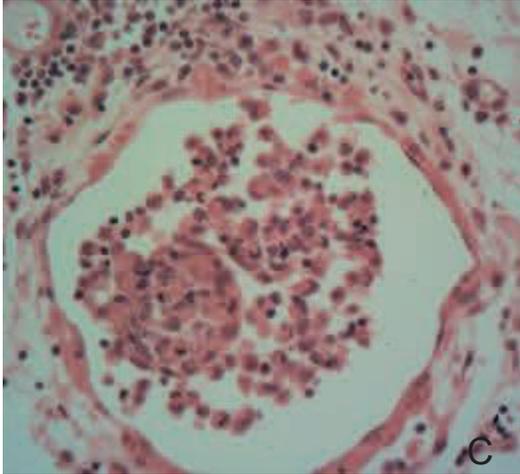
⇒ Subtipo IIIa

A) Granulomas multifocales en lámina propia principalmente. Involucran más vellosidades causando su engrosamiento [Círculo]. Tinción H-E 100 aumentos B) Detalle de la imagen anterior. Tinción H-E. 400 aumentos



Cuadro 1. (Continúa)

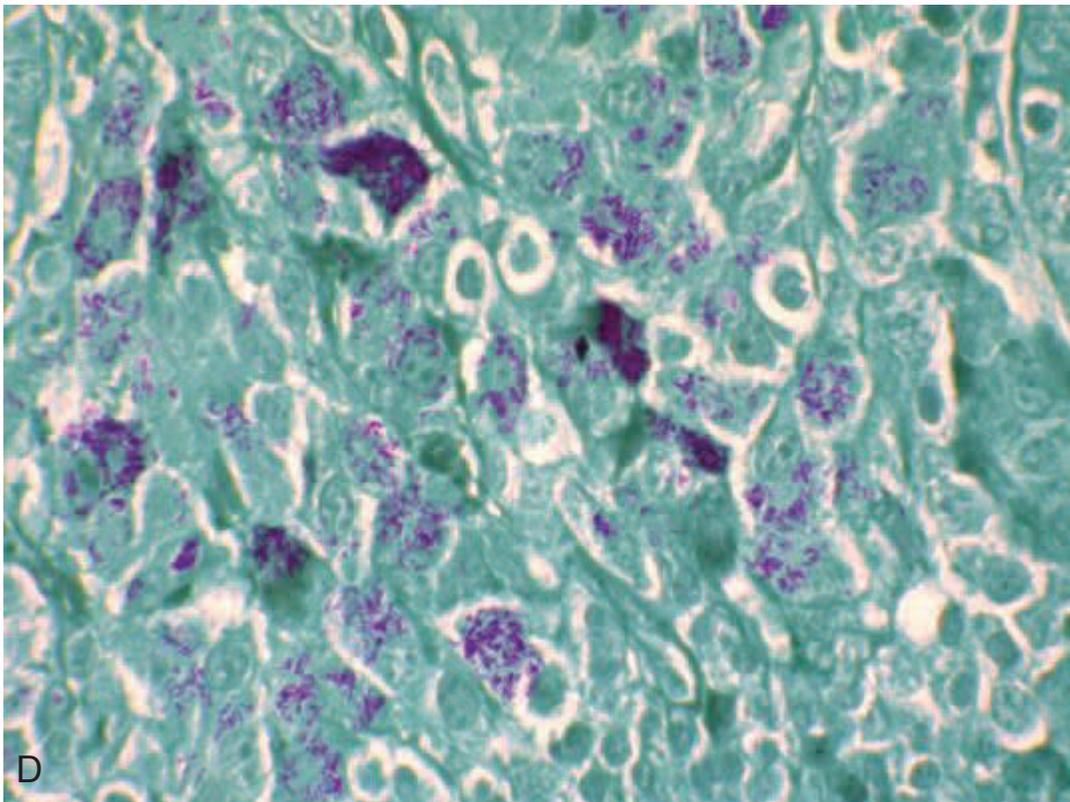
Clasificación de la lesión	Características de la lesión
-----------------------------------	-------------------------------------



⇒ Subtipo IIIa
(Continúa)

C) En subserosa y serosa pueden apreciarse focos de linfocitos y macrófagos alrededor de vasos linfáticos y sanguíneos (Detalle Tinción H-E 400 aumentos).

D) Se observan BAAR en cantidad de moderada a abundante. (Tinción Z-N/VB 1000 aumentos)

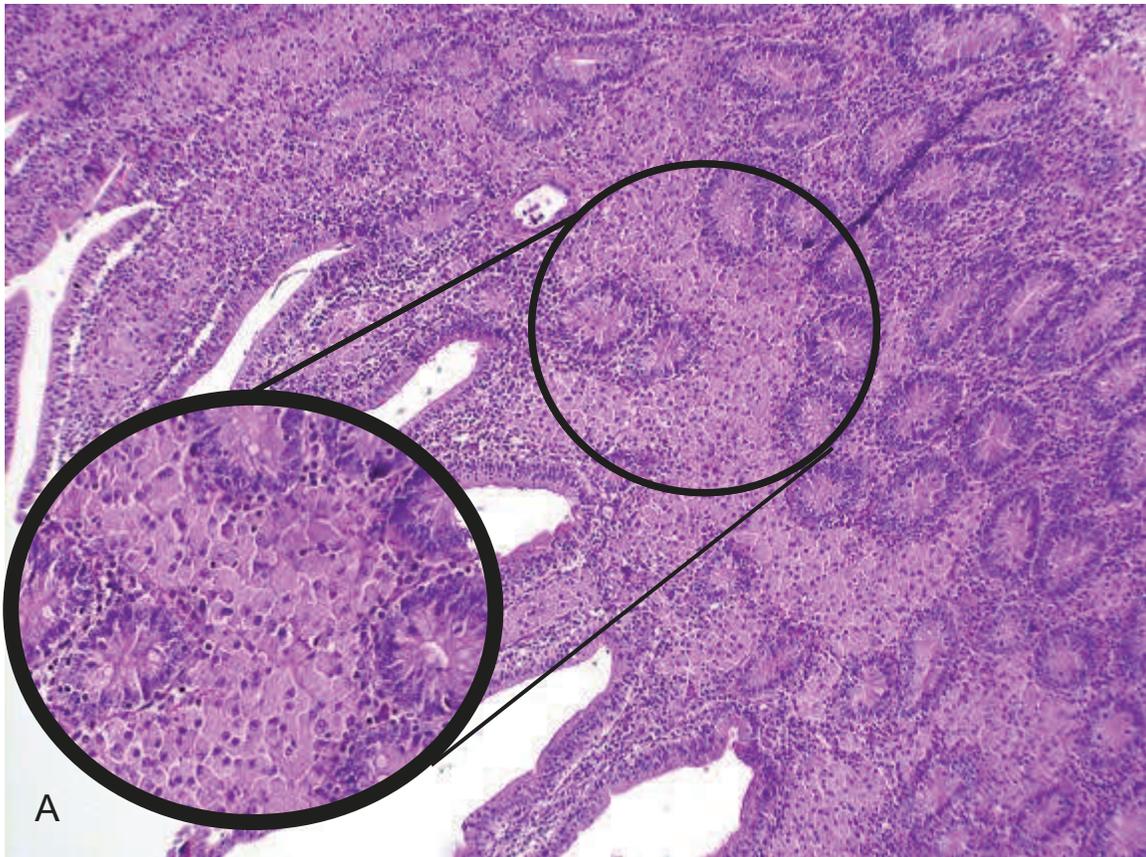


Cuadro 2. (Continúa)***Clasificación de la lesión***

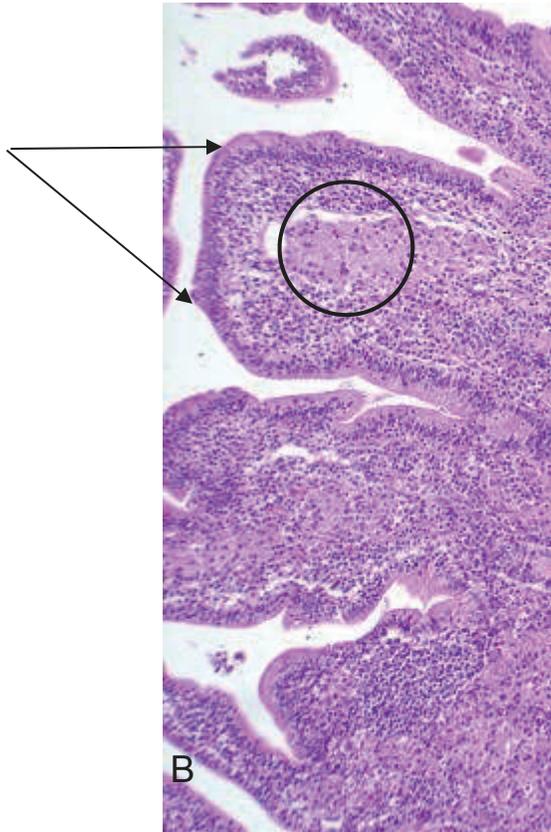
⇒ Subtipo IIIb

Características de la lesión

A) Enteritis granulomatosa compuesta por gran cantidad de células epitelioides, macrófagos y algunas células gigantes distribuidas difusamente, dando un aspecto de mosaico a la mucosa asociada y no asociada al tejido linfoide. [Círculo] (Tinción H-E 100 aumentos)



Cuadro 2. (Continúa)



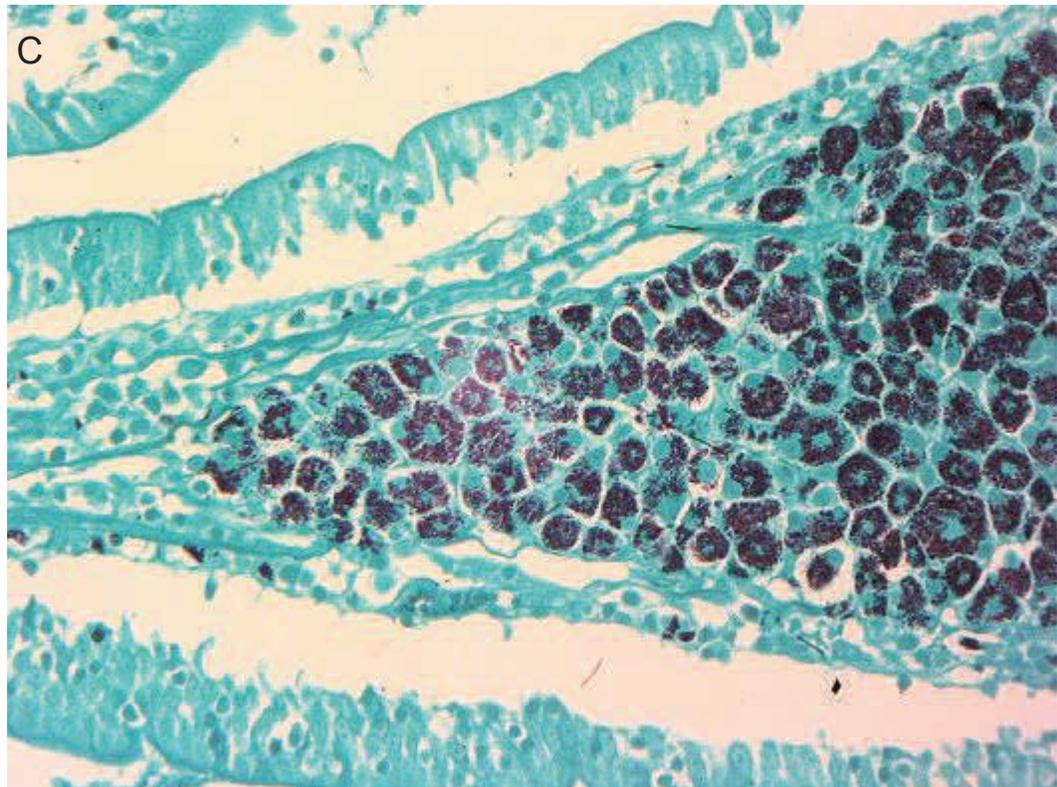
Clasificación de la lesión

⇒ Subtipo IIIb
(Continúa)

Características de la lesión

B) Es apreciable engrosamiento de vellosidades (Flechas) debido a la presencia de lesión granulomatosa en lámina propia (Círculo). Tinción H-E 400 aumentos

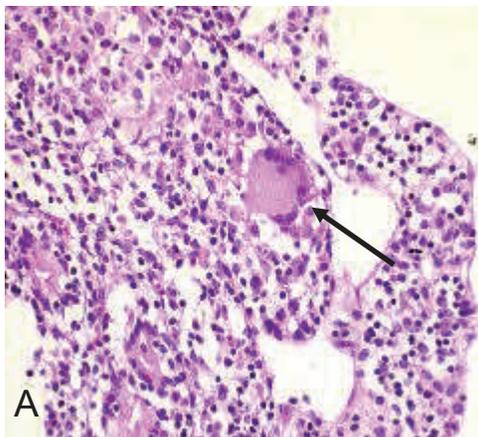
C) Se observan abundantes BAAR. Tinción Z-N/VB 400 aumentos



Cuadro 2. (Continúa)

Clasificación de la lesión

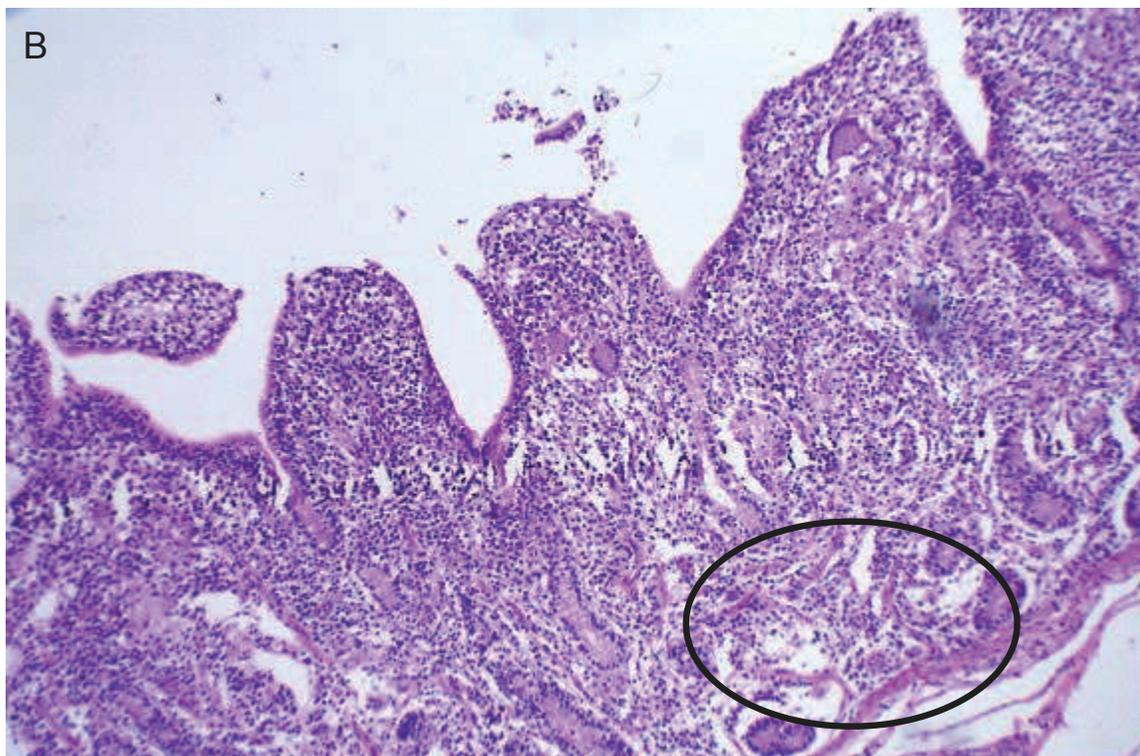
Características de la lesión



⇒ Subtipo IIIc

A) Granulomas compuestos por macrófagos y células gigantes localizados en tejido linfoide asociado. (Flecha) Tinción H-E, 400 aumentos

B) En la mucosa intestinal predomina infiltrado inflamatorio difuso compuesto por linfocitos, apreciable en las puntas de vellosidades. Se aprecia edema en submucosa y agregados de linfocitos y células plasmáticas [Óvalo] (Tinción H-E, 100 aumentos)

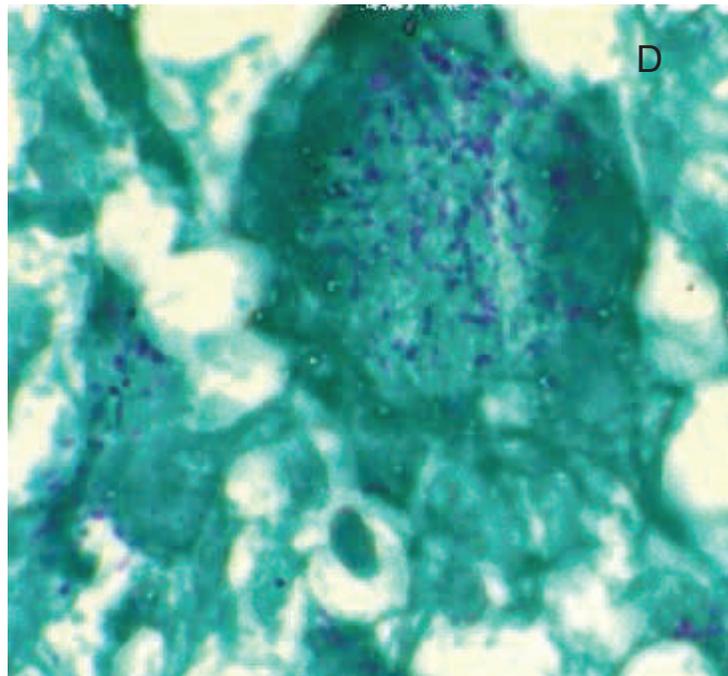
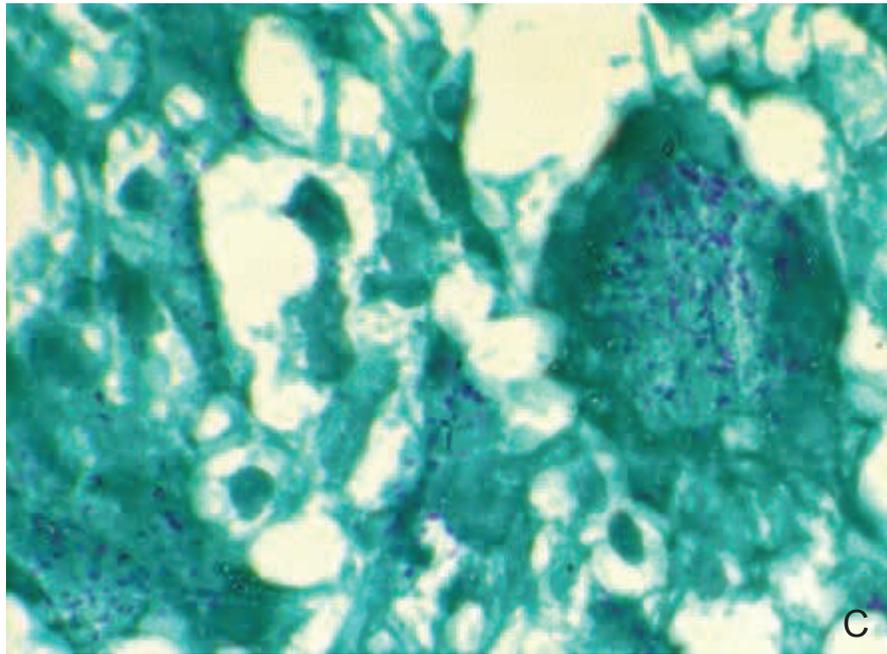


Cuadro 2. (Continúa)**Clasificación de la lesión**

⇒ Subtipo IIIc
(Continúa)

Características de la lesión

C y D) Se observan escasos BAAR. En ocasiones pueden no ser observados. (Tinción Z-N/VB 1000 aumentos)



Como se mencionó en la página 20, para realizar el diagnóstico diferencial con parasitosis además de tener como referente la edad del animal, es necesario realizar cortes histopatológicos donde se demuestre la presencia de los parásitos asociados al cuadro de diarrea, como en el caso de las coccidias de los géneros *Eimeria* e *Isospora* (Figura 47)

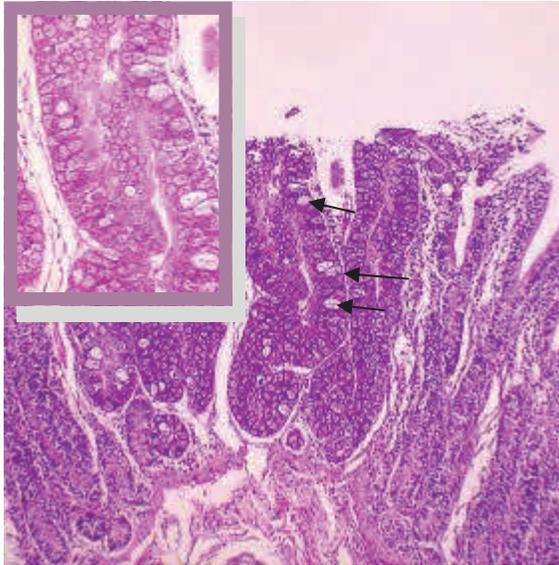


Figura 47. **Coccidias engrosando las vellosidades intestinales (Flechas)**. Obsérvese en las demás vellosidades la presencia de oocistos (Tinción H-E, 100 aumentos). El recuadro indica aumento de la sección señalada con flechas a 400 aumentos.

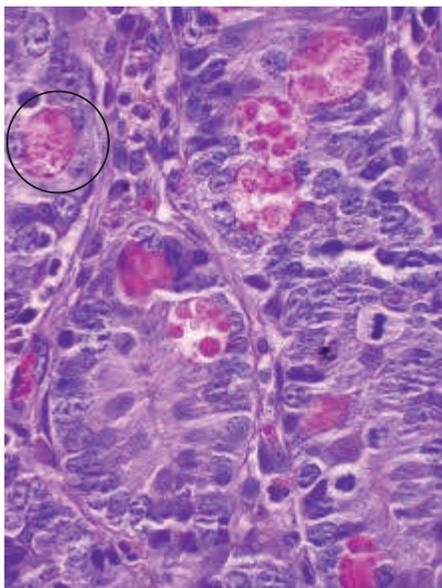


Figura 48. **Coccidias del género *Eimeria* spp. afectando las criptas intestinales**. *Eimeria* presenta 4 ooquistes con 2 esporozoítos [Círculo] Tinción H-E, 400 aumentos.

Para llegar a inferir el género de las coccidias (Figura 48) es importante realizar mediciones, observar la morfología de las coccidias y así determinar el género y especie para llegar a el diagnóstico definitivo. La morfología observada en las coccidias presentes en la imagen 48 es sugestiva a *Eimeria* debido a la presencia de 4 ooquistes con 2 esporozoítos¹⁸. En la figura 49 podemos observar una esquizogonia conteniendo gametos, lo cual indica la fase reproductiva de *Eimeria* spp. en el intestino del animal, la cual causa acción traumática a las vellosidades intestinales al permitir la salida de macro y microgametos.

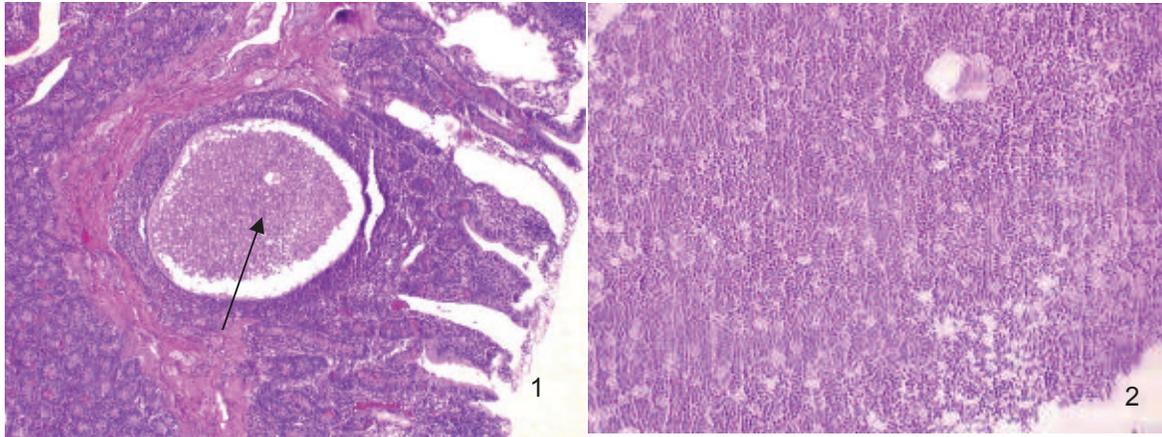


Figura 49. **Esquizogonia de *Eimeria* spp alojada en submucosa**, en tinción H-E y distintos aumentos: (1) [Flecha] 100 aumentos (2) gametos a 1000 aumentos

Inmunohistoquímica

Es una técnica basada en reacciones de unión antígeno-anticuerpo en secciones microscópicas de tejido, siendo también una técnica empleada en el diagnóstico de PTB. Una vez dada dicha unión, la reacción positiva es evidenciada mediante la acción de una enzima sobre un sustrato y la adición de un colorante, la cual es detectada mediante el microscopio fotónico; o bien, esta reacción puede ser evidenciada por fluorocromos, observados con ayuda de luz ultravioleta. Los anticuerpos utilizados en la reacción se dividen en dos grupos denominados policlonales y monoclonales (Ver apéndice, sección inmunohistoquímica).¹⁹

Uno de los anticuerpos utilizados para facilitar la observación de lesiones granulomatosas es antilisozima, ya que los macrófagos contienen lisozima. El resultado del marcaje positivo se expresa por la presencia de un precipitado dado por el cromógeno y el contraste se realiza posteriormente con un colorante como la hematoxilina. En ocasiones aunque existan lesiones granulomatosas focales estas pueden ser negativas a Z-N. (Figura 50). De las figuras 51 a 53 se observan distintas reacciones de IHQ usando diversos anticuerpos empleados en el diagnóstico de PTB tales como interleucina 10 (IL-10), proteína p35 y sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS). Para conocer el fundamento de las reacciones, ver apéndice, sección inmunohistoquímica.

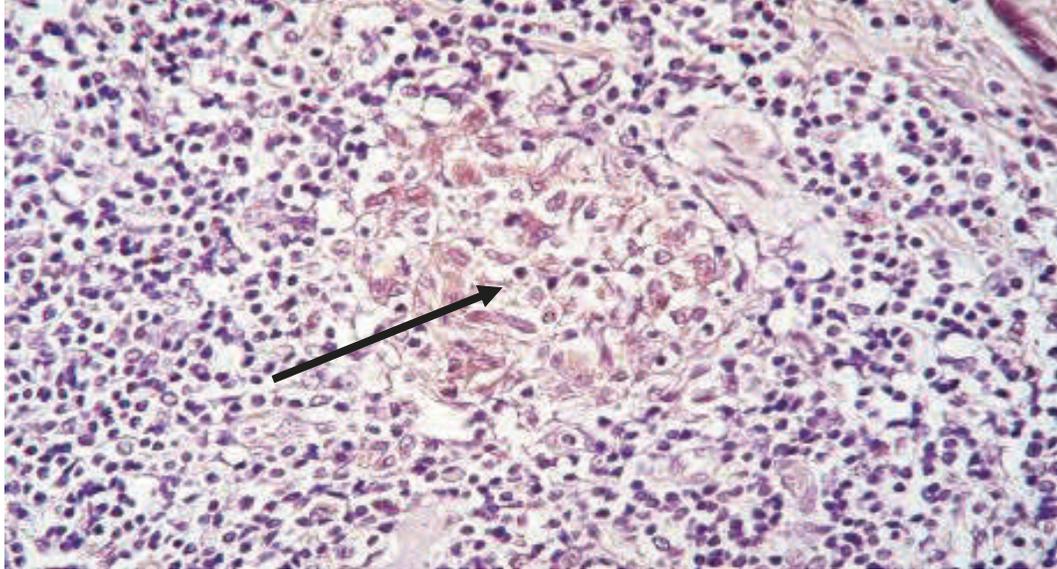


Figura 50. **Macrófagos marcados con antilisoizima en segmento interfolicular (Flecha).** Dilución 1:100. Técnica ABC (Avidin-Biotin-Complex). 400 aumentos.

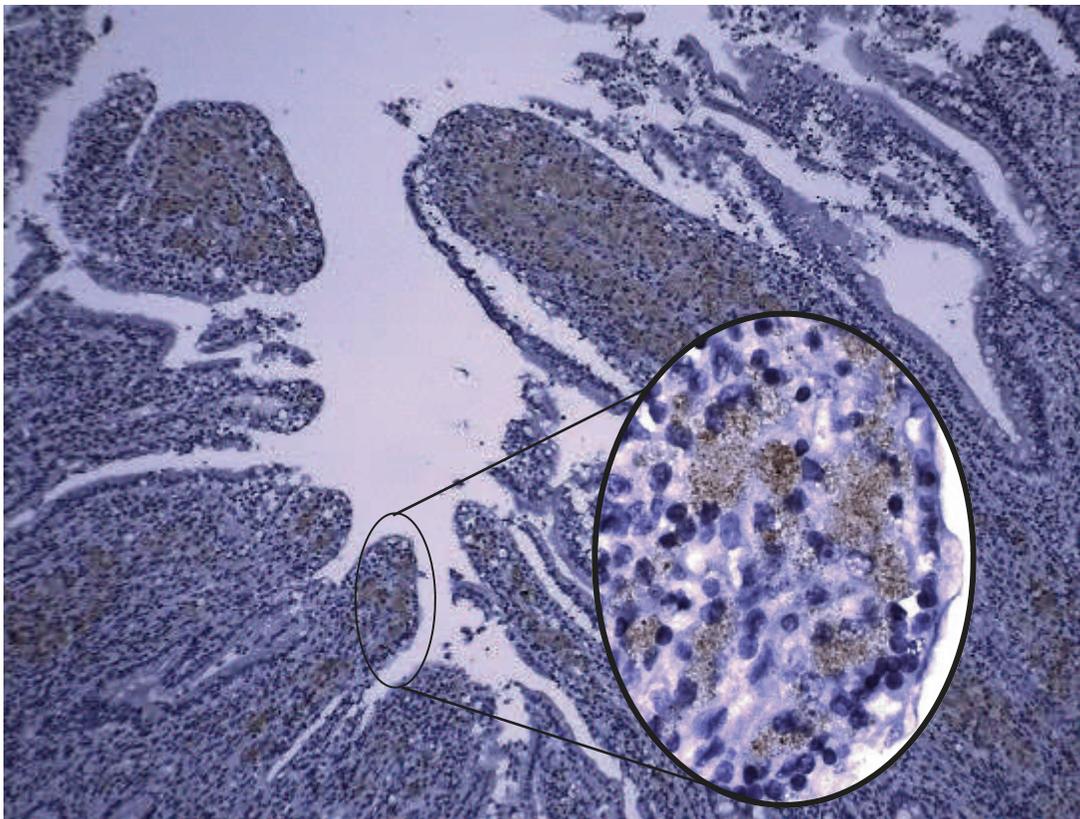


Figura 51. **Macrófagos en mucosa y lámina propia (Marrón) marcados con IL-10 en dilución 1:50.** Técnica ABC (Avidin-Biotin-Complex). 100 aumentos. Se presenta un detalle en 400 aumentos para demostrar la presencia de macrófagos marcados.

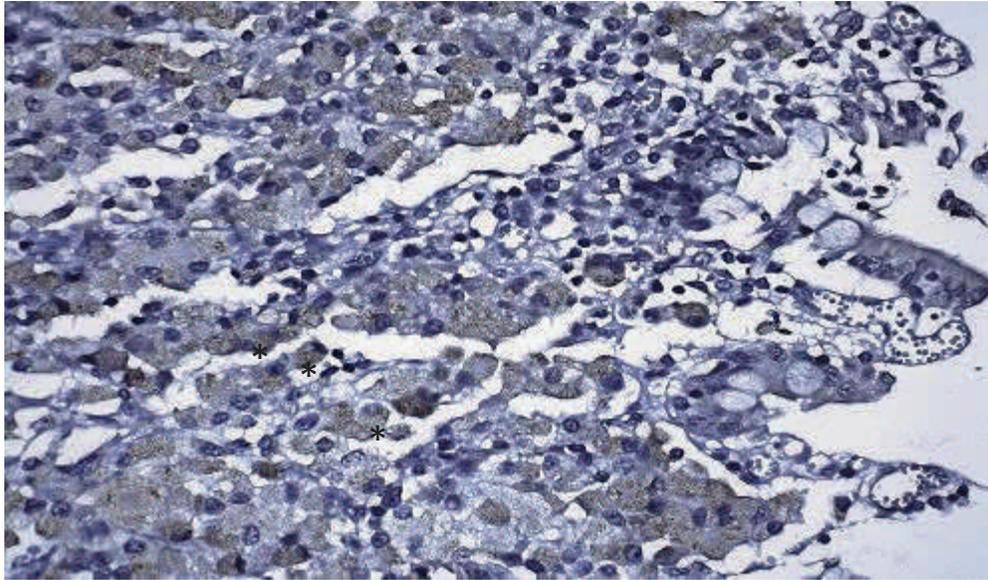


Figura 52. **Células epitelioides (Asteriscos) marcadas con Anti-P35 en dilución 1:100. Técnica ABC (Avidin-Biotin-Complex). 400 aumentos**

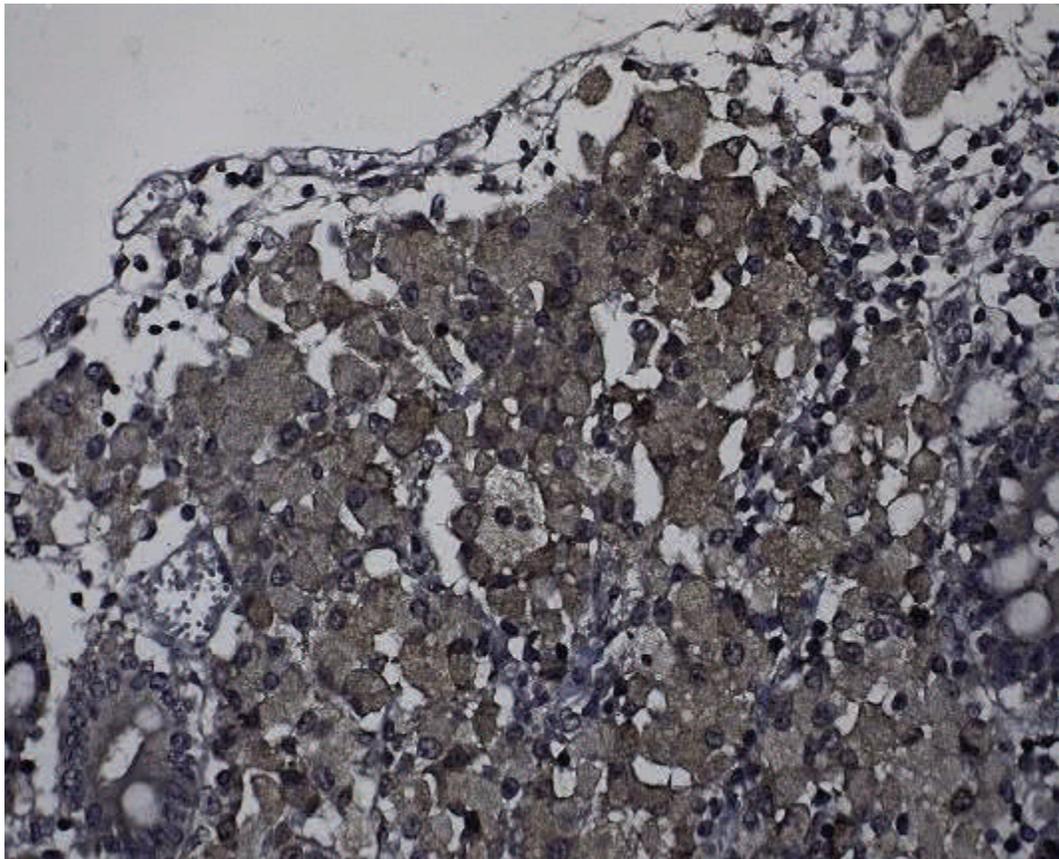


Figura 53. **Células epitelioides, que se observan de color marrón marcadas con iNOS en dilución 1:200. Técnica ABC (Avidin-Biotin-Complex). 400 aumentos**

Aislamiento bacteriológico

Es una prueba diagnóstica confirmatoria de paratuberculosis. Se realiza a partir de órganos como linfonodos o secciones de intestino, así como leche y heces³. Los medios de cultivo utilizados para el aislamiento de MAP son el Löwenstein-Jensen, Herrold y Middlebrook (Figuras 54, 55 y 56). Cabe señalar que los medios de cultivo deben ser adicionados con antibióticos y antifúngicos para evitar contaminación, además de micobactina. La micobactina es una molécula que ayuda a la captación de hierro (sideróforo), la cual es necesaria para el proceso de respiración de MAP²⁰. Esta característica marca la diferencia entre otras micobacterias que no requieren de micobactina para su desarrollo.

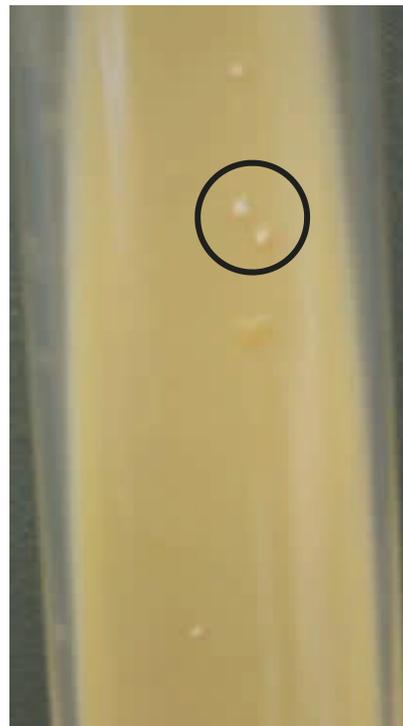
El desarrollo bacteriano puede tardar entre 8 semanas y hasta 12 meses, caracterizándose por colonias pequeñas menores 0.5 cm de diámetro de color blanco-amarillentas, redondas y convexas. Para la confirmación del aislamiento de MAP, una vez obtenido las colonias se realiza un frotis directo con la tinción de Z-N donde los bacilos se observan agrupados y de color rojos o morados (Figura 57).



Figura 54. **Medio Löwenstein—Jensen** con varias colonias de MAP (óvalos).

Figura 55.

Medio Löwenstein—Jensen con algunas colonias de MAP (Círculo)



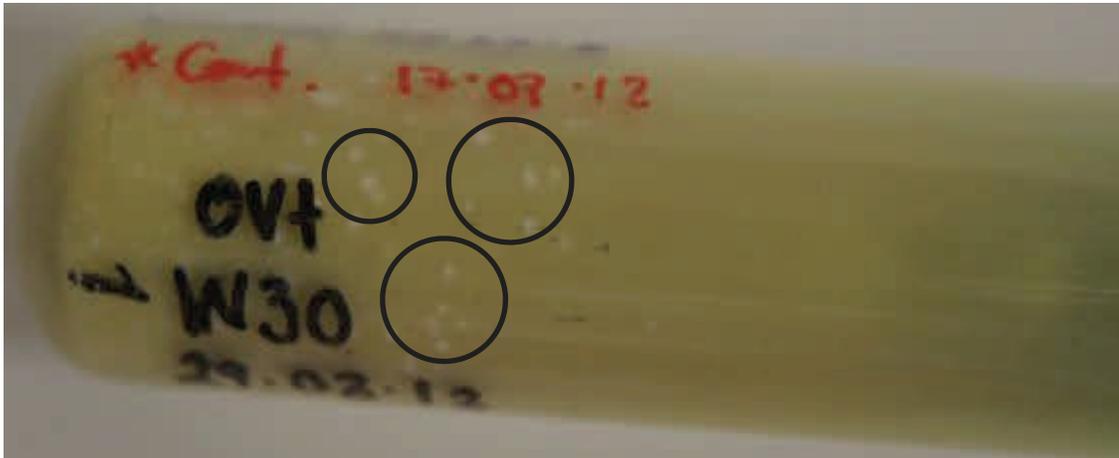


Figura 56. **Medio Löwenstein– Jensen** identificado con el número de la muestra del animal correspondiente y fecha de siembra, dicha muestra fue positiva a PTB en pruebas diagnósticas complementarias como ELISA y PCR. El desarrollo bacteriano se llevó a cabo en el fondo del medio, observándose como puntillito blanco (Círculos).

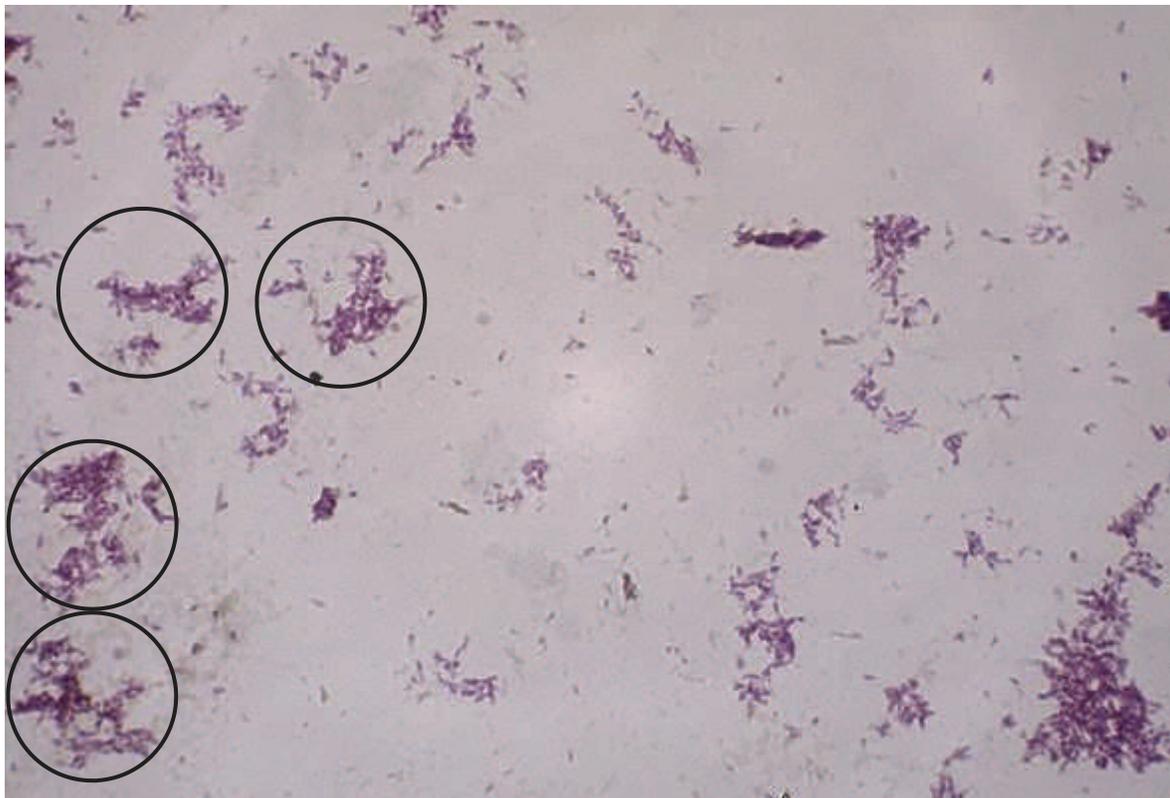


Figura 57. **BAAR agrupados sugerentes a MAP tomados a partir de cultivo.** En los círculos se observan acúmulos de BAAR causados por el factor de acordonamiento, mismo que es descrito más adelante. Tinción Ziehl – Neelsen. 1000 aumentos.

Otra utilidad de realizar frotis con tinción Z-N es en muestras de heces y en mucosa intestinal de los animales que presentan infección por PTB, donde se pueden apreciar BAAR agrupados (Figuras 58 y 59). ; aunque debido a la excreción intermitente de micobacterias, no es probable encontrarlas en animales con fases tempranas de la infección. La característica de agrupación se debe al factor de acordonamiento (Cord Factor), que es un glucolípi-do de la pared celular de MAP compuesto por trehalosa 6-6' -dimicolato y la interacción con la molécula de fosfatidilinositol, actuando también como factor de virulencia²¹ provocando una reacción granulomatosa.²² El factor de acordonamiento también se asocia a la resistencia a los antibióticos presente en micobacterias.²¹

Figura 58. **Raspado de mucosa intestinal realizado post-mortem con BAAR dispuestos en acúmulos** (Flecha). Tinción Z-N. 1000 aumentos.

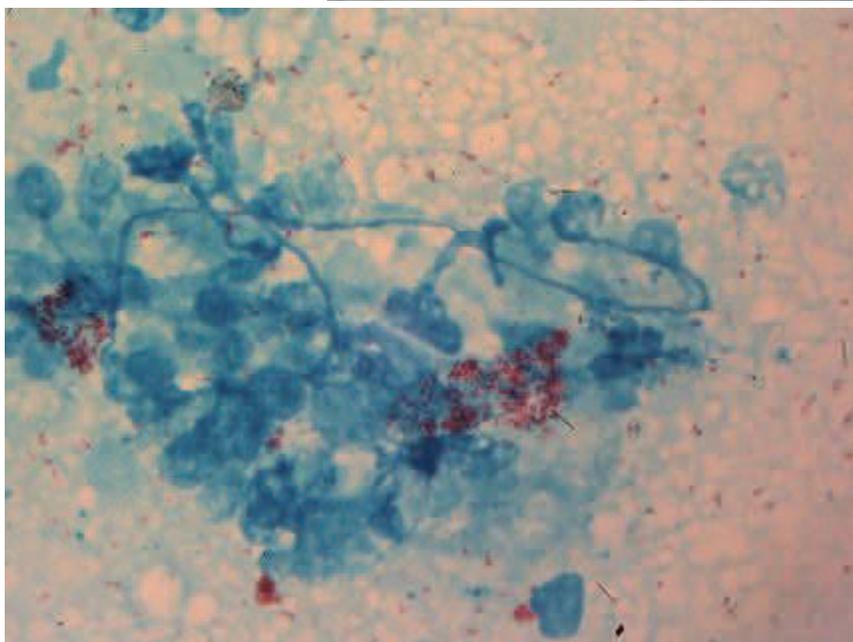
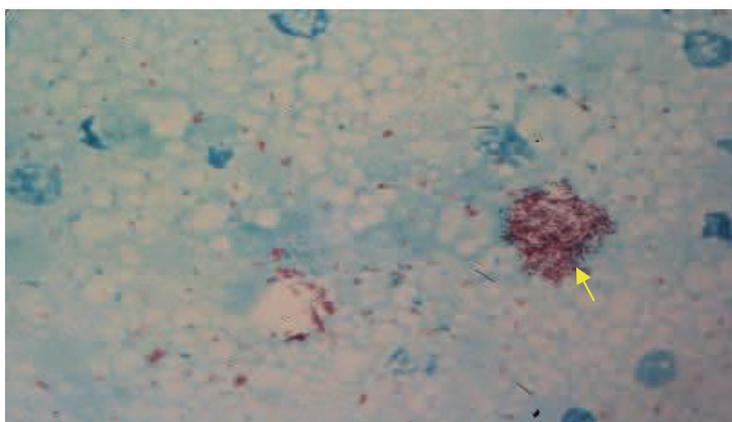


Figura 59. **Raspado de mucosa intestinal realizado post-mortem con BAAR.** Se observan en acúmulos. Tinción Z-N 1000 aumentos.

Diagnóstico Serológico

ELISA

Otra técnica diagnóstica empleada en la detección de PTB se realiza mediante serología la cual se basa en la detección de anticuerpos contra MAP, el ensayo enzimático conocido como ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)²³ se utiliza para detectar anticuerpos del animal infectado contra MAP. Los resultados en un ELISA se obtienen rápidamente, en comparación a el aislamiento bacteriológico, además de ser económico, por lo tanto puede utilizarse para realizar diagnóstico de hato²⁴. Sin embargo, la sensibilidad y especificidad son dependientes del antígeno empleado. En el cuadro 3 se observan sensibilidad y especificidad de la prueba de ELISA en diferentes especies de rumiantes^{25,26}.

Cuadro 3. Sensibilidad y especificidad de la prueba de ELISA para bovinos, ovinos y caprinos. ^{25,26}

Especie	Sensibilidad	Especificidad
Bovino	47.3% a 100%	99%
Ovino	93% al 96.8%	93% al 96.8%
Caprino	28% al 64.7%	28% al 64.7%

Al realizar la interpretación de los resultados en la prueba de ELISA primero se determina el punto de corte, el cual se establece al obtener un cociente resultante del promedio del valor de la muestra sospechosa dividido entre el promedio del valor obtenido de los sueros testigo positivos. Los valores obtenidos se determinan a través de la Densidad Óptica (Figura 60) medida a través un espectrofotómetro que por medio de un filtro registra la cantidad de luz que se difracta, es

decir, a mayor unión antígeno anticuerpo, mayor reacción colorimétrica y Densidad óptica debido a la luz absorbida. (Figuras 61, 62 y 63)

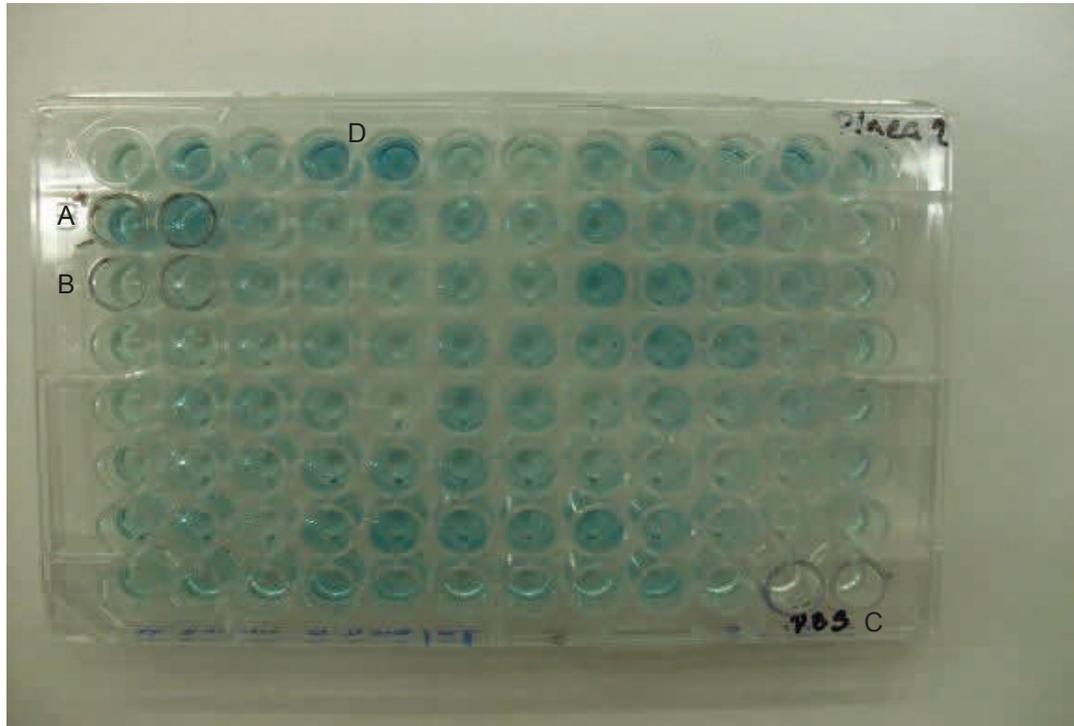


Figura 60. **Prueba de ELISA en placa de fondo plano de 96 pozos.** Puede observarse en A: Testigo positivo B: Testigo negativo C: Testigo Blanco y D: Muestras sospechosas con resultado positivo.



Figura 61. **Lector de ELISA.** Espectrofotómetro donde se realiza la lectura de la prueba.



Figura 62. Placa de ELISA ingresando al lector automatizado para su lectura.



Figura 63. Lector de ELISA conectado a una computadora. Los resultados son expresados en Densidades ópticas, los cuales son arrojados en una base de datos con la utilización de un software.

Inmunodifusión en Gel de Agar

La inmunodifusión en gel de agar o también conocida como IDGA, es otro método de detección de anticuerpos, donde en una matriz de agarosa se perfora 1 pozo central donde se coloca el antígeno soluble y 6 pozos externos que forman una roseta para colocar las muestras sospechosas, los sueros testigo positivo y negativo en volúmenes iguales. Las muestras difunden por el agar y al existir reacciones antígeno- anticuerpo en los casos positivos se observan líneas de precipitación (Figura 64). Este método posee una especificidad cercana al 100% y una sensibilidad del 50% aproximadamente en animales clínicamente afectados y del 26.7 al 29% de sensibilidad en los animales afectados subclínicamente^{17,25}. Por ser una prueba sencilla puede ser usada para probar rebaños completos contra MAP²⁷, aunque tiene el inconveniente de utilizar 10 veces más concentración de antígeno comparado con el ELISA y su uso de limita generalmente a confirmar la infección de animales con signos clínicos

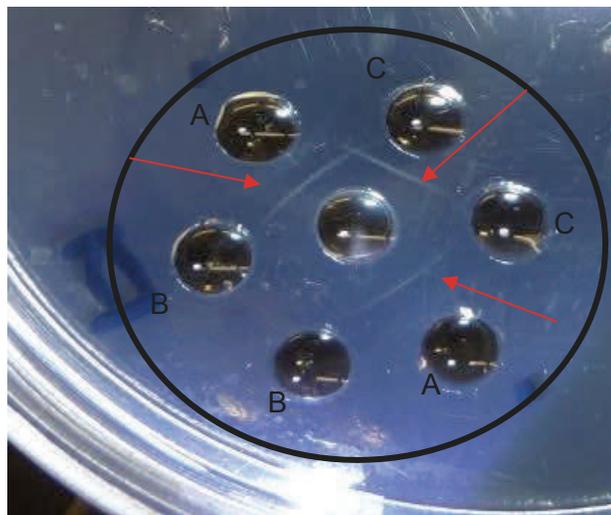


Figura 64. **IDGA positiva** (Círculo), donde las líneas de complejos antígeno-anticuerpo se observan de color blanco (Flechas rojas). A) testigos positivos, B) testigos negativos, C) sueros problema. Al centro, el pozo donde se coloca el antígeno.

Diagnóstico Molecular

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Es un método de diagnóstico molecular donde la sensibilidad y especificidad son cercanas al 100%. Se puede realizar PCR de capa leucoplaquetaria de muestras de sangre con anti-coagulante EDTA, leche, semen o heces. Cada una de las muestras requiere un protocolo de extracción y purificación de ADN de micobacterias. Uno de los juegos de iniciadores más empleado para la realización de PCR para el diagnóstico de PTB, está basado en el fragmento de inserción denominado IS900, el cual está presente en MAP²⁸. Al estudiar la secuencia de inserción IS900 por medio de análisis de polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés), se ha demostrado cierta heterogeneidad entre los aislamientos, por lo cual las cepas de Map se clasifican en 2 grupos: de lento crecimiento de origen ovino denominadas "S" (sheep) y cepas que incluyen a aislamientos obtenidos a partir bovinos, fauna silvestre y humanos, denominados "C" (cattle). Sin embargo, no existe plena correlación entre el tipo de cepa y el hospedero. Adicionalmente, se identificó un tercer tipo intermedio denominado "I"

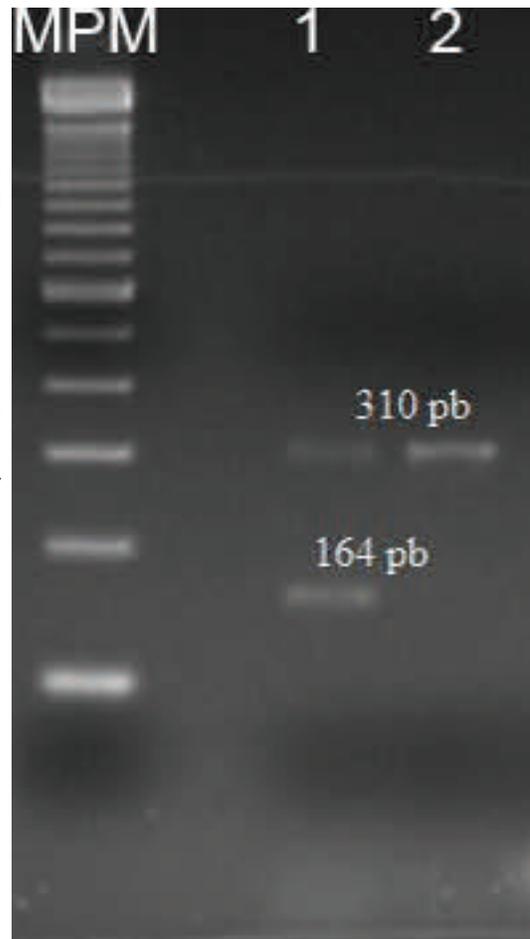
Un juego de iniciadores informados y probados para la amplificación de IS900 son P3N y P5N, los cuales amplifican un fragmento de 314 pares de bases (pb), mientras que al utilizar los iniciadores denominados DMC529, DMC531 y DMC533 de tipo específico, en las cepas de tipo "C" se amplifica un fragmento de 310 pb mientras que el producto esperado de 164 pb corresponde a la cepa "S" e "I" ^{29,30}(Figura 65)

Figura 65. **Fotografía de gel de agarosa al 1%, donde se observan productos de amplificación mediante PCR para la detección de MAP.**

MPM: Marcador de peso molecular 100pb

Carril 1. Muestra 1 donde se ven fragmentos de amplificación mediante PCR que corresponden a un producto de 310 pb que corresponde a la cepa tipo "C" y a su vez también se amplifica un producto de 164 pb considerada como cepa "S" y/o "I" al utilizar iniciadores de tipo específico.

Carril 2. Muestra 2 donde se observa un producto de amplificación mediante PCR utilizando los iniciadores de tipo específico donde el producto obtenido de 310 pb corresponde a la cepa de tipo "C".



Análisis de Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP)

Es otra técnica de diagnóstico molecular donde se utilizan enzimas de restricción para realizar la identificación de ciertos *Loc*i en el genoma de MAP. Puede existir variantes en las localizaciones de estos *Loc*i, lo cual hace que existan patrones distintos entre cepas bacterianas de MAP³¹. Estas diferencias en los patrones son denominadas conforme al origen genético: C, S e I, mencionadas anteriormente³². Estas variaciones en los patrones se identifican con una sonda generada a partir de la secuencia *IS900*. La lectura de los patrones se realiza a través de cámaras y *Software* especial como el denominado Gel Compare (Applied Maths, Kortrijk, Belgium)³¹ con la finalidad de encontrar diversos perfiles para determinar la especie animal de origen de la cepa infectante, así como infección de MAP interespecie tanto en un mismo lugar como en diferentes regiones geográficas. En la figura 66 se muestra un análisis realizado mediante RFLP.

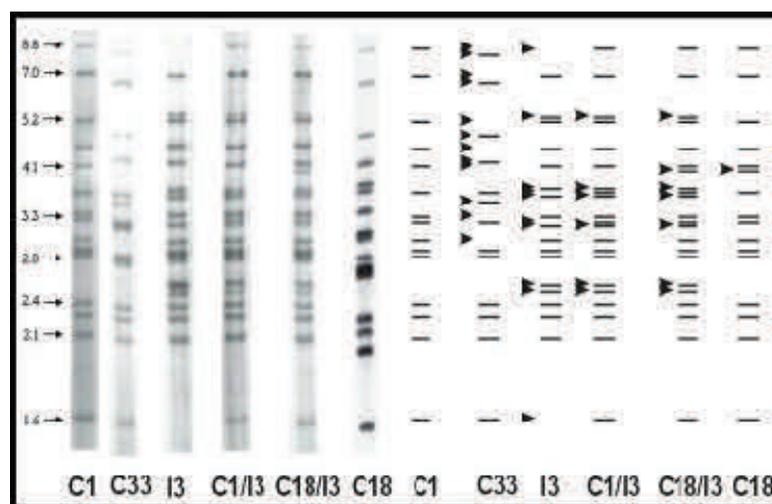


Figura 66. RFLP usando ADN de Map, basado en la secuencia *IS900* digerida con la endonucleasa *BstEII* de ADN de Map. Los tipos de RFLP encontrados son: C1, C33, I3, C1/I3, C18 y C18/I3.

Una vez que se conocen las características de las pruebas diagnósticas también es importante considerar el tiempo de obtención de resultados y el costo de cada prueba.

En el cuadro 4 se presenta una comparación de las pruebas empleadas en el diagnóstico de MAP, donde podemos observar los días de obtención de resultado y el costo que tienen las pruebas

Cuadro 4. Días empleados en la obtención de resultados y costos de las pruebas complementarias para MAP

Prueba complementaria para Diagnóstico de PTB	Días de obtención de resultados	Costo por prueba
Aislamiento bacteriológico	8 a 52 semanas [§]	+++
ELISA	2-3 días	++
IDGA	2-3 días	++
PCR	2 días	++++
RFLP	7 días a 52 semanas [‡]	++++

§: Dependiente de la especie de origen

‡ Dependiente del método de extracción de ADN utilizado.

Revisión sistemática

Para la realización del presente trabajo se utilizaron fotografías que se han tomado durante 20 años del acervo del Dr. Gilberto Chávez Gris, así como de trabajos de investigación en proceso. El desarrollo del presente atlas se realizó iniciando con una introducción de la enfermedad, su agente causal, los signos clínicos de la enfermedad, implicaciones económicas; así como de salud pública. Posteriormente se realizó el capítulo de diagnóstico macroscópico de la enfermedad desde que un animal es remitido muerto o vivo para su eutanasia a la sala de necropsias, después se presentó el capítulo donde se tratan las observaciones macroscópicas para realizar la toma de muestra y su posterior confirmación histopatológica; del mismo modo se plantean diagnósticos diferenciales a PTB, ya sea por el tipo de lesión o de la edad del animal, o bien, asociado con otros procesos infecciosos; posteriormente se muestra el capítulo de diagnóstico anatomopatológico, donde se presentan imágenes de lesiones microscópicas compatibles con PTB, su clasificación convencional, para finalizar con la mención de las diversas pruebas que pueden ser utilizadas para el diagnóstico de PTB como son el aislamiento bacteriológico, ELISA, IDGA, PCR y RFLP y algunas consideraciones técnicas para su realización asentadas en un apéndice de éstas pruebas complementarias, donde se mencionan los protocolos de dichas técnicas y los reactivos requeridos.

Finalmente se revisa la problemática económica y social que existe al tener PTB en México y la repercusión que tiene si no es diagnosticada a tiempo.

Análisis de la información

La paratuberculosis es producida por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, que es un bacilo ácido-alcohol resistente, y en la actualidad no se cuenta con un tratamiento eficiente para ésta enfermedad. Es causa de baja producción láctea y bajo rendimiento en canal de rumiantes dedicados a producción así como de desecho precoz. Esto causa pérdidas económicas estimadas en \$10,345 por vaca al año derivadas por desecho prematuro, infertilidad, baja en la producción láctea y en la engorda, costos de servicio veterinario y mortalidad del ganado.³³. La enfermedad se distribuye mundialmente y está presente en México. MAP es causante también de la Enfermedad de Crohn en humanos^{7,8,9,10,11,34}.

Es importante destacar la posibilidad de contagio entre animales debido a la mala lotificación de los animales susceptibles, falta de cuarentena y áreas exclusivas tales como enfermería y estercoleros mal ubicados en las unidades de producción³⁵(Figura 67).



Figura 67. Hay que evitar usar los corrales como estercoleros y favorecer la limpieza de éstos.

En muchas ocasiones, la PTB puede diseminarse fácilmente por fallas en el diseño y la construcción de instalaciones pecuarias debido a la falta de previsión del uso de barreras contra los vientos dominantes, declive del suelo para facilitar el desagüe y evitar la contaminación a producciones aledañas, así como por deficiencias en las prácticas de bioseguridad de los sistemas de producción tales como la inexistencia de tapetes sanitarios en las entradas de cada área, así como, compartir implementos entre una o más áreas, por ejemplo: palas, carretillas, bieldos, guantes, cuerdas etc., siendo éstos un vector fomite de la enfermedad.

Para evitar la diseminación de MAP en el ambiente se sugiere llevar a cabo un manejo de excretas donde se pretenda eliminar a MAP, ya sea con ayuda de composta o biodigestión, debido a que en el proceso de descomposición se alcanzan temperaturas mayores a 60°C que pueden destruir microorganismos patógenos tales como *Mycobacterium*³⁶.

Para evitar o disminuir PTB, el diagnóstico temprano de la enfermedad, las medidas de bioseguridad y control son importantes en una producción pecuaria, y así obtener un rendimiento económico óptimo de producción animal. Es recomendable que exista en México un programa voluntario de prevención y erradicación de PTB, en cual la eliminación de animales portadores subclínicos será decisión del productor debido a que pueden tener un potencial genético valioso, debido a esta flexibilidad es posible llevar a cabo medidas de control en un hato, dado que hay que recordar que la PTB sin aplicaciones de medidas de control y bioseguridad es un riesgo a la salud animal y pública³⁶.

El diagnóstico de PTB por métodos anatomopatológicos es factible si el Médico Veterinario está capacitado y al realizar la necropsia reconoce las lesiones macroscópicas sugerentes a PTB y junto con las lesiones microscópicas puede establecer un diagnóstico

final. Los estudios anatomopatológicos deben verse como una inversión en un sistema de producción y no como una pérdida, pues es una alerta de la presencia de PTB, la cual, de no detectarse a tiempo puede mermar los ingresos de una empresa pecuaria.

Tomando en cuenta el diagnóstico diferencial para PTB pueden presentarse casos atípicos asociados a otras enfermedades bacterianas tales como colibacilosis, salmonelosis o parasitarias como coccidiosis y tricuriasis, mismas que pueden generar el engrosamiento y hemorragias en mucosa intestinal. Esto puede generar confusión al momento de realizar la necropsia y el diagnóstico bacteriológico.

No es recomendable basar el diagnóstico de PTB con observaciones clínicas en ganado que presenta diarrea intermitente, dado que no siempre se presenta el cuadro clínico, por lo cual se recomienda realizar pruebas complementarias, pero, al hacer un raspado rectal para la realización de tinción ZN, sólo se puede encontrar MAP en el recto en fases avanzadas de PTB. Además, la técnica realizada para la obtención del raspado rectal es invasiva y produce laceraciones e infecciones secundarias.

Sin embargo, existen casos en donde no se presentan las lesiones clásicas de PTB y el animal afectado conserva una condición corporal que no denota un estado de enfermedad (Figura 68); entonces estos animales al convertirse en portadores asintomáticos de MAP se convierten en un diseminador potencial de BAAR. En esa premisa radica la importancia de la realización de pruebas diagnósticas complementarias como aislamiento bacteriológico, ELISA, IDGA, PCR y RFLP, donde lo recomendable es utilizar más de una prueba a la vez, debido a que el rango de sensibilidad y especificidad es variable entre las pruebas y esto depende en gran medida de la etapa de infección en la que se encuentra el animal, además del tipo de muestra obtenida para su diagnóstico, todo lo anterior nos provee de más infor-



Figura 68. **Semental ovino en exhibición y cabra amamantando, con una condición corporal adecuada, que podrían tener paratuberculosis de manera subclínica.**

mación para concluir si el animal está infectado, si está eliminando micobacterias en heces, leche, semen o si está cursando con una bacteremia. Debido a lo anterior, siendo mayor el tiempo de espera y el costo económico, el diagnóstico definitivo de PTB se realiza con el aislamiento bacteriológico a partir de heces o leche, sin embargo, se pueden realizar pruebas diagnósticas como ELISA, IDGA, PCR y RFLP, las cuales tienen una sensibilidad y especificidad altas, obteniéndose un diagnóstico preciso.

Aunque es mayor el tiempo de espera y mayor el costo económico, el diagnóstico definitivo de PTB se realiza con el aislamiento bacteriológico a partir de heces o leche, sin embargo, se pueden realizar las pruebas diagnósticas como ELISA, IDGA, PCR y RFLP, las cuales tienen una sensibilidad y especificidad altas, obteniéndose un diagnóstico preciso.

Un problema de suma importancia en México es la presencia de tuberculosis bovina (TB), siendo una enfermedad de campaña (NOM-031-ZOO-1995) en la que para realizar las pruebas de intradermorreacción comparativa en pliegue caudal y cervical se emplean antígenos inespecíficos denominados Derivado Proteico Purificado Bovino (PPD-B) y Derivado Proteico Purificado Aviar (PPD -A) y debido a la homología genética que presentan TB y

PTB, se producen reacciones cruzadas en infecciones de paratuberculosis con reacción intrademostración positiva contra TB. De igual forma, si se vacunan bovinos contra PTB con las vacunas que se encuentran disponibles en el mercado europeo (Gudair® , Farco Veterinaria S.A. España), las cuales causan reacción positiva contra los antígenos utilizados en las pruebas de campaña de TB, y éstas podrían arrojar resultados falsos positivos. Sin embargo, en México, en el caso de ovinos y caprinos no se tiene reportado la presencia de tuberculosis; los cuales al no estar en campaña de TB, son candidatos al empleo de vacunas contra PTB para el control de la enfermedad. También sería importante replantear la campaña de Prevención y Erradicación de Tuberculosis Bovina para evitar que exista diseminación de PTB en ganado bovino empleando vacunación

Por los motivos expuestos en el presente análisis de la información es de suma importancia difundir el conocimiento acerca de la enfermedad apoyado en la explicación sobre la patogenia de PTB, empleando material visual y textual compilado para el diagnóstico de la enfermedad en etapas tempranas así como en etapas ya avanzadas. Esta necesidad se está cubriendo en este Atlas, ya que es un auxiliar para realizar el diagnóstico de PTB que sea utilizado por Médicos Veterinarios, estudiantes de Medicina Veterinaria, Técnicos en Diagnóstico y Productores Pecuarios interesados en el tema.

Para expresar dudas y comentarios acerca del presente trabajo de tesis con la finalidad de enriquecerlo favor de comunicarse vía correo electrónico con el autor y sus asesores:

Dr. Gilberto Chávez-Gris: gris@unam.mx

M. en C. Edith Maldonado Castro: macae09@hotmail.com

Azaf Moreno Torres: azafmt_871027@hotmail.com

Abreviaturas

ABC. Avidin-Biotin-Complex (Complejo Avidina-Biotina)

BAAR. Bacilos Ácido Alcohol Resistentes

EC. Enfermedad de Crohn

H-E. Hematoxilina y Eosina.

IDGA. Inmunodifusión en Gel de Agar

IFN- γ . Interferón gamma

IgM. Inmunoglobulina M

IHQ. Inmunohistoquímica

IL-10. Interleucina 10

iNOS. Sintasa de Óxido Nítrico Inducible

MAP. *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis

MPM. Marcador de peso molecular

pb. Pares de bases

PCR. Reacción en Cadena de la Polimerasa

PTB. Paratuberculosis

TB. Tuberculosis

VB. Verde Brillante

ZN. Ziehl– Neelsen

Apéndice

Inmunohistoquímica

Anticuerpos policlonales y monoclonales¹⁹

Los anticuerpos policlonales se producen inmunizando animales con antígenos purificados, específicamente conejos, caballos, cabras y aves. Una ventaja de los anticuerpos policlonales es la identificación de varios epítopes de una proteína blanco, característica que los hace poseer mayor sensibilidad. Sin embargo, esto da menor especificidad y mayor probabilidad de obtener falsos positivos en la IHQ.

Los anticuerpos monoclonales son producidos en ratones. Los ratones son inoculados con antígeno purificado, posteriormente son tomados linfocitos B directamente del bazo y son fusionadas con células de mieloma de ratón. Este procedimiento da lugar a la formación de un hibridoma, que es una célula neoplásica inmortal productora de inmunoglobulinas específicas para un solo epítipo. La ventaja de los anticuerpos monoclonales es su alta especificidad, la cual reduce la posibilidad de reacción cruzada contra otros antígenos. Sin embargo, en algunos casos es difícil determinar si la reacción fue hacia el antígeno deseado o hacia epítopes resultantes del proceso de fijación.

Anticuerpos utilizados en las técnicas de inmunohistoquímica citadas en la presente tesis:

Interleucina 10 (IL-10)³⁸

Es una citocina secretada por macrófagos, linfocitos T, linfocitos B, macrófagos y keratinocitos. También se conoce como factor de desactivación de los macrófagos.

Los macrófagos desempeñan un papel central en los procesos infecciosos como blanco para los agentes patógenos y en la activación del sistema inmune. IL-10 es un potente factor inmunosupresivo. Algunos patógenos intracelulares específicamente tienen como blanco a los macrófagos para disminuir la respuesta inmune del hospedero y así impedir su eliminación. Además, bacterias específicas como *Mycobacterium* spp. y *Listeria monocytogenes* pueden sobrevivir y replicarse en macrófagos mientras inducen la expresión de IL-10.

IL-10 puede inhibir la producción de algunas citocinas tales como IL-2, Interferón gamma (IFN γ), factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), IL-4, IL-3, IL-1 y el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF). Así como una variedad de moléculas de superficie son reguladas por IL-10 tales como el complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC clase II). IL-10 también inhibe la producción de oxígeno reactivo e intermediarios del nitrógeno en macrófagos activados, así como la proliferación de linfocitos T macrófago-dependiente.

Proteína p35²⁶

Es una proteína estructural presente en la membrana y descubierta en *Mycobacterium leprae* con un peso molecular de 35 KDa, de ahí su denominación. También se expresa en MAP y en *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. Sin embargo, esta proteína no se expresa en *Mycobacterium tuberculosis* ni en *Mycobacterium bovis*, siendo esta característica útil como molécula específica de PTB

Las condiciones para la expresión de p35 en niveles altos son: poca oxigenación en el medio y alta osmolaridad, tal como sucede en el intestino de los rumiantes. Su expresión disminuye en medio con un pH de 2.0, demostrado en medios de cultivo bacteriológico. A esta

proteína se le relaciona con la respuesta inmune de tipo celular, generando la estimulación linfocitaria y la producción del IFN- γ .

Sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS)^{39,40}

El óxido nítrico (NO) es un importante señalizador molecular relacionado con diversos mecanismos patofisiológicos en sistema cardiovascular, donde actúa como regulador del tono de los vasos sanguíneos; en sistema nervioso actúa como un mediador similar a neurotransmisores; y en sistema inmunológico, actuando como una parte importante en la inmunidad del hospedero. También puede actuar como una especie reactiva de oxígeno (Radical libre NO $^{\circ}$) actuando como un agente citotóxico, particularmente en desórdenes inflamatorios.

La producción de NO es catalizada por enzimas denominadas sintasas de óxido nítrico, de las cuales se conocen las siguientes: eNOS (Endotelial), iNOS (Inducible) y nNOS (Neuronal).

iNOS es inducido mediante citocinas inmunoestimulantes como CD14 (receptor de LPS) y el interferón gamma (IFN γ), productos bacterianos o infección en células tales como endotelio, hepatocitos, monocitos, mastocitos, macrófagos y células musculares lisas; generándose independientemente de las concentraciones de calcio extracelular. Se expresa como defensa ante agentes bacterianos y virales por las células citadas anteriormente.

Su uso en el diagnóstico de paratuberculosis radica en la confirmación de individuos positivos a MAP, analizando las reacciones de positividad en macrófagos, células epitelioides y células gigantes en linfonodos ileocecales y mucosa ileal.

Toma y envío de muestras sospechosas a paratuberculosis para realizar su aislamiento bacteriológico⁴¹

Debe procurarse realizar en animales vivos la toma de muestra de la forma más sencilla posible y con métodos poco invasivos.

Las muestras remitidas al laboratorio deben cumplir una serie de condiciones generales de las que depende la calidad y eficiencia de los resultados microbiológicos:

- Formular la petición bacteriológica correcta de aislamiento de micobacterias
- Seleccionar la muestra más representativa y rentable, recogida de forma estéril en cantidad suficiente
- No deben utilizarse fijadores ni conservadores. Tampoco es recomendable emplear escobillones, hisopos o torundas de algodón para realizar la toma de la muestra.
- Las muestras se deben recoger y enviar en contenedores estériles, de un solo uso y con cierre hermético.
- El procesamiento de la muestra debe ser inmediato para evitar el sobrecrecimiento de la microbiota acompañante; de lo contrario, debe mantenerse en refrigeración(2-8 °C) hasta dicho momento
- No se recomiendan las recolecciones de 24 horas por la posible dilución de las muestras con una mayor concentración bacilar y el aumento de la contaminación bacteriana y fúngica.

- Para enviar las muestras a realizar aislamiento bacteriológico dependerá de su origen:

Tejidos u órganos:

- Para evitar la deshidratación de las muestras de biopsia, éstas deben enviarse al laboratorio en solución salina fisiológica o bien, en medio líquido de Middlebrook 7H9. Nunca debe utilizarse formol ya que haría inviables a las micobacterias. Por ello, deben distinguirse claramente las muestras enviadas al laboratorio de patología y al de bacteriología.

Heces

- Se recomienda el estudio de tres muestras de un mismo animal de al menos 1 g cada una. Su procesamiento deberá ser inmediato. Para ello se añaden 5 ml de medio Middlebrook 7H9 o solución salina fisiológica a la muestra antes de iniciar la digestión-descontaminación pertinente, misma que es tratada en el procesamiento de muestras del presente apéndice.

Leche

- Tomar la muestra asépticamente, limpiando y desinfectando previamente la ubre con yodopovidona al 2%. Mantener la muestra en refrigeración (2-8°C) y procesar inmediatamente.

Procesamiento de muestras para aislamiento bacteriológico²⁵

Para muestras individuales de heces o tejidos:

- Pesar 5 g de muestra (heces, raspado de mucosa intestinal, raspado de linfonodos con descapsulación previa) y colocarla en un tubo tipo Falcon de 50 ml.
- Añadir en esterilidad cuanto baste para 45 ml de HCP al 0.75 % en el caso de heces y al 1% en muestras de tejido.
- Homogenizar perfectamente la muestra y se agitan durante 30 minutos hasta que el material más grosero se desintegre (sobre todo en muestras de heces de cabras y borregos)
- Reposar durante 30 minutos hasta que sedimenten las partículas grandes.
- Recoger con pipeta estéril 20 ml de la interfase (fase intermedia entre la fase líquida y la fase donde sedimentan las partículas más grandes de la materia orgánica) y transferirlo a otros tubos Falcon estériles de 50 ml.
- Dejar reposar los tubos durante toda la noche.

Para inocular medios con base de huevo:

- Recoger con pipeta Pasteur desechable aproximadamente 1ml de homogeneizado del fondo del tubo Falcon que se dejó reposar toda la noche.

Para inocular medios sintéticos

- Centrifugar a 5000 RPM durante 15 minutos y decantar el sobrenadante con cuidado para no perder el sedimento obtenido.
- Añadir 10ml de agua estéril, homogeneizar y proceder igual que en paso anterior.
- Resuspender el sedimento con 1ml de agua grado biología molecular estéril.

Para procesar grupos de muestras:

- Pesar 1 g de 5 muestras distintas, colocarlos en un tubo de 50 ml.

A partir de aquí se procede igual que con las muestras individuales.

Siembra de las muestras en medios de cultivo

Los medios de cultivo podrán ser comerciales o de elaboración propia :

- Medios con base de huevo:

Herrold (HEYM) con micobactina J (MJ)	2 tubos y 1 sin micobactina
Lowenstein-Jensen (LJ) con MJ	2 tubos y 1 sin micobactina

Cuando técnicamente se considere oportuno también se utilizarán medios sintéticos:

Middlebrook 7H11 (M7H11) con OADC	2 tubos
Middlebrook 7H9 con OADC	2 tubos

- Inocular con una pipeta Pasteur desechable 8 gotas aproximadamente obtenidas del sedimento obtenido en cada tubo Falcon.
- Cerrar los tubos sin apretar flameando previamente el tapón y la boca del tubo
- Colocar los tubos en una gradilla y meterlos en posición inclinada en una estufa a 35° C \pm 2°C sin humedad durante una semana o hasta que se seque el inculo.
- Una vez secos comprobar el buen estado de los tubos y cerrarlos completamente (si alguna muestra estuviese contaminada se repetirá la siembra de la misma).

Se dejan el tiempo estimado de incubación para el crecimiento de las micobacterias, que en el caso de Map es de 14 y hasta 50 semanas.

Interpretación de los resultados

Los cultivos se considerarán positivos cuando se detecte la presencia de colonias de morfología compatible con *Map* y posteriormente se realice un frotis directo de la colonia con tinción Z-N positiva y PCR positiva.

Preparación de reactivos para la descontaminación:

HCP (0.75 %)

N-cetil-piridinium 7.5 g

Agua destilada 1 L

**Preparación de medios de cultivo para *Mycobacterium avium*
subsp. *paratuberculosis***

Medio de Löwenstein-Jensen

Ingredientes:

Medio base	18 g
⇒ Glicerina	6 ml
⇒ Micobactina J	1 mg
⇒ Agua destilada	300 ml
⇒ Huevos	6 piezas
⇒ Cloranfenicol	100 mg
⇒ Anfotericina B	50 mg/ml
⇒ Nistatina	100 mg/ml

- Mezclar el medio base, la glicerina y el agua, calentar hasta su disolución, ajustar el pH a 7.0 y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.
- Dejar que baje la temperatura del medio a 50°C aproximadamente y añadir los antibióticos, el antifúngico y añadir la micobactina disuelta en etanol, agregar los huevos enteros que previamente habrán sido lavados y mantenidos en etanol al 70% durante 2 h.
- Dispensar el medio de cultivo en tubos de cristal estériles a razón de 8-10 ml por tubo.
- Coagular el medio en estufa a 90±5 °C durante 4 h. Mantener en estufa a 37±2 °C con los tapones sin apretar hasta la desaparición del líquido de superficie. Cerrar totalmente los tubos.
- Guardar a 5±3°C hasta su utilización (no más de 30 días, ya que los antibióticos disminuyen su efectividad).

Medio de Herrold

Ingredientes:

- ⇒ Glicerina 27 ml
- ⇒ Micobactina J 2 mg
- ⇒ Agua destilada 870 ml
- ⇒ Huevos 6 yemas
- ⇒ Peptona 9 g

- ⇒ NaCl 4.5 g
 - ⇒ Bacto agar 15.3 g
 - ⇒ Extracto de carne 2.7 g
 - ⇒ Piruvato sódico 4.1 g
 - ⇒ Verde de malaquita al 2% 5 ml
 - ⇒ Cloranfenicol 100 mg/ml
 - ⇒ Anfotericina B 50 mg/ml
 - ⇒ Nistatina 100 µg/ml
- Mezclar el agua, la peptona, el NaCl, el bacto-agar, el extracto de carne y la glicerina, calentar hasta su disolución, añadir la micobactina disuelta en etanol y el piruvato.
 - Ajustar el pH a 7.5 y esterilizar con autoclave durante 15 min a 121°C.
 - Dejar que baje la temperatura a 50°C aproximadamente y añadir las yemas de 6 huevos lavados y esterilizados mediante inmersión en etanol al 70% durante 2 h.
 - Una vez que esté todo bien disuelto se añade el verde de malaquita y los antibióticos.
 - Servir el medio de cultivo en los tubos de cristal estériles a razón de 9-10 ml por tubo, dejándolos en posición inclinada hasta su coagulación.
 - Mantener en estufa a 37 °C con los tapones sin apretar hasta la desaparición del líquido de la superficie. Cerrar totalmente los tubos. Guardar a 5±3 °C hasta su utilización

Medio Agar Middlebrook 7H9 / 7H11

Ingredientes:	Middlebrook	Middlebrook
	7H11	7H9
Medio base	15g	15g
Glicerina	5g	5g
Micobactina J	2 mg	2 mg
Agua calidad biología molecular estéril	900 ml	900 ml
Penicilina sódica	100.000 U.I	100.000 U.I
Cloranfenicol	100 mg	100 mg
Anfotericina B	50 mg	50 mg
Bacto agar	_____	15 g
Ácido Oléico, Albúmina, Dextrosa y Catalasa (OADC)	100 ml	100 ml

- Mezclar la glicerina, medio base (M7H9 o M7H11) y el agua ; añadir la micobactina disuelta en etanol y esterilizar en autoclave durante 15 min. Dejar enfriar y añadir los antimicrobianos y el enriquecimiento (OADC).
- Servir el medio en tubos de cristal estériles a razón de 8 ml por tubo. Dejar enfriar hasta su solidificación.
- Mantener en la estufa a 35 ± 2 °C con los tapones sin apretar hasta la desaparición del líquido de la superficie. Cerrar totalmente los tubos. Guardar a 5 ± 3 °C hasta su utilización.

Procedimiento para realizar Inmuno Difusión en Gel de Agar²⁹

- Disolver 1 g de agarosa en 100 ml de PBS, calentar hasta su perfecta disolución, evitando la formación de burbujas verter 10-12 ml de la solución en placas de Petri de 10 cm de diámetro, dejar solidificar a temperatura ambiente.
- Perforar las placas de Petri mediante un sacabocados que forma 1 rosetas con 6 pocillos periféricos y uno central de 3 mm de diámetro cada uno.
- Depositar en el pocillo central 30µl de una solución de antígeno protoplásmico de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* PPA-3 (Allied, Mo, USA) a una concentración de 4 mg/ml en agua destilada. En los 2 de los pozos periféricos agregar los sueros controles positivo (30 µl), mientras que en los cuatro pozos restantes depositar 30 µl de los sueros problema.

Preparación de Reactivos utilizados en la prueba de ELISA

Solución amortiguadora de carbonato

- Carbonato de sodio (Merck, Darmsdat, Germany) 5.3 g
 - Agua destilada 1000 ml
- ⇒ Ajustar el pH a 9.6

Suspensión de *Mycobacterium phlei*

- M. phlei 5 g
- Solución salina (NaCl al 0.85%) 1000 ml

Amortiguador citrato 0.05 M

Solución A:

- Ácido cítrico monohidratado 22.97 g
- Agua destilada 1000 ml

Solución B:

- Citrato sódico tribásico 29.4 g
- Agua destilada 1000 ml

⇒ Mezclar 600 ml de Solución A + 479 ml de Solución B, agregando agua destilada c.b.p. 2 L.

⇒ Ajustar el pH a 4 al momento de utilizarlo

Antígeno

- Antígeno PPA-3 (Lab. Allied) 0.04 mg/ml

PBS-TG (Solución salina de fosfatos - Tween gelatina)

- NaCl 8 g
- KCl 2 g
- Fosfato dibásico de sodio (Golden Bell. México) 1.44 g
- Fosfato monobásico de potasio (Baker, Edo de Méx., México) 0.24 g

- Agua destilada c.b.p.1L
- ⇒ Ajustar el pH a 7.4
- Tween 80 (Merck Hohenbrunn, Germany) 0.5ml
- ⇒ Esterilizar en autoclave a 125°C/25 minutos
- Gelatina (Bloxon. México) 1 g

Sustrato ABTS

- ABTS (Sigma, Mo. USA) 5.48 mg
- Amortiguador citrato 50 ml
- ⇒ Añadir 19 μl de la solución: 1:25 H_2O_2 (10 μl H_2O_2 de 30% v/v en 120 μl de agua destilada)

Inmuno Ensayo Enzimático²⁹

- Previamente a la realización de esta técnica se lleva a cabo la fijación del antígeno a los pozos de la placa, depositando 100µl/pozo del antígeno pro-topoplásmico de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* PPA-3 (Allied,Mo,USA) a una concentración de 0.04 mg/ml en buffer carbonato
- La placa se mantiene a una temperatura de 4°C durante toda la noche. Los sueros problemas son adsorbidos con una suspensión de *Mycobacterium phlei* (Allied,Mo,USA) a una proporción de 1:1 y de igual forma se mantienen a 4°C durante toda la noche.
- Después de lavar con PBS-TG las placas sensibilizadas con el antígeno, se depositan 100 µl/pozo del suero problema adsorbido con una dilución 1:100 de PBS-TG. En cada una de las placas se coloca un suero testigo positivo y negativo, igualmente adsorbidos con *M phlei*. Las placas se dejan incubar en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 2 h. Después de lavar tres veces las placas con PBS-TG se agrega a cada pozo 100 µl de anticuerpo anti-IgG de cabra marcado con peroxidasa de rábano (Sigma,Mo,USA) a una dilución de 1:4500. Las placas son incubadas durante 2 h en cámara húmeda a temperatura ambiente.

- Al final de este periodo, las placas se lavan 3 veces con PBS-TG y se añade 100 µl/pozo de la solución reveladora con ABTS (Sigma, Mo, USA). Finalmente, después de una incubación de 15 a 20 min en oscuridad y agitación constante, se procede inmediatamente a la lectura de las placas a través de un espectrofotómetro de 8 canales empleando un filtro de 405 nm (Elx 800, Bio-tek Instruments).
- Para obtener los resultados se divide el promedio del valor de la densidad óptica del suero sospechoso entre el promedio del valor de la densidad óptica del testigo positivo de cada placa. El punto de corte establecido para el caso del antígeno PPA-3 es, muestras con cociente mayor a 0.8 se consideraran como positivas.

Consideraciones para obtener una ELISA con sensibilidad aumentada.

Al realizar la preadsorción de los sueros con *Mycobacterium phlei* considerada como micobacteria saprófita, se disminuye la probabilidad de detectar anticuerpos contra otras micobacterias saprófitas o contra *Corynebacterium* o *Nocardia* spp., y así disminuir reacciones cruzadas, por lo tanto aumentando la sensibilidad al 57% y la especificidad al 98,9% en bovinos¹⁷. Usando la proteína p35, que está presente sólo en MAP y en *Mycobacterium leprae* se obtienen valores de sensibilidad de 100% y especificidad del 92%²⁶

Reactivos requeridos para extracción de ADN de MAP a partir de heces²⁹

- Acetato de amonio 7.5 M pH 6.3
 - ⇒ 07.225 g de Acetato de amonio
 - ⇒ 12.5ml de agua destilada

- TE-Tritón 100X
 - ⇒ 3.025 ml de Tris HCl 1M pH8
 - ⇒ 0.7445 g de EDTA (pH 8.0 con 675µl de NaOH 10N)
 - ⇒ 1ml de Tritón 100X
 - ⇒ 46.9 ml de agua destilada

- Isotiocinato de guanidina 5M
 - ⇒ 29.54 g de Isotiocinato de guanidina
 - ⇒ 50ml de agua destilada

- PBS
 - ⇒ 8.5g de Cloruro de sodio (NaCl)
 - ⇒ 1.1 g de Fosfato de sodio dibásico
 - ⇒ 0.32 g de Fosfato monobásico de potasio (KH₂PO₄)
 - ⇒ 1000 ml de Agua destilada

Extracción de ADN de MAP a partir de heces

- Con un abatelenguas nuevo se toman 2g de cada muestra de heces y se colocan en el fondo de un tubo de 50 ml, se disuelven en HPC 0.75% c.b.p. 45 ml, se agitan los tubos durante una hora en el agitador orbital y se dejan toda la noche a temperatura ambiente.
- Al día siguiente, se toman 20 ml del sobrenadante (tomando un poco de la fase intermedia), las muestras se centrifugan a 2,500 rpm/10 min.
- Se descarta el sobrenadante en un frasco para desechos y la pastilla se lava con 5-10 ml de PBS estéril, se centrifuga a 2,500 rpm/10 min y se descarta el sobrenadante.
- Se realizan 2 lavados más con PBS, siguiendo la metodología descrita en el punto anterior (En total son 3 lavados).
- Se resuspende la pastilla en 1.5 ml de PBS y se transfiere a un tubo tipo eppendorf de 2 ml, se centrifuga 5 min a 14,000 rpm y se elimina el sobrenadante.
- Se resuspende la pastilla en 500 µl de TE-triton x 100 y se transfiere a un criotubo.
- Se colocan las muestras en nitrógeno líquido durante 5 min y seguidamente en calor seco a 100 °C/5 min (Repetir 3 veces)

- Añadir a cada muestra 450 μ l de isotiocianato de guanidina 5M y 250 μ l de acetato de amonio 6.3 pM, mezclar por inversión varias veces y mantener en hielo durante 15 min.
- Añadir 500 μ l de cloroformo- alcohol isoamílico (24:1), mezclar 10 s y centrifugar 5 min a 14,000 rpm.
- Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo y añadir nuevamente 500 μ l de cloroformo- alcohol isoamílico (24:1), mezclar 10 segundos y centrifugar 5 min a 14,000 rpm.
- Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo, agregar 450 μ l de isopropanol y colocar a - 20 °C toda la noche
- Centrifugar 5 min a 14,000 rpm y eliminar el sobrenadante.
- Realizar dos lavados con 1 ml de etanol al 70%, mezclar y centrifugar 1 min
- Eliminar el sobrenadante y dejar secar la pastilla a temperatura ambiente.
- Resuspender en 100 μ l de agua destilada estéril o agua inyectable.

Procedimiento para la extracción de ADN para sangre mediante columnas comerciales de sílica.

- Colocar 1 ml de sangre completa con EDTA en un tubo de centrifuga de 2.0 ml. Colocar 0.8 ml de solución TBP en el tubo con la sangre completa, se agita gentilmente en el homogenizador eléctrico para lizar a los eritrocitos.
- El tubo se centrifuga a 2,000 gravedades (g) o 4000 rpm durante 3 minutos y se desecha el sobrenadante.
- Repetir el paso anterior hasta la obtención de una pastilla blanca en el fondo . Una vez obtenido esto se colocan 100 µl de TE (Tris-EDTA).
- Colocar 500 µl de solución TBM en el tubo. Agitar vigorosamente en el homogenizador eléctrico y colocar 3 µl de proteinasa K. Incubar a 55°C durante 30 minutos.
- Si aun hay material visible en el tubo se centrifuga por 2 minutos a 2500 g o 5000 rpm, se transfiere el sobrenadante a un tubo de 2 ml y se coloca 260 µl de etanol.
- Se transfiere todo el líquido a la columna comerciales y se centrifuga a 8000 g o 10 000 rpm durante 2 minutos y se desecha el sobrenadante que se colectó en el tubo de centrifuga.
- Colocar 500 µl de solución de lavado comercial y se centrifuga a 8000 g o 10000 rpm durante 1 minuto. Repetir el paso anterior.
- Desechar el sobrenadante y realizar un centrifugado extra de 1 minuto a 8000 g o 10000 rpm para descartar el líquido restante.
- A la columna se coloca un tubo de 1.5 ml y se agrega en el centro de la co-

lumna se colocan 30 -50 μ l de solución de elusión y se incuba de 37 - 50 °C durante 2 minutos.

- Se centrifuga a 8000 g o 10000 rpm durante un 1 min para recuperar el ADN de la membrana.
- Para una mejor conservación de ADN se recomienda guardar a -20°C.

Referencias bibliográficas:

1. BRENNAN PJ, DRAPPER P. In: Chapter 19. Ultrastructure of *Mycobacterium tuberculosis*. In: Bloom BR, editor. Tuberculosis: Pathogenesis, protection and control. 1st ed. Washington D.C., ASM Press, 1994: 271-284
2. BLASQUEZ VB. Comparación de un antígeno derivado de *Mycobacterium avium* con el antígeno protoplásmico de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (PPA-3) para el diagnóstico de paratuberculosis mediante ELISA. (Tesis de licenciatura) México D.F., Universidad Nacional Autónoma de México, 2012..
3. BROWN CC, BAKER CD, BARKER IK. Alimentary System. In: MAXIE, MG, editor. JUBB, KVF KENNEDY, PC AND PALMER, NC. Pathology of domestic animals 5th ed. Guelph, Ontario: Saunders, Elsevier, 2006; 2(Pt. 1): 222-225
4. CONSTANTINO CF, MATEOS PA. Capítulo 3. Aparato Digestivo. En: TRIGO TFJ. Patología Sistémica Veterinaria 3a edición. Ed. Mc-Graw-Hill, México, 1998, 85-122
5. OFT LS, WELLS SJ, WAGNER BA. Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. Preventive Veterinary Medicine 1999; 40: 179-192
6. CHÁVEZ-GRIS G. 24. Epidemiología, prevención y control de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en pequeños rumiantes. En: RODRÍGUEZ VRI, Enfermedades de importancia económica en producción animal México, 1^a ed. McGraw-Hill Interamericana Editores. 2005; 393-404
7. CIRONE K, MORSELLA C, ROMANO M, PAOLICCHI F. *Mycobacterium avium*

- subsp. *paratuberculosis*: presencia en los alimentos y su relación con la enfermedad de Crohn. Revista Argentina de Microbiología 2007; 39: 57-68
8. CASTELLANOS RE. Caracterización molecular de aislados de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*. Mapa epidemiológico en España. (Tesis de doctorado), Madrid, España: Universidad Complutense de Madrid, 2010..
 9. GRANT IR. Zoonotic potential of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: the current position Journal of Applied Microbiology 2005; 98, 1282–1293
 10. PIERCE ES. Ulcerative colitis and Crohn's disease: is *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* the common villain? Gut Pathogens 2010; 2:21 Available from: URL: <http://www.gutpathogens.com/content/2/1/21>
 11. ELTHOLTH MM, MARSH VR, VAN WINDEN S, GUITIAN FJ. Contamination of food products with *Mycobacterium avium paratuberculosis*: a systematic review. Journal of Applied Microbiology 2009: 1061–1071
 12. HERMON TJ. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, Crohn's disease and the Doomsday Scenario. Gut Pathogens 2009; 1:15 Available from: URL: <http://www.gutpathogens.com/content/1/1/15>
 13. ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DE SANIDAD ANIMAL. Manual de la OIE sobre animales terrestres 2008. Organización Internacional de Sanidad Animal 2008; 2.1.1.1: 1-17
 14. DE JUAN FL. Paratuberculosis caprina: aportaciones a su diagnóstico, epidemiología molecular y control (Tesis de doctorado), Madrid, España: Universidad Complutense de Madrid, 2005..

15. GRIEBEL PJ. XIV Sheep immunology and Goat Peculiarities in: PASTORET PP, GRIEBEL P, BAZIN H, GOVAERTS A. Handbook of vertebrate immunology. Academic Press, Reino Unido, 1998. 485-554
16. ROITT IM. Capítulo 16. Hipersensibilidad en: Inmunología. Fundamentos. 11a edición, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina, 2008. 373-400.
17. MARTÍNEZ REG. Hallazgos anatomopatológicos y su relación con los valores de densidad óptica de la prueba de ELISA en ovinos seropositivos a paratuberculosis, en Martínez de la Torre, Veracruz (Tesis de Licenciatura), México, D.F: Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 2002..
18. QUIROZ RH. Parte II. Protozoarios Capítulo 4. Enfermedades causadas por coccidias en: Parasitología Veterinaria 1a Edición, México: Limusa, 1984: 119—176.
19. RAMOS-VARA, JA. Technical Aspects of Immunohistochemistry. Vet Pathol 2005 42: 405-426
20. SINGH AV, SINGH SV, SINGH PK, SOHAL JS. Is *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, the cause of Johne's disease in animals, a good candidate for Crohn's disease in man? Indian Journal of Gastroenterology 2010 29(2):53—58. Available from: Springerlink
21. ALMOG R, MANELLA CA. Molecular Packing of Cord Factor and Its Interaction with Phosphatidylinositol in Mixed Monolayers Biophysical journal, 1996 (71): 3311-3319
22. YAMAGAMI H, MATSUMOTO T, FUJIWARA N, ARAKAWA T, KANEDA K, YANO I, KOBAYASHI K. Trehalose 6,6'-Dimycolate (Cord Factor) of *Mycobacterium tuberculosis* Induces Foreign-Body- and Hypersensitivity-Type Granulomas in Mice. Infec-

- tion and Immunity. 2001; 69(2): 810–815
23. MARTÍNEZ GD, CASTAÑEDA RA, VICENCIO MMA, ANAYA SMG, Práctica 11 Inumnoensayo Enzimático (ELISA). En: Cobos ML, Castañeda RA, Editores. Manual de Prácticas de Laboratorio de Inmunología 2ª ed, México, UNAM, 2005: 111-122
 24. PARK KT, JONGSAM A, DAVIS WC, KOO HC, KWON NH, JUNG WK, KIM JM, HONG SK, PARK YH. Analysis of the seroprevalence of bovine paratuberculosis and the application of modified absorbed ELISA to field sample testing in Korea. Journal of Veterinary Science 2006; 7(4), 349–354.
 25. CHÁVEZ-GRIS G. Estudio comparativo de las lesiones y de la respuesta inmunológica observadas en corderos infectados experimentalmente con *Mycobacterium paratuberculosis* y *Mycobacterium avium* sp. *sylvaticum*. (Tesis de Doctorado), Zaragoza, España: Universidad de Zaragoza, 1993..
 26. CASTRELLÓN AVE. Expresión de la Proteína Recombinante P35 de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* y su uso en el diagnóstico de paratuberculosis en ovinos. (Tesis de Maestría), México, D.F: Universidad Nacional Autónoma de México, 2012
 27. JAIMES NG, SANTILLÁN FMA, HERNÁNDEZ COA, CÓRDOVA LD, GUZMÁN RCC, ARELLANO RB, DÍAZ AE, TENORIO GVR, CUÉLLAR OA. Detección de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* por medio de PCR anidada a partir de muestras de heces de ovinos. Revista Veterinaria México., 39 (4) 2008
 28. ABD EL-MALEK S, MOHAMED KF. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* IS900 in Baby Milk Powder in Egypt. International Journal of Microbiologi-

cal Research 2011: 2(1); 54-60

29. FAVILA HLC. Detección de *Mycobacterium avium paratuberculosis* en leche de vacas y cabras seropositivas del centro de México. (Tesis de Maestría), México, D.F: Universidad Nacional Autónoma de México, 2007..
30. PAVLIK I, HORVATHOVA A, BARTOSOVA L, BABAK V, MORAVKOVA M. IS900 RFLP types of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in faeces and environmental samples on four dairy cattle farms. Veterinami Medicina. 2010: 55 (1): 1–9
31. CHÁVEZ-GRIS G, TRIGO TFJ, SVASTOVA P, PAVLIK I. Identificación del Polimorfismo Genético de aislamientos de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* de caprinos del centro de México. Vet. Méx., 35 (1) 2004
32. DJØNNE B, PAVLIK I, SVASTOVA P, BARTOS M, HOLSTAD G. IS900 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) Analysis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Isolates from Goats and Cattle in Norway Acta vet. scand. 2005: (46), 13-18
33. MIRANDA BMV. Evaluación del impacto económico de la Paratuberculosis en ganado bovino lechero (sistema intensivo), en el Complejo Agropecuario Industrial Tizayuca, Hidalgo, México. (Tesis de Maestría), México, Distrito Federal, Universidad Nacional Autónoma de México, 2005..
34. FAVILA HLC, CHÁVEZ-GRIS G, GARCÍA VGJ, REMES TJM, USCANGA LF, SANTILLÁN FMA, PAOLICCHI F, CARRILLO CME, HERNÁNDEZ CR. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Crohn's Disease Patients and Ruminants Intestine by In Situ Hybridization. In: KAROUI S. Crohn's Disease. Rijeka, Croatia

tia, InTech 2012: 121-128 .

35. LÓPEZ YJ. Situación de la Paratuberculosis en el Área de Bovinos Lecheros y de Cierros en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en el Altiplano (CEIEPAA). Propuestas de control. (Tesis de licenciatura) México, Distrito Federal, Universidad Nacional Autónoma de México, 2011..
36. BOULTER JI, TREVORS JT, BOLAND GJ. Microbial Studies of Compost: Bacterial Identification, and their Potential for Turfgrass Pathogen Suppression. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 18: 661–671, 2002.
37. CONSEJO TÉCNICO CONSULTIVO NACIONAL DE SANIDAD ANIMAL. Plan Estratégico Del Programa Para La Atención De La Paratuberculosis En Ganado Bovino, Ovino Y Caprino En México. México, D.F.: CONASA. 2010
38. REDPATH S, GHAZAL P. GASCOIGNE RJN. Hijacking and exploitation of IL-10 by intracellular pathogens. *TRENDS in Microbiology* (2001): 9; 2
39. AKTAN F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sciences* 2004, (75); 639–653 available online at www.sciencedirect.com
40. DELGADO F, ESTRADA-CHÁVEZ C, ROMANO M, PAOLICCHI F, BLANCO-VIERA F, CAPELLINO F, CHAVEZ-GRIS G, PEREIRA-SUÁREZ AL. Expression of NRAMP1 and iNOS in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* naturally infected cattle. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 2010, (33): 389–400 available online at www.sciencedirect.com

41. FERNÁNDEZ DE VEGA FA, MORENO JE, GONZÁLEZ MJ, PALACIOS GJJ. 9a. Micobacterias En: CERCENADO E, CANTÓN R. (Editores) Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, SEIMC, 2005.