

Estimación de la efectividad de las pruebas histopatológicas, ELISA y de PCR para el diagnóstico rápido de la tuberculosis y paratuberculosis bovina en mataderos del Estado de Nayarit (México)

MARIA TERESA CAMARENA HERRERA



UNIVERSIDAD DE LEÓN
FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Sanidad Animal



UNIVERSIDAD DE LEÓN
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL



“Estimación de la efectividad de las pruebas histopatológicas, ELISA y de PCR para el diagnóstico rápido de la tuberculosis y paratuberculosis bovina en mataderos del Estado de Nayarit, México.

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR
MARÍA TERESA CAMARENA HERRERA

Bajo la dirección de los Doctores

Juan Francisco García Marín
Valentín Pérez Pérez
María del Carmen Ferreras Estrada
LEÓN, 2014



INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

El Dr. D. Juan Francisco García Marín, Valentín Pérez Pérez y Ma. Del Carmen Ferreras Estrada como Directores de la Tesis Doctoral titulada “Estimación de la efectividad de las pruebas histopatológicas, ELISA y de PCR para el diagnóstico rápido de tuberculosis y paratuberculosis bovina en mataderos del Estado de Nayarit, México” realizada por D. María Teresa Camarena Herrera en el programa de doctorado Producción y Sanidad Ovina, informa favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, en León a 14 de Marzo de 2014

Fdo.: J.F. García Marín

V. Pérez Pérez

M.C. Ferreras Estrada



ADMISIÓN A TRÁMITE DE LA TESIS DOCTORAL

El órgano responsable del programa de doctorado Producción y Sanidad Ovina en su reunión celebrada el día 17 de Marzo de 2014 ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada “Estimación de la efectividad de las pruebas histopatológicas, ELISA y de PCR para el diagnóstico rápido de tuberculosis y paratuberculosis bovina en mataderos del Estado de Nayarit, México”, dirigida por los Dres. D. Juan Francisco García Marín, Valentín Pérez Pérez y la Dra. D. Ma. Del Carmen Ferreras Estrada, elaborada por D. María Teresa Camarena Herrera y cuyo título en inglés es el siguiente “Assessment of the efficiency of histopatological methods, indirect ELISA and PCR for the rapid diagnosis in bovines slaughtered in the State of Nayarit, México”.

Lo que firmo, en León a 17 de Marzo de 2014.

El Secretario,

Fdo.: Dr. D. Juan M. Fregeneda Grandes

Vº Bº

El Director del Departamento/
Presidente de la Comisión Académica,

Fdo.: Dr. D. César B. Gutiérrez Martín

AGRADECIMIENTOS

Para la realización de esta tesis necesite la ayuda de muchas personas a las cuales quisiera expresar mi más sincero agradecimiento.

Especialmente quiero agradecer a mis directores de tesis, Dr. D. Juan Francisco García Marín, Dra. Dña. María del Carmen Ferreras Estrada y Dr. D. Valentín Pérez Pérez, por la confianza en mí, porque siempre estuvieron dispuestos a brindarme su ayuda en todo momento, por sus enseñanzas y sobre todo por la paciencia que tuvieron conmigo. Sin ellos esta tesis no hubiera sido posible, y aun con el paso del tiempo su recuerdo y ejemplo siempre vivirá en mi mente y corazón, les estaré eternamente agradecida “Mil Gracias”.

Gracias a Sonia y Silvia por transmitirme sus conocimientos en las diferentes técnicas de diagnóstico, por su ayuda desinteresada, pero sobre todo por los buenos ratos pasados y lo más importante por su amistad.

A Glory por todos esos días en el café que se convertían en los mejores momentos del día, por la confianza que tuvo en mí para compartirme su historia, por sus sabios consejos y sobre todo porque cuando más necesite un hombro para llorar o de un simple abrazo ella siempre tuvo tiempo de apoyarme, te quiero y nuestra amistad perdurara aun en la distancia.

Fueron muchos años desde el inicio de esta tesis en los cuales muchas personas se hicieron importantes e inolvidables en mi vida, como Daphne, Bettit, María, Laetitia, Paco, Cristian y Adelino, que estuvieron siempre cuando más los necesitaba, apoyándome y dándome ánimos para seguir con este sueño que por fin hoy ya es una realidad.

A mi hermana Gaby que siempre estuvo al pendiente de mí, por sus infinitas llamadas y mensajes para animarme, porque con su buena vibra es imposible sentirse triste y porque a pesar de no verla mucho, siempre está en mi mente y en mi corazón.

A Edwin y Fidelina por convertirse en parte de mi familia, porque gracias a ellos mis días fueron menos grises haciéndome sentir querida.

A Donal y Andy que con su cariño y apoyo conocí el verdadero significado de la amistad, porque su compañía convertía mis días nublados en maravillosos y su buena vibra siempre me contagio de positividad y alegría.

También mi agradecimiento y reconocimiento a los Dres. Ma. José, Claudia, Jorge por regalarme una sonrisa y por su ejemplo de responsabilidad. A Miguel y Mikel por su ayuda desinteresada, a Pablo, Elena y Marcos por hacer de este departamento el mejor.

A la Universidad Autónoma de Nayarit, México por colaborar económicamente con mis estudios para hacer de mí una mejor persona.

A los veterinarios y trabajadores de los mataderos en los que recolecte las muestras y en especial al matadero de Tepic, donde no solo encontré gente que me apoyara más allá de sus obligaciones, sino que además hicieron que las horas fueran amenas y rápidas.

Durante muchos años estuve pensando en los nombres de las personas a las que agradecería y estoy segura que con la emoción de haber culminado mi tesis me olvide de muchas personas, así que anticipadamente pido perdón, y les agradezco de corazón, Mil Gracias.

DEDICATORIAS

Después de tanto tiempo que ha pasado, hoy me parece mentira que al fin concluí una etapa más de mi vida, a pesar de tantos momentos de soledad, angustia y desesperación, hoy me alegro de haberlo logrado, pero esto sin duda alguna no hubiera sido posible sin el apoyo de cuatro personas, las más importantes en mi vida y por este y muchos motivos, quiero dedicarles esta tesis.

En primer lugar a mis dos hijos, Diana Carolina y Oscar Gabriel porque a pesar de su corta edad demostraron ser más maduros que muchos adultos, superando la distancia con valentía, porque siempre existen momentos y fechas en los que el amor y la presencia de una madre es indispensable y, ellos supieron enfrentarlos sin tenerme a su lado.

A mi Padre, por la paciencia y cariño con los que cuido de mis hijos y porque después de mis tantos errores, él siempre estuvo a mi lado, apoyándome y haciéndome sentir querida, por todas sus palabras de aliento y lo más importante, que por ser como es, puedo decir con orgullo, que tengo al mejor Padre del mundo.

Y una dedicación muy especial a la persona que me ayudo a encontrar mi verdadera vocación y gracias a eso, elegí la profesión de médico veterinario, esa persona que con su ejemplo me ha enseñado que jamás tenemos que darnos por vencidos y que en la vida, todo se puede conseguir, siempre y cuando estemos dispuestos a luchar y a sacrificar alguna cosa, pero sabiendo que al final, siempre tendremos una excelente recompensa. Esa persona de la que hablo no solo se ha ganado mi admiración y respeto, sino el de muchas personas más, y no porque es mi Madre, sino por ser una Mujer ejemplar.

No me alcanzarían todas las hojas del mundo para escribir lo mucho que les agradezco y el inmenso amor que siento por ustedes, espero poderles recompensar algún día todo lo que han hecho por mí, Gracias.

Índice de Contenidos

I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
II.1. ETIOLOGÍA DE LAS MICOBACTERIAS.....	11
II.2. TUBERCULOSIS BOVINA	13
2.1. Importancia de la tuberculosis bovina en la inspección <i>post mortem</i>	14
2.2. Epidemiología.....	15
2.2.1. Hospedadores susceptibles a <i>Mycobacterium bovis</i>	17
2.2.1.1. Hombre	17
2.2.1.2. Tejón (<i>Meles meles</i>).....	18
2.2.1.3. Zarigüeya (<i>Trichosorus vulpécula</i>)	18
2.2.1.4. Otras especies silvestres	18
2.2.1.5. Especies domésticas	19
2.3. Prevalencia.....	20
2.4. Patogenia	21
2.4.1. Primoinfección	21
2.4.2. Período post-primario	22
2.4.3. Fase de ruptura	23
2.5. Respuesta inmunitaria.....	23
2.6. Signos clínicos y lesiones macroscópicas	25
2.7. Prevalencia.....	25
2.8. Control.....	27
II.3. PARATUBERCULOSIS BOVINA.....	28
3.1. Etiología	28
3.2. Epidemiología.....	30
3.3. Patogenia	31
3.4. Signos clínicos.....	33
3.4.1. Lesiones macroscópicas	34
3.4.2. Lesiones microscópicas	36
3.5. Prevalencia.....	38
3.6. Control.....	39
3.6.1. Vacunación	40
II.4. DIAGNÓSTICO DE LAS MICOBACTERIAS	40
4.1. Diagnóstico clínico y epidemiológico	41

4.2. Diagnóstico anatomopatológico	42
4.2.1. Técnicas histopatológicas	42
4.2.2. Técnicas inmunohistoquímicas	43
4.3. Diagnóstico	44
4.3.1. Aislamiento e identificación en cultivo bacteriológico	44
4.3.2. Detección del genoma micobacteriano (PCR).....	45
4.4. Métodos diagnósticos basados en la respuesta inmune del animal	47
4.4.1. Métodos diagnósticos basados en la respuesta inmune celular	48
4.4.1.1. Prueba de la tuberculina	48
4.4.2. Métodos diagnósticos basados en la respuesta inmune humoral.....	50
4.4.2.1. Prueba de inmunodifusión en gel de agar (IDGA).....	51
4.4.2.2. Ensayo inmunoenzimático (ELISA).....	52
4.4.2.3. La prueba de gamma interferón.....	53
III. MATERIALES Y MÉTODOS	55
III.1. LUGAR DE ESTUDIO	57
III.2. SELECCIÓN DE ANIMALES	59
III.3. ESTUDIOS REALIZADOS	60
3.1. Intradermorreacción (IDR) simple.	60
3.2. Prueba del test ELISA indirecto frente a tuberculosis y paratuberculosis.....	61
3.2.1. Toma y procesamiento de muestras.....	61
3.2.2. Desarrollo del test ELISA.....	61
3.2.3. Validación del test ELISA e interpretación de los resultados	64
3.3. Estudios <i>post mortem</i>	64
3.3.1. Estudios anatomopatológicos	64
3.3.1.1. Exámen macroscópico y toma de muestras.....	64
3.3.1.2. Procesado histológico	66
3.4. Tinciones histológicas	66
3.4.1. Valoración de las lesiones	69
3.5. Detección de micobacterias mediante PCR y selección de muestras	70
3.5.1. Procesado de las muestras	71
3.5.2. Lisis de la micobacteria y extracción del ADN.....	71
3.5.3. Amplificación del ADN micobacteriano.....	73
3.5.4. Identificación del segmento amplificado.....	75

III.4. MATERIAL ÓPTICO Y FOTOGRÁFICO	77
III.5. MATERIAL INFORMÁTICO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	77
IV. RESULTADOS	78
IV.1. VALORACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE PERIFÉRICA FRENTE A TUBERCULOSIS Y PARATUBERCULOSIS	80
1.1. Pruebas de inmunidad celular	80
1.1.1. Intradermorreacción simple bovina	80
1.2. Prueba de inmunidad humoral	81
1.2.1. Test de ELISA	81
IV.2. RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS <i>post mortem</i>	84
2.1. Observaciones macroscópicas	84
2.2. Lesiones paratuberculosas	85
2.2.1. Características microscópicas	85
IV.3. RESULTADOS EN LA PRUEBA DE DETECCIÓN DE MICOBACTERIAS MEDIANTE LA PCR	89
IV.4. COMPARACIÓN ENTRE TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS	93
4.1. Comparación entre el diagnóstico histopatológico y el diagnóstico inmunológico	93
4.1.1. Comparación entre el diagnóstico histopatológico y la IDR	93
4.1.2. Comparación entre el diagnóstico histopatológico y el ELISA	93
4.1.3. Comparación entre el diagnóstico histopatológico y la PCR	95
4.1.4. Relación entre la respuesta a la intradermorreacción (IDR) y el ELISA	96
4.1.5. Relación entre la PCR y la IDR	98
4.1.6. Relación entre la PCR y el ELISA	99
4.1.6.1. Relación entre la PCR-tb y el ELISA frente a <i>M. bovis</i>	99
4.1.6.2. Relación entre la PCR-tb y el ELISA frente a <i>Map</i>	99
4.1.6.3. Relación entre la PCR-ptb y el ELISA frente a <i>M. bovis</i>	100
4.1.6.4. Relación entre la PCR-ptb y el ELISA frente a <i>Map</i>	100
4.1.7. Relación entre el ELISA indirecto frente a paratuberculosis y tuberculosis	101

IV.5. RESULTADOS DE LAS DIFERENTES TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS	102
5.1. Animales en los que se realizaron las diferentes técnicas diagnósticas, para tuberculosis y paratuberculosis	103
V. DISCUSIÓN	114
VI. CONCLUSIONES.....	124
VII. RESUMEN	127
VIII. SUMMARY	132
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	136

Índice de Tablas, Gráficas y Figuras

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
Figura.II.1. Etapas de la tuberculosis en el pulmón.....	22
III. MATERIALES Y MÉTODOS	55
Figura.III.1. Distribución geográfica de México	58
Figura.III.2. Distribución geográfica de Nayarit	58
Tabla.III.1. Distribución de los 343 bovinos en los 20 municipios (grupos)	59
Figura.III.3. Distribución de los sueros en la placa del test ELISA PPA-3 y de tuberculosis	63
Tabla.III.2. Preparación de los reactivos utilizados en el test ELISA	63
Tabla.III.3. Identificación de las muestras tomadas, tras el sacrificio de cada animal para los diferentes estudios	65
Figura.III.4. Localización de los ganglios linfáticos objeto de estudio	65
Tabla.III.4. Número de identificación, municipio de procedencia, sexo, edad y aptitud de los 62 animales en los que se realizó el estudio histológico	67
Tabla.III.5. Protocolo de la tinción Hematoxilina-Eosina (H-E).....	68
Tabla.III.6. Reactivos empleados para la tinción Hematoxilina-Eosina (H-E)	68
Tabla.III.7. Protocolo para l tinción Ziehl-Neelsen (Z-N).....	69
Tabla.III.8. Reactivos empleados para la tinción Ziehl-Neelsen (Z-N).....	69
Tabla.III.9. Componentes del kit comercial Speedtools Tissue ADN extraction kit (Biotools® B&M Labs., S.A., Madrid, España) para la extracción y purificación de ADN	72

Tabla.III.10. Reactivos empleados en la fase de amplificación de la PCR para las secuencias de inserción IS900 de <i>Map</i> , IS6110 de <i>M. bovis</i> e IS901 de <i>Maa</i>	74
Tabla.III.11. Reactivos y protocolo de preparación del gel de agarosa para la visualización de los fragmentos de ADN amplificados.....	75
Figura.III.5. Revelado de la PCR en gel de agarosa.....	76
IV. RESULTADOS.....	78
Gráfico.IV.1. Resultados en la prueba IDR bovina sobre 289 animales	80
Tabla.IV.1. Resultado de los grupos a la prueba de Intradermorreacción.....	81
Tabla.IV.2. Resultado del test ELISA frente a <i>M. bovis</i> y <i>Map</i>	82
Gráfico.IV.2. Resultado del test ELISA sobre 320 animales	83
Tabla. IV.3. Resultado de ELISA frente a <i>M. bovis</i> y <i>Map</i> por edad.....	83
Figura.IV.1. Lesiones microscópicas.....	86
Figura.IV.2. Lesiones de tipo 1B, negativa a la presencia de BAAR mediante la técnica de Ziehl-Neelsen.....	86
Tabla.IV.4. Distribución del número de animales con lesiones según el grupo (municipio)	87
Tabla.IV.5. Identificación de los animales en los que se valoraron lesiones histológicas	87
Tabla.IV.6. Número de lesiones según la distribución anatómica y su tipo.....	89
Figura.IV.3. Revelado de la PCR en gel de agarosa con muestras positivas a la secuencia de inserción IS6110 de <i>M. bovis</i>	90
Tabla.IV.7. Resultado de la PCR frente a <i>M. bovis</i> y <i>Map</i> realizada sobre 275 animales	90

Gráfico.IV.3. Porcentaje de acuerdo a la edad en la PCR frente a <i>M. bovis</i> y <i>Map</i>	91
Tabla.IV.8. Resultados de la PCR realizada sobre 14 animales en los que se analizaron las tres micobacterias (<i>M. bovis</i> , <i>Map</i> y <i>Maa</i>)	92
Figura.IV.4. Revelado de la PCR en gel de agarosa.....	92
Tabla.IV.9. Relación del número de animales con lesiones y la respuesta a la intradermorreacción (IDR) con PPD bovina	93
Tabla.IV.10. Relación entre los resultados del test ELISA frente a <i>M. bovis</i>	94
Tabla.IV.11. Relación entre los resultados de la técnica ELISA frente a <i>Map</i>	94
Tabla.IV.12. Relación entre los resultados de la PCR frente a <i>M. bovis</i> y presencia de lesiones, expresado como número de animales	95
Tabla.IV.13. Relación entre los resultados de la PCR frente a <i>Map</i>	96
Tabla.IV.14. Relación entre los resultados de la PCR frente a <i>Maa</i>	96
Tabla.IV.15. Número de animales IDR positivos y negativos a la prueba ELISA frente a <i>M. bovis</i>	97
Tabla.IV.16. Número de animales IDR positivos y negativos al test ELISA frente a <i>Map</i>	97
Tabla.IV.17. Número de animales PCR positivos y negativos frente a <i>M. bovis</i> y a la IDR simple bovina.....	98
Tabla.IV.18. Número de animales PCR positivos y negativos frente a <i>Map</i> y a la IDR simple bovina	98
Tabla.IV.19. Número y porcentaje de animales PCR (frente a <i>M. bovis</i>) positivos y negativos al test ELISA frente a <i>M. bovis</i>	99

Tabla.IV.20. Número y porcentaje de animales PCR (frente a <i>M. bovis</i>) positivos y negativos al test ELISA frente a <i>Map</i>	100
Tabla.IV.21. Número y porcentaje de animales PCR (frente a <i>Map</i>) positivos y negativos al test ELISA frente a <i>M. bovis</i>	100
Tabla.IV.22. Número y porcentaje de animales PCR (frente a <i>Map</i>) positivos y negativos al test ELISA frente a <i>Map</i>	101
Tabla.IV.23. Número de animales positivos y negativos al test ELISA frente a <i>M. bovis</i> y <i>Map</i>	101
Tabla.IV.24. Porcentaje de animales positivos a las diferentes técnicas diagnósticas.....	102
Gráfico.IV.4. Porcentaje de la positividad de los grupos de animales a los que se aplicaron las diferentes técnicas diagnósticas	103
Tabla.IV.25. Resultado de las diferentes técnicas diagnósticas realizada en 35 animales	103
Gráfico.IV.5. Resultado de las diferentes técnicas diagnósticas realizada en 35 animales, expresados como porcentaje de animales.....	105
Tabla.IV.26. Relación de todos los animales incluidos en el estudio, así como los resultados de todas las pruebas diagnósticas realizadas.....	105

I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

“Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber”.

Albert Einstein (1879-1955).

La tuberculosis bovina es una enfermedad infecto contagiosa crónica, de carácter granulomatoso, causada por bacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis* principalmente *Mycobacterium bovis* [Draper, 1982; Cousins, 2001; Magnano *et al.*, 2010] que ocasiona serios problemas en la salud pública al tratarse de una zoonosis [Grange, 2001; Magnano *et al.*, 2010].

En el ganado bovino esta enfermedad crónica y debilitante, se caracteriza por la formación de granulomas llamados tubérculos, los cuales pueden aparecer en cualquier tejido, aunque las lesiones más frecuentes suelen observarse en los ganglios linfáticos ubicados en la cabeza o tórax y en el pulmón [Buddle *et al.*, 1994; Wobeser, 2009]. La aparición de lesiones en otros órganos (glándula mamaria, riñón, hígado, etc.) se debe a la diseminación por sangre de la bacteria desde la localización primaria [Abdala y Tarabla, 2007].

Los signos clínicos pueden estar ausentes en los primeros estadios de la enfermedad y al tratarse de una zoonosis, este hecho supone un riesgo ocupacional para quienes trabajan con animales, como veterinarios, ganaderos y personal de mataderos, entre otros [O'Reilly y Daborn, 1995].

La tuberculosis en el ganado bovino tiene gran importancia económica, ya que además de las pérdidas directas ocasionadas por la muerte de los animales, provoca pérdidas de peso, disminución en la producción láctea y afecta a la fertilidad [WHO, 1994; Surujballi *et al.*, 2009]. Dado que la distribución de la tuberculosis bovina no es homogénea, la inmovilización y comercialización de ganado se encuentra restringida. Esto ha tenido consecuencias para México ya que la movilización y comercialización de los animales se ha visto limitada a causa de la enfermedad, convirtiéndose en una de las principales barreras no arancelarias [Zendejas *et al.*, 1997].

La tuberculosis bovina en los últimos años ha sido un foco de atención en México, no solo por el hecho del incremento en el número de casos, sino también por las políticas de comercio que se establecen con otros países, incluidos los programas de inocuidad alimentaria, lo cual ha provocado un renovado interés por el desarrollo y validación de nuevas alternativas de control y mejores métodos de diagnóstico [Rothel *et al.*, 1990; Buddle *et al.*, 2003]. Por ello, al igual que en otras regiones del mundo, en México también se han iniciado programas gubernamentales para controlar y erradicar la tuberculosis bovina. Esta campaña se inició en 1971 [Zendejas *et al.*, 2007] y se basa en el diagnóstico de los animales infectados mediante la aplicación intradérmica de tuberculina (PPD) y la eliminación de los animales positivos [Beer, 1981; Blaha, 1995; Tizard, 2002; Arcelles *et al.*, 2005].

Introducción y Objetivos

Sin embargo, el diagnóstico de la tuberculosis está sometido aún a controversia. La prueba de la tuberculina o intradermorreacción, utilizada para el diagnóstico de la tuberculosis bovina desde hace más de 100 años [Underwood y Carfagnini, 2005], es la técnica más empleada por su bajo costo económico y su facilidad de ejecución, si bien existen discrepancias en cuanto a los criterios para la interpretación de los resultados [Gutiérrez-Cancela, 1996].

Un hecho conocido es la existencia de animales anérgicos a la prueba de la tuberculina, que en algunos trabajos realizados en México se cita que pueden llegar a ser el 19% de los animales muestreados [Estrada-Chávez *et al.*, 2001]. Por ello, y atendiendo a las recomendaciones de Cicuta *et al.* (2003), se ha propuesto el empleo combinado de varias técnicas diagnósticas inmunológicas (detección de anticuerpos, valoración de la producción de citoquinas, etc.) que permitan obtener un perfil epidemiológico más ajustado a la situación real para poder, posteriormente adoptar las medidas de control más adecuadas. Además, una vez que los animales son eliminados, debe llevarse a cabo un diagnóstico *post mortem* de la tuberculosis bovina, empleando el estudio histopatológico de los órganos afectados [Vitale, 1998] junto con el diagnóstico etiológico, bien mediante métodos inmunohistoquímicos [Gutiérrez-Cancela y García Marín, 1993; Castillo *et al.*, 2010], la aplicación de técnicas de biología molecular [Prat *et al.*, 2010], o el cultivo bacteriológico, totalmente específico.

La vigilancia en mataderos representa un componente fundamental en el programa nacional de erradicación de la tuberculosis bovina. La inspección *post mortem* es un método eficiente en la detección de la infección en poblaciones de ganado, y constituye una herramienta importante para comprobar la existencia o no de la enfermedad en un hato [Corner *et al.*, 1990; González, 2003]. Además, es útil para realizar estudios de prevalencia, incidencia y caracterización de lesiones macroscópicas de tuberculosis [García Castro, 2007]. Si se subestima este método de detección, la erradicación podría sufrir un importante retraso. [Tolson y Jervois, 1990].

La paratuberculosis (PTB) o enfermedad de Johne es una enfermedad infecciosa producida por *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (*Map*) que afecta a rumiantes, tanto silvestres como domésticos, principalmente bovinos, ovinos y caprinos, produciendo lesiones granulomatosas en el intestino y nódulos linfáticos [Pérez *et al.*, 1996; Clarke, 1997; Forshell, 2001; González, 2003, González *et al.*, 2005].

Aunque los individuos se infectan en los primeros días de vida, los signos clínicos no aparecen antes del año y medio o dos años de edad. El principal síntoma común para todas las especies, es el adelgazamiento progresivo que puede llegar hasta la caquexia, acompañado en ocasiones por diarrea [Stamp y Watt, 1954; Aller *et al.*, 1973; Blood *et al.*,

1989; Barker *et al.*, 1993; García Marín *et al.*, 1994; Corpa *et al.*, 1998a; Pávlík *et al.*, 2000], que conduce finalmente a la muerte del animal [Manning y Collins, 2001].

Las lesiones se localizan en el aparato digestivo, afectando al intestino delgado (íleon y yeyuno preferentemente) y nódulos linfáticos regionales, y se caracterizan por una inflamación crónica de carácter granulomatoso [Harris y Barletta, 2001].

La vía de contagio principal es la digestiva. Por lo general los animales se infectan al ingerir leche y sobre todo material infectado con *Map.*, siendo más sensibles los terneros menores de 6 meses [Chiodini *et al.*, 1984; Blood *et al.*, 1989; Juste y Adúriz, 1990a; Stabel, 1998; García Marín *et al.*, 2000].

Esta enfermedad es de distribución mundial [Sánchez *et al.*, 2009]. Se considera una enfermedad emergente y es común en ganado lechero. Su mayor importancia es de tipo económico, causando graves pérdidas en rebaños lecheros debido a la disminución de la producción láctea, al descenso en la producción de terneros, a la mayor susceptibilidad a otras enfermedades, disminución de la fertilidad, a la muerte o sacrificio, de los animales afectados y a las restricciones que ocasiona en la comercialización del ganado [Merkal *et al.*, 1975; Van Schaik *et al.*, 1996; Johnson-Yfearundulu *et al.*, 2000]. También debe tenerse en cuenta su posible implicación en el desarrollo de la enfermedad de Crohn humana [Chiodini *et al.*, 1984; Chiodini, 1989; Grange *et al.*, 1990; Dey y Parham, 1993] por lo que podría tener importancia en salud pública.

En este momento no existe tratamiento curativo viable para la enfermedad, por lo tanto su diagnóstico es fundamental para establecer medidas de control basadas en la eliminación y separación de animales conjuntamente con medidas de bioseguridad [Alfaro *et al.*, 2006] o en la vacunación, donde sea factible utilizarla [González, 2003].

El diagnóstico clínico de la paratuberculosis en bovinos con signos evidentes (edema submandibular, diarrea crónica y pérdida progresiva de peso) no es difícil; sin embargo, el diagnóstico de la enfermedad en animales infectados asintomáticos es extremadamente complejo, ya que no existe ningún método de diagnóstico lo suficientemente eficaz para detectar todos los individuos infectados [Collins, 2004].

Dentro de las pruebas diagnósticas actualmente disponibles con mayor especificidad se encuentran aquellas basadas en la detección de *Map* mediante cultivo de heces, mucosa intestinal o nódulos linfáticos [Chiodini y Van Kruiningen, 1986; Merkal *et al.*, 1987; de Lisle y Milestone, 1989] o empleando técnicas de biología molecular como el PCR [Gamboa *et al.*, 1998; Chedore y Jamieson, 1999; Bergmann *et al.*, 2000]. El cultivo fecal ha sido ampliamente utilizado en programas de control y se ha considerado como “Gold

Introducción y Objetivos

Standard”, sin embargo muestra desventajas por ser laborioso, de alto costo y extremadamente lento [Swenney *et al.*, 1995; Collins, 1996].

El otro grupo de procedimientos diagnósticos ampliamente utilizados son los métodos inmunológicos. La detección de anticuerpos frente a *Map* en el suero de animales infectados mediante el ELISA indirecto es muy empleada ya que contrariamente al cultivo, es fácil de realizar, rápida y de bajo costo [Cocito *et al.*, 1994; Collins, 1996; Withlock y Buergelt, 1996; Stabel, 1998]. Sin embargo, entre sus inconvenientes se señala su baja sensibilidad, ya que no detecta a los animales que están en las fases iniciales de la infección [Collins *et al.*, 1993a]. En los últimos años también se han empleado técnicas que evidencian la respuesta inmune celular, como la prueba del IFN- γ [Rothel *et al.*, 1990; Wood *et al.*, 1990] que si detectaría animales en fases tempranas, pero que presenta limitaciones importantes en su ejecución como el tiempo reducido que debe pasar desde que se toman las muestras hasta su procesado, o el coste económico.

El diagnóstico anatomopatológico, basado en la detección de lesiones características de paratuberculosis, es de gran utilidad para confirmar la enfermedad. Las lesiones macroscópicas específicas que suelen presentarse en la mayoría de los animales afectados clínicamente de paratuberculosis pueden proporcionar un diagnóstico fiable, si bien hay que tener en cuenta que las lesiones no siempre se pueden apreciar, incluso en animales con evidentes signos clínicos [Buergelt *et al.*, 1978; Corpa, 1999] y en la mayor parte de los que presentan la infección subclínica [González, 2003]. En estos casos es necesario realizar el estudio histopatológico, que muestra una buena sensibilidad y especificidad [Barker *et al.*, 1993; Withlock, 1998; González *et al.*, 2005] y es, junto al cultivo, la prueba usada como referencia para validar y comparar otras técnicas [Billman- Jacome *et al.*, 1992; Schulaw *et al.*, 1993; Clarke *et al.*, 1996; Pérez *et al.*, 1997; McDonald *et al.*, 1999]. Además, se puede llevar a cabo un diagnóstico etiológico en tejidos mediante técnicas de PCR [Pérez *et al.*, 2009], habiéndose demostrado que es un método sensible y específico, permitiendo detectar incluso animales con lesiones focales en las fases iniciales de la infección [Milner *et al.*, 1989; Sockett *et al.*, 1992; González, 2003; Delgado *et al.*, 2013].

Los estudios sobre paratuberculosis bovina realizados en México son escasos. En un trabajo llevado a cabo en el estado de Hidalgo, por Miranda (2005) se comprobó que esta enfermedad estaba bastante extendida y era una causa importante de pérdidas económicas en el ganado bovino.

La tuberculosis y paratuberculosis guardan numerosas similitudes. En ambos casos, tienen una etiología micobacteriana, y ambos agentes comparten antígenos comunes. Desde el punto de vista lesional, se trata de inflamaciones de tipo granulomatoso, con presencia de linfocitos, macrófagos, células gigantes de Langhans y células epiteloideas [Potel, 1974; Bernabé *et al.*, 1991; Dungworth, 1993; Gutiérrez-Cancela y García Marín, 1993;

Huchzermeyer *et al.*, 1994]. Las principales diferencias lesionales entre tuberculosis y paratuberculosis bovina vienen dadas por su diferente localización y la morfología de las lesiones; mientras que la tuberculosis se caracteriza por la formación de granulomas bien definidos, encapsulados en las fases avanzadas [Nieberle y Cohrs, 1966; Gutiérrez-Cancela, 1996], la paratuberculosis cursa con un infiltrado difuso de células epiteloideas en el intestino [Momotami y Yoshino, 1985; González, 2003].

Además, en la tuberculosis se puede observar la presencia de necrosis por caseificación que afecta principalmente al pulmón y nódulos linfáticos asociados [Nieberle y Cohrs, 1966; Gutiérrez-Cancela, 1996], mientras que en la paratuberculosis bovina la existencia de necrosis en el intestino o ganglios regionales es una alteración extremadamente rara [Momotami y Yoshino, 1985; González, 2003].

Uno de los mayores problemas que ocasiona la coexistencia de ambas enfermedades en una explotación es la complicación que añade a la interpretación de los métodos de diagnóstico inmunológico, ya que se producen reacciones cruzadas. La principal consecuencia, es la aparición de reacciones falsamente positivas, que la infección paratuberculosa puede causar en las campañas oficiales de la erradicación de la tuberculosis bovina [Johnson *et al.*, 1949; Yokomiso *et al.*, 1983; Nain *et al.*, 1985; Arellano-Reynoso *et al.*, 1999]. Por ello, para una necesaria evaluación de los métodos inmunológicos, es preciso llevar a cabo un estudio *post-mortem* confirmatorio de dichas infecciones, empleando técnicas de diagnóstico anatomopatológico y etiológico en tejidos.

En México son muy escasos los estudios que se han realizado sobre el diagnóstico de tuberculosis y paratuberculosis bovina en la inspección *post mortem*, teniéndose muy pocos datos acerca de su prevalencia. Considerando la importancia que estas enfermedades tienen en la ganadería bovina y también sus implicaciones zoonóticas, y bajo la hipótesis de que están muy extendidas en México, el **objetivo general** de este trabajo de tesis doctoral es contribuir a conocer la prevalencia de la tuberculosis y paratuberculosis bovinas en animales sacrificados en matadero en una región de México, y además valorar la eficacia de distintas técnicas diagnósticas para su detección. Para ello, nos hemos fijado los siguientes objetivos concretos:

Introducción y Objetivos

Primero:

Evaluar la eficacia del diagnóstico *post mortem* de tuberculosis y paratuberculosis bovina mediante el estudio macroscópico, el examen histopatológico y el diagnóstico etiológico mediante PCR en muestras de tejido seleccionadas y definidas.

Segundo:

Comparar los resultados del diagnóstico serológico frente a tuberculosis y paratuberculosis bovina mediante un ELISA indirecto, con los hallazgos de los estudios *post mortem* (histopatológicos y de PCR) en tejidos.

Tercero:

Evaluar los resultados de la prueba de intradermorreacción simple con PPD bovina en relación con el diagnóstico *post mortem* realizado, mediante técnicas histopatológicas y de PCR de tuberculosis y paratuberculosis, valorando la existencia de posibles reacciones cruzadas.

Cuarto:

Estudiar la relación entre los resultados del diagnóstico inmunológico mediante la prueba de intradermorreacción y el ELISA indirecto frente a tuberculosis y paratuberculosis.

Quinto:

Valorar la posibilidad de establecer protocolos eficaces de diagnóstico diferencial de tuberculosis y paratuberculosis bovina basados en una toma de muestras sencilla y de aplicación en la inspección de mataderos.

Sexto:

Establecer la prevalencia de la tuberculosis y paratuberculosis bovinas en una población de bovinos sacrificados en matadero en la región de Nayarit (México), mediante técnicas de diagnóstico inmunológico e histopatológico.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

“La educación es el arma más poderosa que puedes usar para cambiar el mundo”

Nelson Mandela (1918-2013)

II.1. ETIOLOGÍA DE LAS MICOBACTERIAS.

Las micobacterias se engloban dentro del género *Mycobacterium*, familia *Mycobacteriaceae*, suborden *Corynebacterinae*, orden *Actinomycetales*, subclase *Actinobacteridae*, clase *Actinobacteria*, división *Firmacutes*, superreino *Bacteria* [Stackebrandt *et al.*, 1997; Tejedor, 2002; Smith, 2003; Pérez-Arellano *et al.*, 2005; Mantilla, 2007].

En 1980 el género *Mycobacterium* estaba constituido por 41 especies, tanto patógenas estrictas como saprófitas e incluso formas intermedias, que posteriormente llegó a ampliarse a 71 especies [Skerman *et al.*, 1980; Shinnick y Good, 1994]. Las micobacterias se encuentran estrechamente relacionadas con los géneros *Corynebacterium* y *Nocardia* [Wayne y Kubica, 1986].

Dentro del género *Mycobacterium* existen algunas especies que tienen entre sí un grado elevado de homología, tanto estructural como fisiológica, que obliga a considerarlas como complejos independientes dentro del género. Entre ellas, destaca el complejo *Mycobacterium tuberculosis* que engloba a las especies: *Mycobacterium tuberculosis*, la más importante a nivel sanitario, por ser la principal causa de la tuberculosis humana, *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium caprae* de gran importancia en países en vías de desarrollo por ser la causante de la tuberculosis animal, *Mycobacterium africanum* responsable minoritario de los casos de tuberculosis en África y *Mycobacterium microti* responsable de la tuberculosis en roedores y actualmente descrita en humanos principalmente inmunodeprimidos. Por otro lado, el complejo *Mycobacterium avium* que principalmente incluye a *M. avium avium*, *M. a. intracellulare* y *M. a. paratuberculosis* [Wayne y Kubica, 1986; Pritchard, 1988; Cosivi *et al.*, 1998; Kremer *et al.*, 1998; Van Sooligen *et al.*, 1998; Forthingham *et al.*, 1999; Miltgen *et al.*, 2002; Smith, 2003; Thoen y Barletta, 2006].

Según la bibliografía consultada [Haagsma, 1993; Tejedor, 2002; Barrón *et al.*, 2006; Sevilla, 2007] los componentes de este género muestran las siguientes características esenciales:

- 1) Presentan ácido-alcohol resistencia, ya que las micobacterias no se decoloran en soluciones al 3% de ácido y 95% de etanol después de haber sido teñidas con colorantes básicos. Esta resistencia es una propiedad conferida por su membrana constituida por ácidos micólicos de 60-90 carbonos, que evita la eliminación de los colorantes una vez absorbidos.
- 2) Débilmente positivas a la tinción de Gram.

- 3) Son inmóviles.
- 4) No forman esporas, cápsula, conidios ni hifas visibles sin embargo, son más resistentes al calor, cambios de pH y desinfección, que otras bacterias no formadoras de esporas.
- 5) Crecen en condiciones aerobias.
- 6) La morfología se corresponde con bacilos delgados, rectos o ligeramente curvados, aunque en menor proporción suelen presentar crecimiento filamentoso o pseudomiceliar del que pueden desprenderse formas bacilares o cocáceas.

La temperatura óptima de crecimiento es entre 30 y 45°C, y el contenido en G+C del ADN cromosómico es del 61-71% [Wayne y Kubica, 1986; Levy-Frebault y Portaels, 1992; Tejedor, 2002; Mantilla, 2007; Sevilla, 2007].

Las principales propiedades estructurales y antigénicas de las micobacterias son su compleja pared celular, que se encuentra internamente formada por una capa de peptidoglicanos llamada mureína, que se encarga de dar rigidez y forma y es, la responsable del poder adyuvante de la micobacteria; más externamente se encuentra la capa de arabinogalactano a la que se unen los ácidos micólicos como sulfolípidos y dimicolatos de trealosa (*cord factors*) hacia el exterior siendo los principales responsables de la ácido-alcohol resistencia [Merkal *et al.*, 1975; Stanford, 1983; Chiodini y Van-Kruiningen, 1985; Grange *et al.*, 1990; Daffe y Draper, 1998]. Por último, la capa más externa está formada por micósidos, un complejo grupo de glucolípidos de superficie, específicos de especie y que permite a las micobacterias patógenas resistir a la acción de las enzimas lisosómicas [Grange *et al.*, 1990].

Una de las características sin duda más conocidas de su identidad es su propiedad de resistencia a la decoloración con ácidos y alcoholes, debido a su alto contenido de lípidos en la pared celular micobacteriana, hasta un 60% de su peso seco [López *et al.*, 2006]. Dicha característica estructural de las micobacterias es la responsable de que éstas crezcan como colonias hidrofóbicas en medios sólidos o en medios líquidos como filamentos de tipo fúngico. Este aspecto que presentan en el medio líquido, da nombre al género, puesto que *myces* significa hongo [Wolinsky, 1980].

Otras características de las micobacterias que son empleadas en la diferenciación de especies, hacen referencia a su desarrollo en nuevos medios de cultivo, velocidad de crecimiento y dependencia de ciertas sustancias como las micobactinas [Goodfellow y Wayne, 1982; Chiodini, *et al.*, 1984; Thorel, 1984; Marco y Adúriz, 1990; Juste, 1997].

Por último, queda por introducir el concepto de *micobacterias atípicas*, oportunistas conocidas como MOTT (*micobacteria other than tubercle bacilli*) que son aquellas micobacterias saprofitas del medio ambiente que no producen tuberculosis, ni se transmiten entre los hospedadores, pero tienen gran importancia como agentes sensibilizadores en diferentes test diagnósticos de la tuberculosis [Pritchard, 1988] ya que siendo unas oportunistas pueden aislarse en muestras patológicas.

II.2. TUBERCULOSIS BOVINA.

La tuberculosis bovina es una enfermedad infectocontagiosa que causa significativas pérdidas económicas a nivel mundial, tanto por la muerte de animales como por los recursos destinados a su erradicación, ya que se trata de una zoonosis y son muchas las muertes humanas que se producen como consecuencia de la infección por la micobacteria causal. Esta infección crónica producida por *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), afecta principalmente al aparato respiratorio y cursa con la emaciación progresiva e incluso la muerte de los animales afectados, en los que se observa una inflamación de carácter granulomatoso en diferentes órganos, especialmente pulmones y nódulos linfáticos regionales. [Retamal y Ábalos, 2004; Smith *et al.*, 2006; Acosta-Salinas, *et al.*, 2009; García-Bocanegra *et al.*, 2010].

La existencia de infecciones por micobacterias data de hace miles de años, habiéndose encontrado el agente incluso en momias egipcias. Se estima que el bacilo de la tuberculosis se estableció con el desarrollo urbano en la Edad Media en Europa, para luego diseminarse al Nuevo Mundo con los viajes de los descubridores, aunque la enfermedad ya existía en personas en América por lo menos 700 años antes de nuestra era [Ábalos y Retamal, 2004].

La prevalencia de la enfermedad a nivel mundial es aún muy elevada, pese a las numerosas y largas campañas de erradicación que se han llevado a cabo en muchos de los países. Gracias a la prueba de intradermorreacción (IDR) en países como Dinamarca, Holanda, Luxemburgo, Gran Bretaña, Estados Unidos y Australia se considera erradicada [Pritchard, 1988; Caffrey, 1994; Huchzermeyer *et al.*, 1994; McDonald *et al.*, 1999; Maartens y Wilkinson, 2007; WHO, 2009; Mouriño *et al.*, 2011].

La tuberculosis bovina es considerada una zoonosis grave. Sus víctimas se encuentran, sobre todo, entre la población de las zonas rurales, obligadas a vivir en estrecho contacto con los animales; además, la ignorancia y las deficientes condiciones higiénicas y de manejo de los animales favorecen el contagio y dificultan el establecimiento y éxito de las medidas de control de la enfermedad de los bovinos, con el fin de su erradicación [Pritchard, 1988; Neil y Pollock, 2000; Solmaz *et al.*, 2009].

La epidemia mundial del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) ha favorecido el desarrollo de la tuberculosis en seres humanos. Es especialmente preocupante en África donde el 94% de la población vive en países en los cuales el control de tuberculosis bovina no se lleva a cabo o se hace parcialmente [Ábalos y Retamal, 2004].

2.1. Importancia de la tuberculosis bovina en la inspección *post mortem*.

En México, como en otros muchos países existen diversas normas oficiales en las que se regulan las características idóneas para los centros de sacrificio, y la manera en que los animales deben ser sacrificados, con su respectiva verificación sanitaria para el proceso de producción de la carne [Villanueva y De Aluja, 1998]. En este país la encargada de emitir estas normas es la Secretaría de Ganadería, Agricultura y Desarrollo Rural (SAGAR), fundamentadas en la Ley Federal sobre la Metrología y Normalización, en el reglamento interior de la Secretaría, y el Reglamento de la Industrialización Sanitaria de la Carne Tipo Inspección Federal (TIF). Además existen manuales sobre el manejo de la carne, emitidos por la Secretaría de Salud (SSA) con base en la Ley Federal de Sanidad Animal. [Villanueva y De Aluja, 1998].

Las normas oficiales más importantes para los centros de sacrificio animal en México son: la Norma Oficial Mexicana 194-SSA1-2004 que tiene como objeto establecer las especificaciones sanitarias que deben cumplirse en los establecimientos dedicados al sacrificio y faenado de animales para consumo humano, así como las especificaciones sanitarias que deben cumplir los productos [NOM-194-SSA1-2004], la Norma Oficial Mexicana 006-SSA2-1993 cuyo objeto es la prevención y control de la tuberculosis en la atención primaria a la salud [NOM-006-SSA2-1993] y la Norma Oficial Mexicana 031-ZOO-1995 que tiene como función principal la prevención, control y erradicación de las plagas y enfermedades que como la tuberculosis bovina afectan a la ganadería, a la producción animal y, al comercio nacional e internacional, (no sólo por lo que se refiere a la calidad de los productos de origen animal sino por ser un problema de tipo zoonótico y de salud pública). [NOM-031-ZOO-1995; Cosivi *et al.*, 1998; Renwick *et al.*, 2007]. Dichas normas cuentan con la aprobación del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, y son publicadas en el Diario Oficial de la Federación, de acuerdo a lo previsto en la Ley Federal sobre Metrología y Normalización.

La vigilancia en mataderos representa un componente fundamental en el programa nacional de erradicación de la tuberculosis bovina. Es muy importante realizar la inspección *post mortem* de manera minuciosa y más, cuando se trata de la única herramienta de monitorización de la tuberculosis [Corner *et al.*, 1991; Estrada-Chávez *et al.*, 2004]. Este es un método eficiente en la detección de infección y permite comprobar la existencia o no de la enfermedad en un hato [Corner *et al.*, 1990; González, 2003]. Además

la inspección *post mortem* es útil para realizar estudios de prevalencia y caracterización de lesiones macroscópicas de tuberculosis [García Castro, 2007].

Actualmente en América Latina, la tuberculosis bovina es un problema de salud grave tanto en la especie humana como en bovinos y se encuentra lejos de ser erradicada, por lo que la inspección *post mortem* es una herramienta fundamental que debe ser aplicada en los programas de control [Tolson y Jervois, 1990; López *et al.*, 2006].

Para la inspección *post mortem* de la tuberculosis bovina se realiza la incisión de los ganglios linfáticos de la cabeza (mandibulares, parotídeos y retrofaríngeos), tórax (mediastínicos y traqueobronquiales) y abdomen (mesentéricos) [NOM-031-ZOO-1995], además de la inspección, palpación e incisión de diversos órganos, especialmente el pulmón. Se trata de un procedimiento convencional que se lleva a cabo en todos los animales sacrificados en los mataderos de México, al igual que en otros países. Los hallazgos de lesiones tuberculosas en la inspección *post mortem* y los posteriores estudios de laboratorio son fundamentales en el diagnóstico de la tuberculosis bovina [López *et al.*, 1997].

La experiencia de muchos países ha demostrado que la inspección *post mortem* es necesaria en la vigilancia epidemiológica, y la información que puede aportar posee un valor indiscutible, siendo este un método de seguimiento complementario a la tradicional prueba tuberculínica. [Torres y Kantor, 1996].

2.2. Epidemiología.

En la epidemiología de la infección por *M. bovis* se describen dos tipos de hospedadores: los de mantenimiento que, son los capaces de infectarse, enfermar y diseminar la bacteria a otros individuos susceptibles, permitiendo que la infección se establezca en las poblaciones en ausencia de otra fuente de infección, y los incidentales o también conocidos como los “*spillover hosts*”, capaces de infectarse y cursar con la enfermedad, pero en los que es infrecuente la diseminación a otros individuos, ya que se requiere de una fuente externa de infección para mantener la enfermedad en la población. Del total de especies susceptibles, la mayoría son hospedadores incidentales, incluido el ser humano [Ábalos y Retamal, 2004]. Cuando alguno de los tipos de hospedadores actúan como reservorios en la naturaleza, la erradicación de la tuberculosis bovina es muy complicada [Morris *et al.*, 1994].

La transmisión de la enfermedad puede tener diversas vías de infección, aunque se considera producida principalmente por vía aerógena y por contacto directo [Ritchie, 1959; Schulz y Trautwein, 1985; O'Reilly y Daborn, 1995]. Nieberle (1931) a través del estudio

de la localización anatómica de las lesiones encontradas en mataderos, sugirió que la vía aerógena infectaba entre el 80 y 90% del ganado bovino por inhalación de las partículas de Pflüger cargadas de bacilos [Collins *et al.*, 1994; Vanham *et al.*, 1997; Hernández *et al.*, 2000; Michel *et al.*, 2010; Rivera y Giménez, 2010]. Francis (1947) corroboró estos datos y señaló que sería necesaria una dosis infectiva muy baja en el pulmón, incluso una sola bacteria, para que se establezca una infección efectiva en el bovino [Ábalos y Retamal, 2004]. Sin embargo, para Chaussé (1913) se necesitarían al menos cinco bacilos para desarrollar la infección en el pulmón.

Algunas investigaciones llevadas a cabo para estudiar la transmisión de la infección [Costello *et al.*, 1998] muestran que bovinos infectados de forma natural, con tubérculos pulmonares, pueden ser fuente de infección para otros bovinos cuando permanecen en alojamientos cerrados, sin ventilación adecuada, como ocurre en los sistemas de producción intensivos, que contrariamente a los extensivos, facilitan el contacto directo de los animales y favorecen la propagación de la tuberculosis y numerosas enfermedades respiratorias [Radosistis *et al.*, 1994; Cousins, 2001; Thrusfield *et al.*, 2001]. Esto puede ser la causa de que la prevalencia de tuberculosis en el ganado varíe según el sistema de producción, estimándose que en el ganado vacuno en régimen extensivo se sitúa entre el 1 y 5%, mientras que en ganado lechero puede alcanzar el 25-50% [Francis, 1947].

Además de la vía respiratoria, existen otras menos comunes, como la alimentaria (tuberculosis alimentaria o enterógena), la cutánea, la congénita a través de la vena umbilical que en ausencia de medidas de control se produciría en el 1% de los terneros nacidos de vacas tuberculosas, causando lesiones en hígado y la genital, que origina lesiones en útero y en pene [Nieberle, 1931; Francis, 1947; Ritchie, 1959; Pallaske, 1962; Schulz y Trautwein, 1985; O'Reilly y Daborn, 1995]. En el caso de la tuberculosis humana de origen bovino, un buen número de casos cursan como tuberculosis digestivas o escrófula (inflamación de los nódulos linfáticos cervicales), atribuidas al consumo de leche no pasteurizada [Pritchard, 1988]. Entre el 1 y 2% de las vacas tuberculosas eliminan el bacilo por leche [O'Reilly y Daborn, 1995; Zanini *et al.*, 1998; Abdala y Tarabla, 2007].

El agente causal de la tuberculosis bovina, no expuesto a la luz solar, puede sobrevivir en heces, sangre y orina aproximadamente un año a temperaturas de 12 a 14°C, periodo que se reduce a 18-31 días si existe dicha exposición y si la temperatura es más elevada (entre 24 y 43°C) [Abdala y Tarabla, 2007; Sánchez *et al.*, 2009].

2.2.1. Hospedadores susceptibles a *Mycobacterium bovis*.

2.2.1.1. Hombre.

El hombre es un hospedador reconocido de *M. bovis* y se ha señalado que es posible la transmisión de esta infección entre personas [Pritchard, 1988; Van Soolingen *et al.*, 1994]. *M. bovis* puede causar los mismos cuadros patológicos en el hombre que *M. tuberculosis* [Ácha y Szyfres, 2001].

La OMS estimó que la incidencia de la tuberculosis en la especie humana durante la última década, en todo el mundo ha aumentado de manera preocupante, refiere que en 2005 hubo 88 millones de nuevos casos en personas [Araujo *et al.*, 2008]. A nivel mundial *M. bovis* fue responsable del 2 al 8% de los casos de tuberculosis en humanos [Pérez-Guerrero *et al.*, 2008].

En algunas regiones de México la participación de *M. bovis* en casos de tuberculosis humana, se ha estimado hasta en un 7% mientras que en la zona fronteriza de los Estados Unidos la proporción llega hasta un 40% [Acosta-Salinas *et al.*, 2009; Milián Suazo *et al.*, 2012]. Sin embargo, la información epidemiológica que se tiene sobre la implicación de este agente etiológico es escasa, por las siguientes razones:

- 1) El diagnóstico se realiza por baciloscopía que no permite distinguir *M. bovis* de *M. tuberculosis*. Sólo en un 1% de los casos se realiza cultivo bacteriológico.
- 2) Cuando se realizan cultivos se utiliza principalmente el medio Löwenstein-Jensen en el que *M. bovis* crece con dificultad.
- 3) Debido a su mecanismo de transmisión, la mayor parte de las infecciones por *M. bovis* son pulmonares, siendo difíciles de detectar, por lo que prácticamente no son notificadas [Vourinen *et al.*, 1995; Yajko *et al.*, 1995; Forthingham *et al.*, 1999; Araujo *et al.*, 2008].

Aunque la obligación de pasteurizar la leche y el control de la tuberculosis bovina han ocasionado un incremento de la vía aerógena como principal forma de contagio entre el hombre y el ganado bovino en uno y otro sentido [Morales *et al.*, 2008], aún en 1992 en México se produjeron siete millones de litros de leche y sólo un 20% de ella fue pasteurizada. Un 40% de leche sin pasteurizar fue destinado a la industria de derivados mientras que el 40% restante fue consumido sin tratamiento térmico [Yañez *et al.*, 1996].

2.2.1.2. Tejón (*Meles meles*).

La primera descripción de tuberculosis en el tejón se remonta a 1956 en Suiza [Bouvier *et al.*, 1957]. Posteriormente, en Gran Bretaña se demostró la importancia de estos animales en la epidemiología de la tuberculosis bovina, tras el hallazgo de tejones tuberculosos en el curso de una investigación sobre las causas de un inexplicable foco de tuberculosis en ganado bovino [Collins *et al.*, 1994].

La participación del tejón se considera el principal reservorio de vida libre en Irlanda y Gran Bretaña. Los datos sobre su prevalencia únicamente existen en estos países, siendo especialmente elevada en las zonas sur y oeste de Gran Bretaña, donde la prevalencia de tuberculosis en vacas es más alta [Gallagher y Clifton-Hadley, 2000; Delahay *et al.*, 2002]. Un trabajo realizado por Bourne y colaboradores en 2007 encuentra una prevalencia que oscila entre el 2 y 37% en tejones procedentes de 10 zonas de alta prevalencia de tuberculosis bovina en el sur de Inglaterra [Bourne *et al.*, 2007]. En otros países como Suiza [Bouvier *et al.*, 1957] y España [Sobrino *et al.*, 2008; Balseiro *et al.*, 2013] también se ha identificado la infección tuberculosa en esta especie animal.

Los tejones frecuentan los lugares de pastoreo, escarbando en busca de gusanos y es ahí donde excretan *M. bovis* por las heces, orina, esputos y a través de lesiones abiertas [Muirhead *et al.*, 1974; Wilesmith, 1991; O'Reilly y Daborn, 1995]. Aunque se desconoce el grado exacto de intervención del tejón en la epidemiología de la tuberculosis bovina, su papel como reservorio se ha considerado una de las causas fundamentales del fracaso de los programas de erradicación de la tuberculosis. [Griffin y Buchan, 1993].

2.2.1.3. Zarigüeya (*Trichosorus vulpécula*).

El primer hallazgo de un caso natural de tuberculosis en la zarigüeya se produjo en 1967 en una granja en Nueva Zelanda con tuberculosis endémica [Pfeiffer y Morris, 1991; Morris *et al.*, 1994]. La prevalencia de la tuberculosis en la zarigüeya ronda el 5%, encontrándose las lesiones de carácter exudativo y con presencia de gran número de bacilos en el aparato respiratorio y en los ganglios linfáticos superficiales [Pfeiffer y Morris, 1991; Morris *et al.*, 1994; Tweddle y Livingston, 1994; Ryan *et al.*, 2006]. El único programa de control de tuberculosis en esta especie ha consistido en la eliminación de animales en las áreas afectadas, ya que la zarigüeya se considera una plaga en Nueva Zelanda, por lo que la medida ha sido favorablemente aceptada. [Ryan *et al.*, 2006].

2.2.1.4. Otras especies silvestres.

La tuberculosis bovina en animales salvajes se describió por primera vez en 1929 en Sudáfrica en el kudú (*Tragelaphus strepsiceros*) y en el duiker (*Sylvicapra grimmii*)

[Michel, 2002]. En Uganda se determinó en 1982 una prevalencia del 10% en el búfalo africano (*Syncerus caffer*) y del 9% en el cerdo verrucoso (*Phacochoerus aethiopicus*). [Michel *et al.*, 2006].

En Zambia se describió en el kafue lechue (*Kabus leche kafuensis*) y en un eland (*Traurotragus oryx*) [Koniha *et al.*, 1980]. En Kenia en los babuinos verdosos salvajes (*Papio cycocephalus anubis*) [Bengis *et al.*, 1996; de Lisle *et al.*, 2001]. También se ha diagnosticado la infección por *M. bovis* en búfalos africanos del Parque Nacional Kruger de Sudáfrica y, más recientemente, se han encontrado afectadas otras especies como el babuino chacma (*Papio ursinus*), el león (*Panthera leo*) y el guepardo (*Acynonyx jubatus*) [Koniha *et al.*, 1980; Bengis *et al.*, 1996; de Lisle *et al.*, 2001; Wobeser, 2009].

Así mismo, se ha comprobado de forma esporádica la presencia de tuberculosis en animales silvestres que viven en zoológicos, en granjas, en laboratorios, en casas o cerca del hombre o de los animales domésticos, como las cabras salvajes [Sanson, 1988], cerdos salvajes [Corner y Pearson, 1978], llamas [Thoen *et al.*, 1988], el búfalo de agua, ciervo salvaje, foca, jabalí, etc. [Naranjo *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2009] Estas especies parecen ser transmisoras de la enfermedad en un número bajo de casos [Guilbride *et al.*, 1963; Hein y Tomasovic, 1981; Clifton-Hadley y Wilesmith, 1991; Mirsky *et al.*, 1992; Cousins *et al.*, 1993; Thorel y Moutou, 1994].

También se ha descrito la enfermedad en primates no humanos y grandes félidos [O'Reilly, 1993a] así como brotes en explotaciones de visones y zorros plateados, sobre todo en Canadá, donde la tuberculosis bovina es endémica en visones salvajes [Van Soelingen *et al.*, 1994]. De forma esporádica, descripciones esporádicas aparecen en conejos [Gill y Jackson, 1993], en liebre [Cooke *et al.*, 1993] y hurones [de Lisle *et al.*, 1993]. En España *M. bovis* fue aislado a partir de muestras de ciervos, gamos, lince ibérico y liebre [Aranaz *et al.*, 2004; Hermoso de Mendoza *et al.*, 2006; Parra *et al.*, 2006; Vicente *et al.*, 2006; Gortázar *et al.*, 2008].

2.2.1.5. Especies domésticas.

La infección por *M. bovis* también se ha descrito, aunque habitualmente como casos aislados, de forma esporádica en animales domésticos como el perro, gato, cerdo, caballo y oveja, entre otros [Luke, 1958; Corner y Pearson, 1978; Morris y Pfeiffer, 1995; Palmer, 2007]. Sin embargo, son la especie bovina y caprina las que parecen mostrar una mayor susceptibilidad.

2.3. Prevalencia.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que la incidencia de la tuberculosis humana en la población mundial durante la década 1990-1999 fue de 88 millones de casos con una mortalidad de 30 millones de personas [Poumián, 2000]. Así mismo, se estima que entre los años 2002 y 2020 en todo el mundo aproximadamente 1.000 millones de personas se infectarán, más de 150 millones desarrollarán la enfermedad y 36 millones morirán de tuberculosis [NOM-031-ZOO-1995].

La tuberculosis en humanos ocupa en México el lugar número 17 entre las causas de muerte y el primero como causa de muerte por un solo agente infeccioso. De acuerdo con las notificaciones de los casos de tuberculosis, en todas sus formas, remitidas a la Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud en 1996, México se encuentra entre los países de América con tasas de incidencia entre 25 y 85/100 000 [Morán *et al.*, 2000].

Se calcula que *Mycobacterium bovis* es responsable de aproximadamente un 3% de los casos de tuberculosis humana en el mundo [López *et al.*, 2006]. En México, la tuberculosis humana de origen animal tiene una prevalencia aproximada del 17% [Pérez-Guerrero *et al.*, 2008]. Como hemos comentado anteriormente, de los 7 mil millones de litros de leche que se producen, aproximadamente entre el 30 y 40% se consume sin pasteurizar y esta podría ser la causa de la elevada prevalencia de la infección [López *et al.*, 2006; Pérez-Guerrero *et al.*, 2008].

Respecto a la tuberculosis bovina, en la inspección *post-mortem* en ganado no procedente de las Campañas de Saneamiento, se han encontrado los siguientes datos de prevalencia:

Un 0,16% de prevalencia en Uberlandia (Brasil) determinada en el periodo de 1979 a 1983 tras la inspección de 161.437 bovinos [Oliveira *et al.*, 1986]. En Sao Paulo y otros estados brasileños fueron inspeccionados un total de 1.495.976 vacunos en 1982, presentando tuberculosis en un 0,36% [Ricetti *et al.*, 1989]. En el periodo de 1984-1996 en el matadero de Triangulo (Brasil) se observó una prevalencia del 0,13% de un total de 281.326 vacunos sacrificados [Oliveira *et al.*, 1999].

En los Estados Unidos, en 1989 se sacrificaron 33.500.000 bovinos, de los cuales sólo el 0,0004% tenían lesiones tuberculosas [Ácha y Szyfres, 2001]. En 1995 esta prevalencia alcanzó un 0,05% cuando se refirió a vacunos procedentes de México [Brown y Hernández de Anda, 1998].

En México, López *et al.* (1997) realizaron un estudio en 505 decomisos por tuberculosis, donde un 49% fueron clasificados como micobacteriosis y el 51% restante fue compatible con otros diagnósticos diferenciales (actinobacilosis, actinomicosis, granuloma eosinofílico). En seis mataderos de México entre 1996 y 1997 se observaron lesiones macroscópicas de tuberculosis en el 16% de 2.500 vacunos inspeccionados (93% mayores de 2 años) [Milián Suazo *et al.*, 2000]. En Baja California, donde anualmente se sacrifican unos 200.000 vacunos, en 1995 y 1996 se obtuvo una incidencia en la inspección *post mortem* del 0,12% y del 0,46% respectivamente. [Hernández de Anda *et al.*, 1997].

2.4. Patogenia.

Clásicamente, en la patogenia de la tuberculosis bovina se han reconocido diferentes fases, desde que el animal entra en contacto con *M. bovis* hasta que se producen las formas clínicas más graves, que se describen a continuación [Nieberle y Cohrs, 1966; Potel, 1974; Dahme y Weiss, 1988]:

2.4.1. Primoinfección.

Cuando el bacilo penetra en el organismo, se desarrolla un foco de inflamación exudativa con tendencia a sufrir una caseificación rápida seguida de calcificación, en el órgano diana. Aproximadamente a los 8 días aparecen los primeros focos primarios visibles, formados por un centro necrótico rodeado de un infiltrado inflamatorio granulomatoso de células epitelioides y gigantes, rodeadas por linfocitos. A continuación, los bacilos son transportados rápidamente por la linfa a los ganglios linfáticos regionales ocasionando lesiones similares. A esta lesión que se forma en un principio, caracterizada por afectación del órgano y del nódulo linfático asociado, se le denomina Complejo Primario Completo. A la presencia de estas lesiones también se le conoce por la ley de localización de Cornet. Cuando falta la lesión del órgano y persiste la del nódulo linfático, se denomina Complejo Primario Incompleto.

El foco primario puede desarrollarse en cualquier parte del cuerpo accesible desde el exterior, apareciendo con mayor frecuencia en el aparato respiratorio y el tracto digestivo (faringe o intestino) y con menor probabilidad en la piel, tracto genital y glándula mamaria. En caso de tuberculosis en la placenta, se localiza en el hígado del feto. La frecuencia relativa de este complejo puede variar con la edad. En el vacuno adulto, un 90-95% de estas lesiones pueden observarse en los pulmones y un 5-10% en el tracto digestivo. En terneros jóvenes, un 49% de las lesiones se localizan en hígado, 38% en pulmón y un 13% en el tracto digestivo.

2.4.2. Periodo post-primario.

Es una forma de tuberculosis observada con mayor frecuencia en el ganado bovino. Puede desarrollarse de forma endógena por exacerbación de focos del periodo de primoinfección, o de forma exógena por nueva entrada de bacilos. Se caracteriza por tener solo una forma de diseminación, la intracanalicular, sus lesiones tienden a sufrir reblandecimiento y no existe lesión ganglionar. Por el modo de diseminación su proceso suele quedar limitado a un órgano o sistema orgánico, siendo el curso de la enfermedad lento pero continuo (*tuberculosis orgánica crónica*). El reblandecimiento de las lesiones tiene como consecuencia una ruptura precoz hacia los conductos, eliminándose los bacilos al exterior con exudados y secreciones (“tuberculosis abierta”), aunque puede haber encapsulación y cicatrización de lesiones.

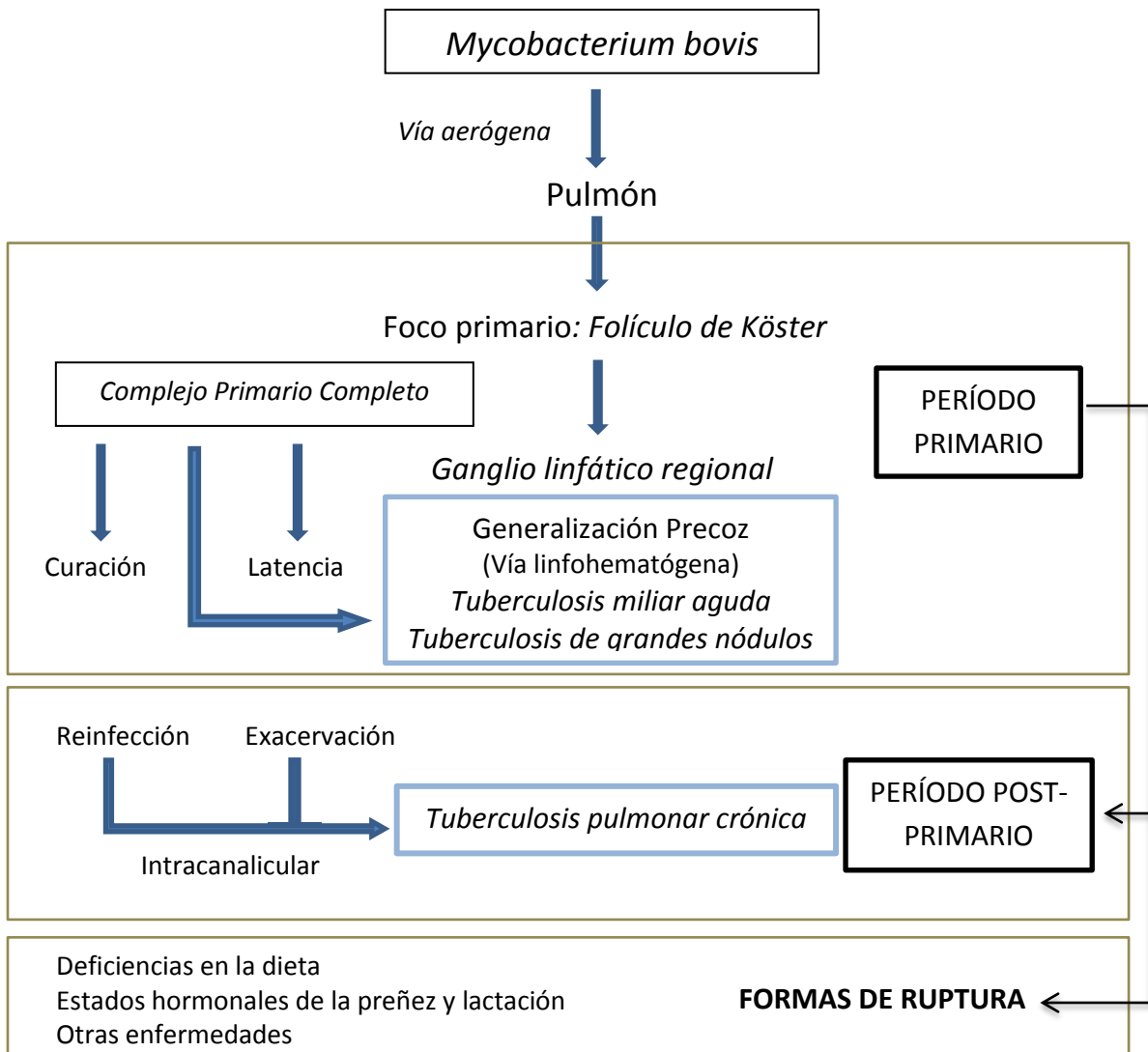


Figura II.1. Etapas de la tuberculosis en el pulmón [García Marín, 1996].

2.4.3. Fase de ruptura.

Las deficiencias en la dieta, cambios hormonales que suceden en la preñez y lactación así como la coexistencia de otras enfermedades e inmunodeficiencias hacen que la resistencia relativa adquirida durante la Primoinfección y el Período Post-primario puedan fallar. Estas formas tuberculosas estarían encuadradas en los espectros lepromatosos intermedios (*border line lepromatous forms*) del espectro inmunopatológico de las infecciones por micobacterias. Por lo regular podemos observar la presencia de un gran número de bacilos en los focos caseosos. Los bacilos tuberculosos alcanzan rápidamente la circulación linfática y sanguínea, de tal manera que, cuando la Ley de localización de Cornet se cumple, puede observarse al principio como el ganglio linfático ha sufrido una tumefacción y en pocas horas sufre una necrosis por coagulación o una caseificación primaria y seca con una coloración amarillo-blanquecina, mostrando en la superficie de corte un punteado rojizo (sangre). El paso de bacilos a la corriente sanguínea conduce a una bacteriemia y frecuentemente una generalización (generalización tardía).

Existen factores que determinan el curso de la tuberculosis y su cuadro lesional, es decir, que la inflamación sea preferentemente exudativa o proliferativa, como la: resistencia individual, la especie animal (la caseificación es más común en bovino, porcino y ovino, mientras que en el caprino además de la caseificación se da el reblandecimiento), el tipo de bacilo tuberculoso y el órgano y tejidos implicados [Huchzermeyer *et al.*, 1994].

2.5. Respuesta inmunitaria.

En general, la respuesta inmune frente a un agente patógeno puede ser de tipo celular o de tipo humoral; la primera está mediada por células, fundamentalmente macrófagos y linfocitos T, y se va a constituir en la principal respuesta que interviene en la tuberculosis, mientras que la segunda depende de la producción y actuación de anticuerpos. *Mycobacterium bovis* es un patógeno intracelular que infecta células del sistema inmune del hospedador, principalmente macrófagos [Hernández *et al.*, 2000; Hope *et al.*, 2003; Smith, 2003; Waters *et al.*, 2003; Rivera y Giménez, 2010] que se van a constituir en uno de los tipos celulares claves en la interacción entre el patógeno y el hospedador.

Tras la fagocitosis de *M. bovis* por los macrófagos, se produce una activación de los linfocitos T CD4+ (cooperadores), que secretan diferentes citoquinas (principalmente el interferón-gamma) que actúan favoreciendo la migración de los nuevos macrófagos a partir de los monocitos del torrente sanguíneo hasta el foco de la lesión, donde se produce su proliferación y activación de dichas células permitiendo así la destrucción de las micobacterias fagocitadas [Bendixen *et al.*, 1981; Williams y Williams, 1983; Sevilla, 2007].

Después de la activación de los macrófagos puede observarse una serie de transformaciones morfológicas (aumento de tamaño y número de organelas, de enzimas lisosomales y mitocondriales y una mayor adherencia) y bioquímicas (incremento de la actividad respiratoria, del transporte y metabolismo de la glucosa, aumento en la concentración de colesterol en la membrana, mayor producción de peróxido de hidrógeno y superóxidos), utilizados para la destrucción de los microorganismos. Esta mayor capacidad fagocitaria les permite destruir bacilos tuberculosos con mayor eficacia [Ando y Dannenberg, 1972; Edwards y Kirkpatrick, 1986].

Sin embargo, en las fases más avanzadas de la enfermedad, en las que la respuesta inmunitaria de tipo celular ha decaído (principalmente en las formas de ruptura), los macrófagos presentes en las lesiones no mostrarían el mismo grado de activación, siendo incapaces de destruir las micobacterias por lo que éstas se multiplican, llegando a desintegrar dichas células, con su posterior liberación para infectar otros macrófagos o bien, diseminarse a través de la linfa o de la sangre a otras parte del cuerpo [Whipple y Palmer, 2000].

Una vez que los macrófagos son activados en el tejido infectado, proliferan y sufren un cambio en su morfología convirtiéndose en células epitelioides, primero inmaduras y luego maduras, denominándose también “macrófagos epitelioides” [Whipple y Palmer, 2000]. Estas células poseen un gran núcleo con cromatina laxa y unos límites celulares muy poco definidos, por lo que cuando se acumulan dan un aspecto de tejido epitelial. En su citoplasma aparece el cuerpo de Schaumann, que es un complejo de sales cristalinas de calcio y cuerpos concoidales, quizás derivado de residuos lisosomales autofagocíticos. Las células epitelioides parecen no poseer función fagocitaria sino más bien productoras de diversas sustancias, como lisozima, mucoglicoproteína, esterases, β -galactosidasa, fosfatasas ácidas y enzima convertidora de angiotensina, entre otras [Williams y Williams, 1983; Bernardelli *et al.*, 2002].

Otro tipo de célula de la serie monocítica, con participación en la tuberculosis, es la célula gigante de Langhans, formada por fusión de varios macrófagos para fagocitar las bacterias. Dicha célula, de citoplasma abundante, presenta muchos núcleos, incluso más de doscientos, que están presentes principalmente en la periferia. Su función puede variar según la cepa infectante o la fase de la enfermedad, manteniendo o perdiendo su capacidad fagocítica, pero en cualquier caso conservando siempre la producción de enzimas con capacidad oxidativa (Brodbeck y Anderson, 2009). Una célula similar a esta es la llamada célula gigante de cuerpo extraño, que presenta núcleos distribuidos al azar por el citoplasma. Suele aparecer en las lesiones tuberculosas iniciales, debido al comportamiento de la micobacteria como un cuerpo extraño persistente [Mariano y Spector, 1973].

Además de los linfocitos T CD4, se ha comprobado también que la población de linfocitos T gamma-delta son capaces de reconocer a los antígenos micobacterianos [Haregewoin *et al.*, 1989; Janis *et al.*, 1989; Kabelitz *et al.*, 1990]. Según Janis *et al.* (1989) los linfocitos T gamma-delta generan una respuesta inmune primaria frente a las micobacterias tuberculosas, siendo más numerosos que las restantes poblaciones de linfocitos T en las primeras etapas.

Según se ha señalado en algunos trabajos, los polimorfonucleares neutrófilos no intervienen en la inmunidad protectora contra la tuberculosis [Ridley, 1983]. Sin embargo existen evidencias de su participación activa en la patogenia de la enfermedad. El neutrófilo es la célula principal en las lesiones inflamatorias exudativas de tipo cavernoso que aparecen en el periodo post-primario [Ridley, 1983]. También se ha postulado que los neutrófilos no pueden destruir a *Mycobacterium bovis* sino que se limitan a eliminar bacilos muertos o fragmentos de los mismos [Pritchard, 1988], sin embargo, Brown *et al.* (1987) demostraron que los neutrófilos en la especie humana son capaces de destruir *M. tuberculosis*.

2.6. Signos clínicos y lesiones macroscópicas.

La tuberculosis generalmente, no presenta manifestaciones y/o signos específicos, por ello el diagnóstico clínico tiene escaso valor, dado que la enfermedad es de curso crónico. El signo clínico más característico es el adelgazamiento progresivo, que puede acompañarse de fiebre fluctuante y que en los estadios más avanzados del proceso llega a terminar en caquexia. En ocasiones, el animal puede presentar tos seca, intermitente y dolorosa con taquipnea y disnea junto con sonidos anormales a la auscultación y percusión. Las lesiones, en ganglios linfáticos y órganos, se caracterizan por la presencia de nódulos o tubérculos con material necrótico caseoso, normalmente calcificado, que va del color blanco hasta un amarillento, cuyo tamaño y cantidad es variable. En el pulmón la lesión, siempre con un componente de necrosis caseosa importante, varía en su morfología según el tipo de neumonía que se observa de acuerdo a las diferentes fases de la patogenia de la tuberculosis.

2.7. Prevalencia.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que en 2005 hubo 8,8 millones de nuevos casos de TB, de los cuales 7,4 millones en Asia, África subsahariana y que causó la muerte a 1,6 millones de personas, entre las cuales 195,000 estaban infectadas por el Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida (VIH) [Araujo *et al.*, 2008]. Así mismo, se estima que entre los años 2002 y 2020 en todo el mundo aproximadamente 1.000 millones de personas se infectarán, más de 150 millones desarrollarán la enfermedad y 36 millones morirán de tuberculosis [NOM-031-ZOO-1995].

En México, la tuberculosis humana de origen animal tiene una prevalencia aproximada del 17%. Como hemos comentado anteriormente, de los 7 mil millones de litros de leche que se producen, aproximadamente entre el 30 y 40% se consume sin pasteurizar y esta podría ser la causa de la elevada prevalencia de la infección [López *et al.*, 2006; Pérez-Guerrero *et al.*, 2008].

La tuberculosis en humanos ocupa en México el lugar número 17 entre las causas de muerte y el primero como causa de muerte por un solo agente infeccioso. De acuerdo con las notificaciones de los casos de tuberculosis, en todas sus formas, remitidas a la Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud en 1996, México se encuentra entre los países de América con tasas de incidencia entre 25 y 85/100 000 [Morán *et al.*, 2000].

Se calcula que *Mycobacterium bovis* es responsable de aproximadamente un 3% de los casos de tuberculosis humana en el mundo. La infección por *Mycobacterium bovis* es una zoonosis, con una amplia variedad de hospedadores mamíferos, si bien *M. bovis* es primariamente un patógeno bovino [Zendejas *et al.*, 2007; Prat *et al.*, 2010].

En la inspección *post mortem* en ganado no procedente de las Campañas de Saneamiento, se han encontrado los siguientes datos de prevalencia:

Un 0,16% de prevalencia en Uberlandia (Brasil) determinada en el periodo de 1979 a 1983 tras la inspección de 161.437 bovinos [Oliveira *et al.*, 1986]. En Sao Paulo y otros estados brasileños fueron inspeccionados un total de 1.495.976 vacunos en 1982, presentando tuberculosis en un 0,36% [Ricetti *et al.*, 1989]. En el periodo de 1984-1996 en el matadero de Triangulo (Brasil) se observó una prevalencia del 0,13% de un total de 281.326 vacunos sacrificados [Oliveira *et al.*, 1999].

En los Estados Unidos, en 1989 se sacrificaron 33.500.000 bovinos, de los cuales sólo el 0,0004% tenían lesiones tuberculosas [Ácha y Szyfres, 2001]. En 1995 esta prevalencia alcanzó un 0,05% cuando se refirió a vacunos procedentes de México [Brown y Hernández de Anda, 1998].

En Baja California, donde anualmente se sacrifican unos 200.000 vacunos, en 1995 y 1996 se obtuvo una incidencia en la inspección *post-mortem* del 0,12% y del 0,46% respectivamente. [Hernández de Anda *et al.*, 1997].

En México, López *et al.* (1997) realizaron un estudio en 505 decomisos por tuberculosis, donde un 49% fueron clasificados como micobacteriosis; el 51% restante fue compatible con otros diagnósticos diferenciales (actinobacilosis, actinomicosis, granuloma eosinofílico). En seis mataderos de México entre 1996 y 1997 se observaron lesiones

macroscópicas de tuberculosis en el 16% de 2.500 vacunos inspeccionados (93% mayores de 2 años) [Milián Suazo *et al.*, 2000].

2.8. Control.

A finales del siglo XIX y a principios del XX se establecieron las primeras medidas de control de la tuberculosis bovina, consistiendo en la eliminación de los animales clínicamente enfermos, pero con particularidades distintas en cada país [Pritchard, 1988]. En 1966 Cuezva Samaniego en España, en base a las experiencias obtenidas en diferentes países para la erradicación de la tuberculosis bovina, estableció las siguientes recomendaciones para un mejor control de la enfermedad: 1) Prueba de la tuberculina intradérmica usando PPD, aislamiento a los animales reaccionantes y sacrificio de los positivos. 2) Estricto control en el tráfico de animales y su comercialización. 3) Prohibición de la aplicación de la vacuna y tratamientos. 4) Comprobar que el personal en contacto con los animales se encuentre libre de tuberculosis. 5) Desinfección tras descubrir una infección. 6) Indemnizar a los propietarios que se propusieran sanear sus establos o que lo hubieran logrado. 7) Aplicación de tratamientos capaces de eliminar en su totalidad todos los bacilos tuberculosos en todos los productos y subproductos de origen animal, tanto para consumo humano como animal.

Las campañas basadas en la aplicación del test de la tuberculina con seguimiento al sacrificio de los reaccionantes positivos ha sido el único que sistema que ha permitido la erradicación de la tuberculosis en muchos países [Radosistis *et al.*, 1994]. Dinamarca fue el primer país en declararse libre de tuberculosis bovina en 1952 y posteriormente fue erradicada en la Polinesia francesa, Somalia, Bermudas, Bahamas, Barbados, Luxemburgo, Hungría, Chipre, Noruega, Finlandia, Isla de Man, Islandia, Suiza e Israel [Pritchard, 1988; Gracey, 1989].

La Comisión Europea a finales del 2003 informó sobre la situación de la tuberculosis bovina en nueve países miembros (Alemania, Australia, Bélgica, Dinamarca, Francia, Finlandia, Luxemburgo, Países Bajos, Noruega y seis provincias de Italia) reconocidos oficialmente como libres de la enfermedad [European Commission. Health and Consumer Protection Directorate General, 2003].

En países en los que no se realiza la prueba de la tuberculina de forma obligatoria, existe un elevado riesgo para la salud pública, por lo que es necesario que se destinen mayores recursos y esfuerzos para erradicar la tuberculosis del ganado [Corner *et al.*, 1991; Pérez-Guerrero *et al.*, 2008].

II.3. PARATUBERCULOSIS BOVINA.

La paratuberculosis o enfermedad de Johne es una enfermedad infecciosa crónica, de los rumiantes que cursa con una enteritis granulomatosa y clínicamente, se caracteriza por la disminución en la capacidad productiva de los animales infectados, inducida por el proceso de mala absorción intestinal, que finalmente conduce a un estado de caquexia [Ábalos, 2001; Tejedor, 2002; Robinson *et al.*, 2008].

Esta enfermedad se describió por vez primera en Alemania a finales del siglo XIX [Johne y Forthingham, 1895]. Estos investigadores observaron bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) en el intestino de bovinos, e inicialmente creyeron que se trataba de bacilos tuberculosos aviares o bovinos. Bang (1906) fue el primero en admitir que la infección era diferente de la tuberculosis y denominó a la enfermedad enteritis pseudotuberculosa.

3.1. Etiología.

El agente causal de la paratuberculosis es *Mycobacterium avium* sub. *paratuberculosis* (*Map*), microorganismo del género de *Mycobacterium* de crecimiento filamentosos o pseudomiceliales y lento.

El primer aislamiento e identificación de este agente en medio de cultivo se logró en 1911 por Twort e Ingram que lo clasificaron como, una micobacteria denominada *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis Johne*. Posteriormente se conoció al microorganismo como *Mycobacterium johnei* [Hermon *et al.*, 2000; Chávez, 2005; Kruze *et al.*, 2007; Calderón y Góngora, 2008; Gilardoni y Mundo, 2008].

Fue Bergey *et al.* (1923) quienes propusieron la denominación de *Mycobacterium paratuberculosis*, que ha sido el más aceptado durante largo tiempo. En la actualidad se considera al agente causante de la paratuberculosis como una subespecie dentro del complejo *Mycobacterium avium*, tras la clasificación propuesta por Thorel *et al.* (1990) empleando criterios genéticos y microbiológicos, que reconoce cuatro grupos dentro de las distintas cepas del complejo *Mycobacterium avium*:

- 1.- Formado por cepas de *Mycobacterium paratuberculosis* y por dos cepas obtenidas de pacientes con enfermedad de Crohn, denominadas *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Estas cepas cuando se cultivan son dependientes de micobactina, incluso en los subcultivos.
- 2.- Formado por cepas de *Mycobacterium intracellulare* y *Mycobacterium avium* denominadas *Mycobacterium avium* subsp. *avium*.

3.- Formado por cepas de micobacterias aisladas de palomas torcazes denominadas *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum*. Estas cepas no crecen en medios de cultivo a base de huevo y su crecimiento se estimula a pH 5.5.

4.- Formado por una única cepa vacunal de *Mycobacterium paratuberculosis* 316F, aislada en Weybridge (1940), utilizada para la producción de antígenos y vacunas.

Las técnicas de identificación genética son actualmente las más utilizadas para diferenciar las tres principales subespecies del complejo *Mycobacterium avium*. Están basadas en la detección de secuencias de inserción específicas de cada subespecie: para *Map* son la IS900, la IS1311 y la ISMav2 [Green *et al.*, 1989; Collins *et al.*, 1990; Whittington *et al.*, 2001b; Strommenger *et al.*, 2001], aunque la primera de ellas no parece ser tan específica como se creía [Cousins *et al.*, 1999; Bölske *et al.*, 2002]

Una de las características metabólicas más importantes de *Map* a diferencia de las demás micobacterias, tanto del grupo *avium* como de otros grupos, es su crecimiento extremadamente lento, debido a su elevado tiempo de generación [Juste *et al.*, 2000].

Taylor (1951) ya señaló la existencia de varias cepas de *Map*, al identificar tres tipos diferentes, según requerimientos y características de cultivo: una cepa bovina que afecta a otras especies, una cepa ovina pigmentada que además parece ser la más virulenta [Stamp y Watt, 1954] y una cepa no pigmentada aislada en ovejas procedentes de Islandia.

Estas diferencias en cultivo fueron investigadas por diferentes autores [Juste *et al.*, 1991; Muskens *et al.*, 2000; Whittington *et al.*, 2001c] comprobando que las cepas de pequeños rumiantes eran más fáciles de cultivar que las cepas bovinas y al contrario que éstas, su crecimiento se veía inhibido por el piruvato sódico [Juste *et al.*, 1991].

En base a pruebas genéticas se han establecido principalmente dos grandes grupos de *Map*, uno para las cepas ovinas y una cepa caprina aislada en Nueva Zelanda y otro para las cepas bovinas, caprinas y de otros animales [Collins *et al.*, 1990; Bauerfeind *et al.*, 1996; Whittington *et al.*, 2001c; Dohmann *et al.*, 2003]. Desde el punto de vista de la capacidad infectiva, se ha demostrado que algunas cepas de origen caprino tienen poca patogenicidad para el ganado bovino [Saxegaard, 1990]. Sin embargo, esta distinción desde el punto de vista genético a nivel de campo no parece estar muy clara, ya que diferentes autores han encontrado similitudes genéticas entre cepas aisladas de caprino y ovino con otras aisladas a partir de bovino [Muskens *et al.*, 2000; Pillai *et al.*, 2001; Whittington *et al.*, 2001c].

3.2. Epidemiología.

La paratuberculosis es una enfermedad conocida tradicionalmente por afectar a los rumiantes domésticos, aunque en realidad posee un rango más amplio de hospedadores, ya que se ha confirmado mediante técnicas serológicas, histopatológicas y bacteriológicas en rumiantes salvajes [Chiodini *et al.*, 1984; Blood *et al.*, 1989; Stabel, 1998; Beard *et al.*, 2001a; Kennedy y Benedictus, 2001; Olsen *et al.*, 2002; Stanley *et al.*, 2007; Sánchez *et al.*, 2009] principalmente en ciervos (*Cervus elaphus*) [Temple *et al.*, 1979; Chiodini y Van Kruiningen, 1983; de Lisle *et al.*, 1993; Fawcett *et al.*, 1995; Stehman, 1996; Nebbia *et al.*, 2000; Pávlík *et al.*, 2000; Mackintosh *et al.*, 2002], bisontes (*Bison bison*) [Buergelt y Ginn, 2000; Leid *et al.*, 2002; Mackintosh *et al.*, 2002], muflones (*Ovis musimon*) [Weber *et al.*, 1992; Pávlík *et al.*, 2000], llamas (*Lama glama*) [Blood *et al.*, 1989; Belknap *et al.*, 1994; Miller *et al.*, 2000; Stanley *et al.*, 2007] y, camellos (*Camelus bactrianus*) [Paling *et al.*, 1988; Stehman, 1996; Kramsky *et al.*, 2000] entre otros.

El agente causal de la enfermedad también ha sido aislado en varios animales monogástricos como cerdos (*Sus scrofa*) [Jorgensen, 1969; Larsen *et al.*, 1971; Thoen *et al.*, 1975], conejos (*Oryctolagus cuniculus*) [Angus, 1990; Daniels *et al.*, 2003a, 2003b; Tiwari *et al.*, 2006; Sevilla, 2007; Bannantine *et al.*, 2008; Merck, 2008], caballos (*Equus caballus*) [Larsen *et al.*, 1972], lobos (*Canis lupus*), comadreja (*Mustela nivalis*) [Tiwari *et al.*, 2006; Sevilla, 2007; Bannantine *et al.*, 2008; Merck, 2008], liebres (*Lepus europaeus*), tejones (*Meles meles*), roedores, diferentes tipos de aves [Van Kruiningen *et al.*, 1991; Beard *et al.*, 2001a; Daniels *et al.*, 2003b, 2003c], animales de laboratorio [Hamilton *et al.*, 1991], exceptuando la rata de Lewis [Koets *et al.*, 2000b] y también en el hombre, donde se ha relacionado como posible causa de la enfermedad de Crohn, una enteritis crónica regional propia de la especie humana [Alfaro *et al.*, 2006; Sánchez *et al.*, 2009], lo que adjudicaría a *Map* un potencial riesgo zoonótico.

Se ha señalado que algunos de estos hospedadores silvestres, como los conejos, podrían jugar un papel importante en la transmisión de la infección a los rumiantes domésticos en algunas regiones, ya que pueden liberar en sus heces millones de *Map*/hectárea y los rumiantes domésticos contagiarse cuando pastan o comen alimentos contaminados con *Map* [Greig *et al.*, 1999; Daniels *et al.*, 2001; 2003a, 2003b, 2003c].

Un estudio realizado en Grecia por Florou *et al.* (2008) concluyó que la cepa de *Map* más frecuente en rebaños ovinos y caprinos infectados de paratuberculosis, coincidía con aquella aislada en cuatro especies salvajes monogástricas diferentes que coexistían con estos rebaños (ratas, ratones, zorros y liebres). Asimismo, mediante técnicas moleculares, se han identificado los mismos genotipos de *Map* entre diferentes hospedadores silvestres y domésticos que convivían en el mismo hábitat, apoyando la teoría de transmisión interespecie [Stevenson *et al.*, 2009].

Sin embargo, Whittington *et al.* (2001a) empleando técnicas moleculares demostraron que las cepas que infectaban al ganado bovino y a los bisontes eran diferentes. Por ello se requieren más estudios para estimar el impacto y riesgo epidemiológico real que estas especies, animales silvestres suponen para el ganado ovino, caprino y bovino [Kennedy y Benedictus, 2001; Florou *et al.*, 2008].

3.3. Patogenia.

Los animales jóvenes, menores de un año son los más susceptibles de infectarse con *Map* y el contagio se produce principalmente por la vía digestiva, al mamar de ubres contaminadas con heces de animales excretoras [Julián, 1975; Chiodini, *et al.*, 1984; Blood *et al.*, 1989; Juste y Adúriz, 1990b; García Marín *et al.*, 2000; Bernardelli *et al.*, 2002; Raizman *et al.*, 2004; Jorge *et al.*, 2005; Alfaro *et al.*, 2006; Wells *et al.*, 2006; Bannantine *et al.*, 2008; Griffiths *et al.*, 2008; Merck, 2008].

Existen otras vías, aunque de menor importancia, como el calostro [Streeter *et al.*, 1995; Millar *et al.*, 1996] el agua, alimento y, diversas superficies contaminadas a las que los animales tienen acceso [Taylor, 1951; Cocito *et al.*, 1994; Swenney, 1996; Stabel, 1998; Hansen y Rossitier, 1999; Gerlach, 2002; Mura *et al.*, 2006; Tiwari *et al.*, 2006].

Se ha propuesto la vía transuterina como una forma de contagio, debido a que se ha aislado *Map* en vacas infectadas con y sin signos clínicos, a partir de cotiledones y, mucosa del útero [Doyle, 1954; Pearson y McClelland, 1955; Lawrence, 1956], de fetos [Pearson y McClelland, 1955; Merkal, 1984b; Seitz *et al.*, 1989; Sweeney *et al.*, 1992], pero de forma muy ocasional y sin importancia en la práctica [Reddy *et al.*, 1984; Rebhun, 1995]. También se ha aislado del tracto genital y del semen de toros, aunque la infección por esta vía no se ha demostrado [Larsen *et al.*, 1981; Eppleston y Whittington, 2001; Chávez, 2005].

Igualmente se ha constatado la participación de vectores en presencia de la enfermedad, huevos de tricoestróngilos, diferentes lombrices de tierra (ninfas de cucaracha) y diversas especies de moscas [Whittington *et al.*, 2001a; Fisher *et al.*, 2001; 2003a, b; 2004; Sevilla, 2007] que han estado en contacto con heces contaminadas con la micobacteria.

Estudios experimentales realizados en bovinos, indican que una vez ingerida la micobacteria patógena y después de haber atravesado la barrera intestinal por endocitosis, las primeras lesiones de la paratuberculosis aparecen en la placa de Peyer ileal [Momotami *et al.*, 1988; Lugton, 1999].

El tejido linfoide juega un papel muy importante en la infección por *Map*, lo cual podría explicar el alto porcentaje de susceptibilidad en los animales jóvenes. En este sentido, la placa de Peyer representa alrededor del 90% del tejido linfoide intestinal en los corderos al nacimiento, involucionando a las 12 semanas de vida y regresando casi en su totalidad entre los 15 y 18 meses de vida, lo que limitaría la implantación del microorganismo [Reynolds y Morris, 1983].

La entrada de *Map* en el tejido linfoide intestinal se produce a través de las células M situadas en el epitelio de revestimiento de las cúpulas de la placa de Peyer, las cuales degradan y presentan la micobacteria con otras células del sistema inmune en asociación con los linfocitos T del área parafolicular [Momotami *et al.*, 1988; García Marín *et al.*, 1992a; Snider *et al.*, 1992; Fujimura y Owen, 1996; Lugton, 1999; Sigurdardóttir *et al.*, 2001; Stabel *et al.*, 2007; Zapata *et al.*, 2008].

Las células M transportan las micobacterias de forma transcelular de forma que son captadas por macrófagos intraepiteliales o subepiteliales de la lámina propia adyacente a la placa de Peyer, donde se sitúan en fagosomas [Chiodini *et al.*, 1984; Momotami *et al.*, 1988; Kaufmann, 1995; Fujimura y Owen, 1996; Lugton, 1999; Valentin-Weigand y Goethe, 1999; Tessema *et al.*, 2001; Sigurdardóttir *et al.*, 2001] llegando a sobrevivir allí hasta 15 días [Kuehnel *et al.*, 2001].

Estos macrófagos son considerados células blanco en la infección paratuberculosa [Kaufmann, 1995]. No está suficientemente aclarado como sobrevive *Map* dentro de los macrófagos, pero lo cierto es que puede resistir los diversos mecanismos antimicrobianos de estas células, tales como la fusión fagosoma-lisosoma, mecanismos oxidativos, enzimas lisosómicas y producción de óxido nítrico [Harris y Barletta, 2001] o producir el bloqueo de la acidificación fagosómica inhibiendo así la maduración de los fagosomas a fagolisosomas funcionales lo que favorece su replicación en las vacuolas bacterióforas [Cheville *et al.*, 2001; Hostetter *et al.*, 2002].

Como consecuencia de la respuesta inmunológica que ofrece el hospedador, puede ocurrir que los macrófagos destruyan a la micobacteria y el animal supere la infección, o que la micobacteria sobreviva y el animal desarrolle la enfermedad clínica o bien permanezca como portador asintomático de la infección durante largos periodos, pudiendo excretar *Map* [Rankin, 1961; Gilmour *et al.*, 1978; Fodstad y Gunnarsson, 1979; Thomas, 1983; Blood *et al.*, 1989; Snider *et al.*, 1992; Barker *et al.*, 1993; Clarke, 1997; Storset *et al.*, 2001]. La evolución hacia un estado u otro depende de diversos factores que se reflejan a continuación:

*Patogenicidad de las cepas de *Map*, tanto intraespecífica como interespecífica [Stamp y Watt, 1954; Saxegaard, 1990].

* Tiempo de exposición de la bacteria y la dosis recibida [Clarke y Little, 1996; Sweeney, 1996; Whithlock y Buergelt, 1996; Bannantine y Stabel, 2002].

*La respuesta del hospedador [García Marín *et al.*, 1994; Clarke, 1997] influida por factores como: la especie del rumiante afectada [Stabel *et al.*, 2003] y susceptibilidad genética [Koets *et al.*, 2000a], la edad [Doyle y Spears, 1951; Larsen *et al.*, 1975; Clarke, 1994; Cocito *et al.*, 1994; Whithlock y Buergelt, 1996].

*Estado nutricional y dieta [Doyle y Spears, 1951; Snider *et al.*, 1992; Harris y Barletta, 2001; Stabel *et al.*, 2003].

*Condiciones de estrés, y cambios hormonales como el parto y la lactación [Reddy *et al.*, 1984; Kreeger, 1991; García Marín *et al.*, 1994; Rebhun, 1995]. Estudios realizados “in vitro” muestran que la hormona del crecimiento y la prolactina afectan la capacidad de los monocitos sanguíneos de los bovinos para fagocitar y destruir a *Map* [Feola *et al.*, 1999].

*Estado inmunológico, que determina la capacidad del animal para que la infección progrese. [Gilmour *et al.*, 1978; Clarke *et al.*, 1996].

3.4. Signos clínicos.

Los animales pueden infectarse en las primeras semanas de vida, pero debido al carácter crónico de la paratuberculosis, estos no empiezan a manifestar signos clínicos hasta la edad adulta, tras un largo periodo de incubación. Los síntomas no se observan antes de 2 años, frecuentemente tras el parto, durante la primera o segunda lactación, si bien pueden padecerla también animales mayores. Sin embargo, la paratuberculosis clínica es muy rara en animales menores de 1,5 años [Chiodini *et al.*, 1984; Sherman, 1985; Blood *et al.*, 1989; Barker *et al.*, 1993; García Marín *et al.*, 1994; Stabel, 1998; Pávlík *et al.*, 2000; Pérez *et al.*, 2000; Coromoto *et al.*, 2006], aunque a partir de los 11 meses de edad pueden convertirse en excretores [Kalis *et al.*, 1999].

La paratuberculosis es una enfermedad caquetizante ya que su signo clásico más característico es la pérdida progresiva de peso y de la condición corporal dando como resultado un adelgazamiento crónico en todas las especies, a pesar de recibir los animales una alimentación adecuada y de no tener pérdida del apetito [Aller *et al.*, 1973; García Marín *et al.*, 1994; Pávlík *et al.*, 2000; Pérez *et al.*, 2000; González *et al.*, 2005; Pradenas *et al.*, 2008]. La mala absorción y la pérdida de proteínas asociadas a la inflamación del intestino son la principal causa de la pérdida de peso [Allen *et al.*, 1974] si bien las manifestaciones pueden ser diferentes de acuerdo a la especie afectada. Un signo clínico asociado a la hipoproteinemia es el edema en las partes declives, siendo el más típico el

edema submandibular que tiende a desaparecer cuando se desarrolla la diarrea [Chiodini *et al.*, 1984; Whitlock y Buergelt, 1996].

En el ganado bovino la pérdida de peso frecuentemente se acompaña de diarrea crónica o intermitente, no sanguinolenta, en ocasiones maloliente, que no responde eficazmente a tratamientos con antibióticos o con algún cambio en la alimentación [Chiodini *et al.*, 1984; Sherman, 1985; Blood *et al.*, 1989; Barker *et al.*, 1993; Corpa *et al.*, 1998a; Hansen y Rossitier, 1999; Pérez *et al.*, 2000; Ábalos, 2001]. Este signo clínico puede durar varias semanas o incluso en meses, con periodos de recuperación transitoria [Juste *et al.*, 1983; Pérez *et al.*, 2000].

Además de la diarrea y caquexia en el ganado vacuno lechero de alta producción pueden observarse otros síntomas más inespecíficos: disminución en la producción láctea que va del 5 al 25% y ocasionalmente, alteraciones en la fertilidad, además de una mayor susceptibilidad a padecer problemas de mastitis. [Sherman, 1985; Adúriz *et al.*, 1994; Corpa *et al.*, 1998a; Stabel, 1998; Valentine-Weigand y Goethe, 1999; Pérez *et al.*, 2000; Stabel *et al.*, 2007; Yakes *et al.*, 2008; Raizman *et al.*, 2009; Sánchez *et al.*, 2009]. En ocasiones, estas alteraciones son las únicas que se presentan, el bajo rendimiento productivo, la pérdida de peso o las diarreas intermitentes, que normalmente el ganadero o veterinario confunden con problemas de tipo digestivo no infeccioso suelen ser la causa de la eliminación de los animales de la explotación [Badiola *et al.*, 1979; Sherman, 1985; Rebhun, 1995; Withlock y Buergelt, 1996; Clarke, 1997; Pérez *et al.*, 2000; Calderón y Góngora, 2008; Yakes *et al.*, 2008].

Después de haberse iniciado el proceso clínico, la mortalidad alcanza un 100%, aunque en ocasiones, la disminución de producción láctea, pérdida de peso y diarrea, pueden conducir a un secado prematuro del animal permitiéndole la recuperación parcial hasta la siguiente lactación [Pérez *et al.*, 2000].

3.4.1. Lesiones macroscópicas.

Los primeros hallazgos observados en la necropsia de un animal clínicamente afectado por paratuberculosis son: caquexia, atrofia muscular, pérdida de la grasa mesentérica y de los surcos coronarios que se reemplaza por tejido gelatinoso (atrofia serosa), y presencia de edemas en tejido subcutáneo de zonas declives, destacando el edema submandibular y la efusión de líquidos serosos en diferentes cavidades corporales en forma de ascitis o hidropericardias. [Pérez *et al.*, 2000; Ábalos, 2001; Tejedor, 2002; Berger *et al.*, 2006].

Las lesiones características específicas de esta enfermedad se localizan en el intestino delgado y nódulos linfáticos regionales [Badiola *et al.*, 1979; García Marín *et al.*,

1994; Pérez *et al.*, 2000; Ayele *et al.*, 2001; Bernardelli *et al.*, 2002; Berger *et al.*, 2006; Brown *et al.*, 2007; Jaimes *et al.*, 2008].

Aparecen principalmente en los tramos finales del intestino delgado, pudiéndose observar un marcado engrosamiento de la pared, principalmente en la válvula ileocecal, íleon y las porciones más distales del yeyuno, dando una apariencia de “tubo de goma”. En ocasiones también puede estar afectado el ciego y los primeros tramos del colon. En casos más avanzados las lesiones pueden extenderse de forma difusa desde el duodeno hasta el recto. Al abrir los tramos alterados, la mucosa y submucosa presentan un aspecto tumefacto y edematoso, están muy engrosadas y muestran pliegues que recuerdan a las circunvoluciones del cerebro, que no desaparecen al estirar el intestino, y, en ocasiones, sus ápices aparecen congestivos, con múltiples petequias e incluso pequeñas erosiones, en contraste con el resto de la pared intestinal, que muchas veces presenta una coloración pálida [Hutyra y Marek, 1930; Buergelt *et al.*, 1978; Badiola *et al.*, 1979; Juste *et al.*, 1983; Carrigan y Seaman, 1990; Corpa *et al.*, 1998a; Pérez *et al.*, 2000; Bernardelli *et al.*, 2002; Berger *et al.*, 2006; Brown *et al.*, 2007; Sevilla, 2007; Jaimes *et al.*, 2008].

Acompañando al engrosamiento de la pared intestinal se observa linfangiectasia y linfangitis en la serosa, de forma que los vasos linfáticos a menudo aparecen como cordones blanquecinos o transparentes, visible en la serosa intestinal y mesenterio en animales con caquexia extrema. En algunos casos no son tan evidentes, y solo pueden observarse de manera focal poco aparente, principalmente en ovinos y caprinos, y con menor frecuencia en bovinos [Barker *et al.*, 1993; Pérez *et al.*, 2000; González, 2003; Kurade *et al.*, 2004; Brown *et al.*, 2007].

Por su parte, los nódulos linfáticos mesentéricos, principalmente los yeyunales e ileocecales, aparecen aumentados de tamaño, tumefactos y edematosos. Al corte presentan una coloración muy pálida, llegando a ser prácticamente indistinguible la zona medular de la cortical, otras veces, la medular puede adquirir un color marrónáceo-verduzco [Buergelt *et al.*, 1978; Chiodini *et al.*, 1984; Blood *et al.*, 1989; Carrigan y Seaman, 1990; Barker *et al.*, 1993; Corpa *et al.*, 1998a, 2000; González *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2007].

En bovinos con paratuberculosis clínica muy avanzada se ha descrito la formación de focos de mineralización y fibrosis en las paredes arteriales, principalmente en aorta, arteria mesentérica, así como en endocardio, dando un aspecto macroscópico de placa rugosa blanquecina [Chiodini *et al.*, 1984; Blood *et al.*, 1989; Corpa *et al.*, 1998a; Pérez *et al.*, 2000; González, 2003; Brown *et al.*, 2007].

3.4.2. Lesiones microscópicas.

Microscópicamente la paratuberculosis se caracteriza por una enteritis y linfadenitis de tipo granulomatoso. En la lámina propia, se observa un infiltrado focal o difuso de linfocitos, gran cantidad de macrófagos homogéneos y células epiteloideas que se agrupan formando los granulomas característicos de esta enfermedad [Stamp y Watt, 1954; Rayja y Singh, 1961; Buergelt *et al.*, 1978; Badiola *et al.*, 1979; Barker *et al.*, 1993; García Marín *et al.*, 1994; Pérez *et al.*, 1996; Corpa *et al.*, 2000; Pérez *et al.*, 2000; Chávez, 2005; Brown *et al.*, 2007; Slana *et al.*, 2008].

Histológicamente, los animales con la forma clínica de la enfermedad muestran lesiones graves difusas, principalmente de tipo multibacilar, con abundantes BAAR en válvula ileocecal, íleon y yeyuno, que se pueden extender en ocasiones a diferentes tramos de intestino grueso, principalmente en ciego y colon, siendo más esporádica la presencia de alteraciones de duodeno y recto. Además, pueden encontrarse células gigantes multinucleadas de Langhans, observadas con mayor frecuencia en el ganado bovino, aunque también pueden aparecer otros tipos celulares como linfocitos, células plasmáticas y eosinófilos [Buergelt *et al.*, 1978; Carrigan y Seaman, 1990; Peris, 1992; García Marín *et al.*, 1992c; Pérez *et al.*, 1996; Corpa *et al.*, 2000; Pérez *et al.*, 2000; Ábalos, 2001; Tiwari *et al.*, 2006; Brady *et al.*, 2008; Liying *et al.*, 2008].

En casos más graves el exudado inflamatorio se extiende por las vellosidades intestinales, por lo que se observan dilatadas y deformadas, incluso atróficas, llegando a desplazar y obliterar las criptas de Lieberkhün, por la presencia de abundante material necrótico y células inflamatorias en su interior [Badiola *et al.*, 1979; Pérez *et al.*, 1996; Corpa *et al.*, 1998a, 2000; Pérez *et al.*, 2000; González *et al.*, 2005; Brown *et al.*, 2007].

En cuanto a lesiones extra-intestinales asociadas a paratuberculosis, en casos clínicos avanzados y graves, puede observar la degeneración y fibrosis con depósito de sales de calcio en la capa íntima y media de la arteria aorta y endocardio descritas en bovino [Simpson, 1966; Buergelt *et al.*, 1978; Clarke y Little, 1996; Corpa *et al.*, 1998a; González, 2003; Brown *et al.*, 2007]. También se han descrito granulomas multifocales en el hígado con presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes [Harding, 1957; Buergelt *et al.*, 1978; Chiodini *et al.*, 1984; Carrigan y Seaman, 1990; González, 2003]. Con menos frecuencia se han señalado lesiones granulomatosas focales en los riñones, pulmones y nódulos linfáticos regionales [Hines *et al.*, 1987; Clarke y Little, 1996; Sevilla, 2007].

Teniendo en cuenta la variabilidad de las lesiones paratuberculosas en las distintas especies de rumiantes domésticos, se han propuesto diversas clasificaciones de las mismas, atendiendo a la gravedad y, extensión, tipos celulares implicados y la cantidad de

micobacterias presentes en las lesiones. [Clarke y Little, 1996; Pérez *et al.*, 1996; Coetsier *et al.*, 1998; Brumbaugh *et al.*, 2000; Corpa *et al.*, 2000; González *et al.*, 2005].

En ganado bovino, destacan los trabajos realizados por Buergelt *et al.* (1978) y por González (2003). Los primeros, realizaron un estudio en 51 animales desechados de dos rebaños infectados con paratuberculosis, tomando muestras de duodeno, yeyuno, íleon, válvula ileocecal, ciego, colon, recto y nódulos linfáticos mesentéricos e ileocecales, clasificando las lesiones en leves, moderadas y graves, en base a los tipos celulares y a la presencia de BAAR.

-Lesiones leves o de tipo I: Caracterizadas por la presencia de células gigantes de Langhans en la lámina propia de las vellosidades intestinales o dispersas en la paracortical de los nódulos linfáticos, apareciendo pocas células epitelioides con escasa o nula presencia de BAAR.

-Lesiones moderadas o de tipo II: Caracterizadas por la presencia de pequeños grupos de macrófagos con varias células gigantes de Langhans en la lámina propia y submucosa, en senos subcapsulares o paracortical de los nódulos linfáticos regionales, con cantidad de BAAR variable, nula o moderada.

-Lesiones graves o de tipo III: Presentan un infiltrado inflamatorio compuesto por un gran número de macrófagos y células gigantes de Langhans en todas las capas de varios tramos del intestino delgado, afectando a la mucosa, submucosa, muscular y serosa, alterando la estructura histológica normal de las vellosidades intestinales. Así mismo, se observa una dilatación de las criptas de Lieberkhün. También se afectan gravemente los nódulos mesentéricos, donde el infiltrado de macrófagos y células gigantes en los senos subcapsulares y en la paracortical, llega a reemplazar a los folículos linfoides. Los macrófagos contienen abundantes BAAR.

González *et al.*, (2005), realizan una nueva clasificación a partir de los resultados obtenidos en 116 animales infectados con y sin signos clínicos, siguiendo los criterios propuestos por Pérez *et al.* (1996) en los que también se incluyen animales con infección subclínica.

Estos autores distinguen tres tipos principales de lesiones: focales, multifocales y difusas, similares a los descritos para la especie ovina [Pérez *et al.*, 1996] con las siguientes particularidades:

*Lesiones focales.- En esta especie, es frecuente la aparición de alguna célula gigante asociada a los granulomas o asiladas principalmente en el tejido linfoide ileocecal, tal y

como han descrito otros autores [Payne y Rankin, 1961a, 1961b; Gilmour *et al.*, 1965] en infecciones experimentales en ganado bovino.

*Lesiones multifocales.- Este tipo de lesiones se caracterizan por la presencia de pequeños granulomas o de células gigantes de Langhans, asociadas a los granulomas o aisladas, sin producir alteración morfológica de las vellosidades intestinales, aunque en ocasiones puede existir un ligero engrosamiento de la pared intestinal en algún tramo. Estas lesiones aparecen tanto en la mucosa, como en los espacios interfoliculares de la placa de Peyer y/o de los nódulos linfáticos ileales o yeyunales, siendo mayores, en tamaño y número que las lesiones focales. Los BAAR pueden observarse en cantidades variables.

*Lesiones difusas.- En este caso, la diferencia con la clasificación en ovinos radica en la aparición de un subtipo de *lesiones intermedias*, semejantes a las descritas por Kheirandish *et al.* (2008). Las lesiones halladas frecuentemente en el estudio de González *et al.* (2005), fueron lesiones difusas que compartían características con las formas *multibacilares* y *linfocíticas*, por lo que se considera como un subtipo mixto. En ellas el infiltrado es una mezcla de linfocitos, células plasmáticas, macrófagos formando pequeños granulomas, así como células gigantes en número variable. Este infiltrado altera la estructura histológica normal de la mucosa intestinal y puede diseminarse hacia la submucosa en los casos más graves, donde aparece rodeando vasos a veces con trombos. La serosa presenta una linfangitis y serositis marcada, con distintos niveles de gravedad dependiendo del tramo en que se localice. Los nódulos linfáticos también se encuentran afectados, principalmente el mesentérico caudal. En este tipo de lesiones se detecta un número elevado de BAAR mediante ZN o tinción inmunohistoquímica, aunque siempre en cantidad inferior a las formas multibacilares.

3.5. Prevalencia.

La paratuberculosis es una enfermedad de creciente prevalencia en animales de abasto, de distribución mundial y es, considerada como una de las enfermedades emergentes más importantes [Chávez, 2005; Kruse *et al.*, 2007] que causan graves pérdidas económicas [López *et al.*, 2006]. Aunque el estudio de la prevalencia de la infección por Map se ve limitado por la eficacia de las técnicas diagnósticas y el largo período de la latencia de la infección [Sevilla, 2007], se ha señalado que la prevalencia es mayor en bovinos de producción lechera en régimen intensivo. [Boelaert *et al.*, 2008].

Se han utilizado diferentes métodos para determinar la prevalencia de la paratuberculosis, principalmente usando métodos bacteriológicos y serológicos. El cultivo ha sido el método bacteriológico más utilizado, pero también se emplean, aunque en menor medida, técnicas moleculares como la PCR. En 1969 Jorgensen y posteriormente en 1972, determinó una tasa de infección a partir del cultivo de ganglios linfáticos mesentéricos de

animales sacrificados en Dinamarca, de un 2,3% y de un 9,8% respectivamente. Utilizando esta misma técnica, a partir de muestras de hígado, tonsilas, colon, íleon, válvula ileocecal y ganglio linfático ileocecal, se obtuvo una positividad del 18% en vacuno tomado al azar sacrificado en mataderos de Nueva Inglaterra [Chiodini y Van Kruiningen, 1986]. Por otra parte, en 1987 Merkal y su grupo colaborador, obtuvieron una prevalencia del 1,6% en ganglios linfáticos ileocecales de ganado vacuno sin sintomatología clínica de paratuberculosis sacrificados en diferentes mataderos de Estados Unidos.

Los estudios realizados para determinar la prevalencia de la paratuberculosis en los rebaños, mediante cultivo fecal, indicaron que, en Illinois el 35% [McPherron *et al.*, 1983], en Gran Bretaña el 20% [Rankin, 1962] y en Dinamarca el 4% [Jorgensen, 1972] de las granjas estaban infectadas.

En España, la primera descripción de la paratuberculosis fue en 1915 [Ferrerías, 1915] y posteriormente en 1935 [Roca Soler, 1935], aunque la confirmación de una infección por *Map* en ganado bovino, data de 1983 en un rebaño de raza Charoláis en el País Vasco [Juste *et al.*, 1983]. Un estudio realizado sobre 134 animales sacrificados en mataderos de Asturias, reveló una prevalencia del 28,35% mediante histopatología, inmunohistoquímica y PCR de la válvula ileocecal, ganglio linfático ileocecal y yeyunal caudal [Balseiro *et al.*, 2003]. En lo que se refiere a la prevalencia intrarebaño de la infección, existen muy pocos estudios publicados al respecto. Destaca el realizado por González (2003), sobre 3 rebaños positivos a paratuberculosis. En el mismo, se obtuvieron prevalencias que oscilaban entre un 12% y un 27%.

En México esta enfermedad es poco conocida y sería necesaria su consideración en el ganado importado de países de Europa, EEUU, Canadá, Nueva Zelanda y Australia [Esteves-Denaives *et al.*, 2007].

3.6. Control.

Además de poner en práctica los diferentes programas de control, es recomendable llevar a cabo un manejo correcto y mantener buenas medidas higiénico-sanitarias, para disminuir la propagación de la enfermedad en los animales. La limpieza y desinfección periódica juegan un papel importante en el control de la enfermedad, así como, la eliminación y el aislamiento de los animales con sintomatología clínica [Juste *et al.*, 1990a; Juste y Sáez de Ocariz, 1990; Adúriz *et al.*, 2000; Kalis *et al.*, 2001; Beyersbach *et al.*, 2001; Gerlach, 2002; Muskens *et al.*, 2003; Gruenendaal *et al.*, 2003]. Además, es de suma importancia evitar la entrada y salida de animales incontrolados, por lo que se recomienda realizar pruebas de diagnóstico a los mismos para asegurar que están libres de la enfermedad [Adúriz *et al.*, 2000].

La mayoría de los programas de control tienen como principales objetivos [Kennedy *et al.*, 2001]: 1) reducir las pérdidas económicas, 2) proteger a los rebaños no infectados o de bajo riesgo, 3) mejorar las condiciones de los rebaños infectados, 4) disminuir la excreción de *Map* en el medio ambiente, 5) romper la cadena de transmisión en los animales recién nacidos, y 6) disminuir el riesgo de *Map* en los productos animales.

3.6.1. Vacunación.

Las primeras vacunaciones frente a la paratuberculosis bovina se llevaron a cabo en 1926 en Francia con una cepa atenuada [Vallee y Rinjard, 1926]. Desde entonces se han usado una gran variedad de vacunas con aislados de *Map* vivos atenuados o no atenuados [Hagan, 1936; Gilmour y Brotherston, 1966; Larsen *et al.*, 1974], inactivadas térmicamente [Larsen *et al.*, 1978; Brotherston *et al.*, 1961] o con fragmentos de *Map* [Gilmour y Brotherston, 1966; Larsen *et al.*, 1969; Larsen *et al.*, 1978]. La cepa de *Map* que más se emplea para la preparación de vacunas es la 316 F (Central Veterinary Laboratory, Weybridge, Inglaterra), aunque se han empleado otras como la cepa 18, cepa 5889 de Bergey, un aislado del Instituto de Lelystad (Holanda) y aislados de campo [Harris y Barletta, 2001]. Actualmente existen vacunas comerciales vivas como es el caso de Neoparasec™ (MERIAL, New Zealand Ltd., Nueva Zelanda) e inactivadas como es la vacuna de Gudair® (CZ Veterinaria S.A., Pontevedra, España).

En cuanto a la vía de inoculación, la más utilizada es la administración subcutánea durante el primer mes de vida para proteger al animal antes de que se produzca la infección o impedir la progresión de la misma si el animal ya está infectado [Larsen, 1964]. Sin embargo, Corpa *et al.* (1998a) indicaron que tanto la respuesta inmune humoral como la celular, inducidas con la vacuna de Gudair en los pequeños rumiantes, son más intensas, rápidas y persistentes cuando se realizan a los 4-5 meses de edad [Corpa *et al.*, 1998b]. Una dosis ofrece suficiente inmunidad y no es necesaria una segunda dosis vacunal ya que se ha demostrado que incluso puede provocar una disminución en la protección adquirida [Gilmour, 1976; Bendixen, 1978; Stuart, 1965].

II.4. DIAGNÓSTICO DE LAS MICOBACTERIAS.

Uno de las principales dificultades que existen en el diagnóstico de las enfermedades causadas por micobacterias se debe a la falta de técnicas con una especificidad y sensibilidad del 100%, siendo especialmente complicada la detección de animales con infección subclínica o portadores latentes, con el posible riesgo de obtener resultados falsos-positivos o falsos-negativos [Kregger, 1991; Withlock, 1998; Kalis *et al.*, 1999; Garrido *et al.*, 2000; Olsen *et al.*, 2002; Soto *et al.*, 2002; Collins, 2004].

Un método diagnóstico “ideal” tendría que ser: rápido, barato y la sensibilidad y especificidad suficiente para distinguir a los animales que están excretando micobacterias, para evitar focos de infección para el resto de los animales [Merkal, 1984; Olsen *et al.*, 2002; Arcelles *et al.*, 2005]. En la actualidad todos los métodos existentes para el diagnóstico de la enfermedad por micobacterias, tanto en animales vivos como en cadáveres se clasifican en cuatro grupos: los basados en aspectos clínicos y epidemiológicos, los que reconocen de manifestaciones lesionales, los que detectan al agente etiológico y los basados en la respuesta inmune que desarrollan los animales infectados [Garrido *et al.*, 2000; Ábalos y Retamal, 2004].

4.1. Diagnóstico clínico y epidemiológico.

La presencia de paratuberculosis y tuberculosis en una explotación se puede sospechar normalmente cuando aparecen signos clínicos [García Marín *et al.*, 1994; Hansen y Rossitier, 1999; Pávlik *et al.*, 1999; Pérez *et al.*, 2000; González, 2003]. A lo largo de todo el año, pero más frecuentemente cuando los animales están sometidos a condiciones climatológicas más adversas (invierno), situaciones de estrés (parto), se observa entre un 1-10% de bajas por goteo de animales con signos clínicos [García Marín *et al.*, 1994; Pávlik *et al.*, 1999; Singh y Singh, 2000].

El diagnóstico de la enfermedad subclínica es más complicado; puede observarse una caída en la producción láctea, problemas reproductivos como infertilidad y mastitis [Merkal, *et al.*, 1975; Chiodini, *et al.*, 1984; Goodger *et al.*, 1996; Nordlund *et al.*, 1996; Corpa *et al.*, 1998a; Valentin-Weigand y Goethe, 1999; Pérez *et al.*, 2000; Losinger, 2005; Raizman *et al.*, 2009]. Hay autores que señalan que la enfermedad puede detectarse por la disminución de tamaño de las masas musculares glúteas y femorales, y por la presencia de un edema intermitente en la mandíbula meses antes de la aparición de cualquier otro signo clínico [Hutchinson, 1996]. Se ha sugerido que un análisis de las proteínas y de los minerales séricos puede resultar muy útil en el diagnóstico de la paratuberculosis en animales caquéticos [Scott *et al.*, 1995; Jones y Kay, 1996] Debido al carácter inespecífico de los síntomas el diagnóstico debe confirmarse mediante otras técnicas [Dunkin, 1934; Smyth y Chirstie, 1950; Merkal, 1973; Sherman, 1985; Juste y Adúriz, 1990b; Pérez *et al.*, 2000; Cicutta *et al.*, 2003].

Sin embargo, en el diagnóstico clínico debe diferenciarse de otros procesos crónicos caquetizantes o debilitantes como son, la malnutrición, deficiencias de minerales u oligoelementos, problemas parasitarios, abscesos internos y enfermedades hepáticas o renales o bien de otros procesos que cursan con diarrea en animales adultos como son salmonelosis, desplazamiento recurrente de cuajar, coccidiosis o parasitosis y, BVD entre otros [Stamp y Watt, 1954; Seaman *et al.*, 1981; Sherman, 1985; Kimberling, 1988; Blood

et al., 1989; Green *et al.*, 1989; Carrigan y Seaman, 1990; Ott *et al.*, 1999; Garrido *et al.*, 2000].

La sintomatología clínica de la tuberculosis varía con la distribución de las lesiones en el organismo, suele presentar una evolución dilatada en el tiempo y los síntomas pueden tardar meses o años en aparecer. Los signos clínicos varían en función de la localización de las lesiones. En el caso de hallarse en el pulmón se manifiesta con tos seca intermitente que podría estar inducida por cambios de temperatura o la presión en la tráquea, así como neumonía. En estados avanzados de la enfermedad existe engrosamiento de los ganglios linfáticos que podrían obstruir el paso del aire, el tracto alimentario u oprimir los vasos sanguíneos. Otros síntomas habituales son la debilidad, pérdida de apetito y de peso, fiebre fluctuante, tos seca intermitente, diarrea y ganglios linfáticos grandes y prominentes. [Vestal, 1975; Cuezva-Samaniego, 1966].

4.2. Diagnóstico anatomopatológico.

El estudio macroscópico de tejidos procedentes de animales afectados clínicamente por tuberculosis i paratuberculosis muestra una elevada fiabilidad y especificidad alta en el diagnóstico de la enfermedad, aunque debe tenerse en cuenta que las lesiones no siempre son evidentes, principalmente cuando se trata de formas subclínicas e incluso algunas clínicas [Buergelt *et al.*, 1978; Clarke y Little, 1996; Pérez *et al.*, 1996; Clarke, 1997; Corpa, 1999; Brady *et al.*, 2008]. Este diagnóstico presenta una desventaja importante y es el hecho de que debe llevarse a cabo principalmente en animales muertos, no obstante, tiene un gran valor en la inspección *post-mortem* [Garrido *et al.*, 2000; Escobar *et al.*, 2003; González, 2003].

4.2.1. Técnicas histopatológicas.

Las técnicas histopatológicas, basadas en la identificación de las lesiones microscópicas inducidas por la infección en tejidos incluidos en parafina y teñidos mediante la técnica de hematoxilina-eosina, son reconocidas por su buena sensibilidad y especificidad [García Marín *et al.*, 1992c; Barker *et al.*, 1993; Pérez *et al.*, 1996; Withlock, 1999; Gwozdz *et al.*, 2000b; Huda y Jensen, 2003; Kheirandish *et al.*, 2008]. Además, una de sus ventajas es la capacidad de identificar no solo animales con lesiones graves que presenten la enfermedad clínica sino también a animales con lesiones más restringidas asociadas a la enfermedad subclínica [Corpa *et al.*, 2000; González, 2003; González *et al.*, 2005].

Un factor importante a tener en cuenta al llevar a cabo este tipo de estudios es la correcta elección de las muestras a estudiar, ya que siempre deben incluirse aquellas localizaciones que aseguren la presencia de tanto de lesiones iniciales o latentes, como

graves; en el caso de la tuberculosis incluirían los nódulos linfáticos respiratorios, y en la paratuberculosis la válvula ileocecal, tejido linfoide yeyunal y nódulos linfáticos mesentéricos [García Marín *et al.*, 1992b, 1992c; Condrón *et al.*, 1994; Pérez *et al.*, 1996; Garrido *et al.*, 2000; Valheim *et al.*, 2002; González, 2003].

La identificación de lesiones con la identificación de bacilos ácido-alcohol resistentes en los propios tejidos mediante la técnica de Ziehl-Neelsen. Mediante esta técnica no se puede distinguir entre las distintas especies de micobacterias; además presenta una baja sensibilidad puesto que en la mayor parte de las lesiones focales o incluso algunas graves, no presentan bacilos y éstos, para ser teñidos correctamente, necesitan tener la pared celular intacta [Jubb *et al.*, 1985; Barker *et al.*, 1993; Condrón *et al.*, 1994; Thorensen *et al.*, 1994; Coetsier *et al.*, 1998; Brees *et al.*, 2000; Prieto *et al.*, 2004; Sevilla, 2007].

4.2.2. Técnicas inmunohistoquímicas.

Las técnicas histopatológicas pueden complementarse con métodos inmunohistoquímicos, que se desarrollan sobre los mismos tejidos fijados en formol e incluidos en parafina que en los métodos convencionales, y se basan en el empleo de anticuerpos monoclonales o policlonales específicos frente a la micobacteria que permiten poner de manifiesto la presencia de antígenos del microorganismo en dichos tejidos. [Haines *et al.*, 1987; García Marín *et al.*, 1992b; Gutiérrez Cancela y García Marín, 1993].

Esta técnica en comparación con otras, muestra una mayor capacidad para detectar micobacterias [Pérez *et al.*, 1990; Haines y Clark, 1991; Haines y Chelack, 1991; García Marín *et al.*, 1992a; Gutiérrez Cancela y García Marín, 1993; Menchén Ozaita, 1995; Coetsier *et al.*, 1998; Olsen *et al.*, 2002], poniendo en evidencia una menor cantidad de bacilos de forma más específica, sobre todo en lesiones focales y difusas linfocíticas, independientemente de la integridad de su pared, pudiendo marcar microorganismos carentes de la misma o alterados [Pérez *et al.*, 1990; García Marín *et al.*, 1992a; Coetsier *et al.*, 1998; Brees *et al.*, 2000; Balseiro *et al.*, 2003; Delgado *et al.*, 2009]. Se trata de una técnica más específica que la tinción ZN [Brees *et al.*, 2000], sin embargo, el coste económico y el tiempo de realización algunas de sus mayores desventajas.

Uno de los mayores problemas que presenta esta técnica es la heterogeneidad de los anticuerpos primarios empleados, muchos de los cuales no están disponibles comercialmente. Además existe el riesgo de resultados falsos positivos, ya que se podrían producir reacciones cruzadas con otras micobacterias, por lo que, este método no es considerado completamente específico [Gutiérrez Cancela y García Marín, 1993; Thoresen *et al.*, 1994; Menchén Ozaita, 1995; Stabel, 1996; Coetsier *et al.*, 1998; Brees *et al.*, 2000].

4.3. Diagnóstico.

4.3.1. Aislamiento e identificación en cultivo bacteriológico.

El cultivo es el método más utilizado para el diagnóstico de las micobacteriosis, principalmente en bovinos y es, considerado como la prueba de referencia (“gold standard”) ya que muestra una especificidad de hasta un 100%, y proporciona un diagnóstico definitivo de la enfermedad [Kalis *et al.*, 2001; Huda y Jensen, 2003; Muskens *et al.*, 2003; Collins, 2004; Brown *et al.*, 2007; Pradenas *et al.*, 2008].

Una de las ventajas principales de este método es que puede llevarse a cabo en animales vivos a partir de heces, secreción respiratoria o raspado de la mucosa. También existe la posibilidad de obtener la muestra a partir de una biopsia, aunque esta alternativa únicamente se vería justificada económicamente en animales de especial valor. En el caso del cultivo fecal en paratuberculosis, esta técnica mostraría una sensibilidad del 100%, pero en la fase subclínica esta puede descender hasta un 87,7%, debido principalmente a que los animales en estadios iniciales no eliminan micobacterias en heces o bien éstas son muy escasas. Además esta técnica es incapaz de detectar formas de pared defectiva en animales con lesiones focales [Condrón *et al.*, 1994; Iob *et al.*, 1996; Zimmer *et al.*, 1999; Garrido *et al.*, 2000; Withlock *et al.*, 2000; Whittington *et al.*, 2000].

Una desventaja muy importante del cultivo de *Map* es el elevado tiempo de realización, ya que el crecimiento de esta micobacteria es muy lento, requiriendo para ello, de 3 a 6 semanas para la aparición de las típicas colonias pequeñas, blancas y convexas y de 3 a 4 meses para un primer aislamiento [Sweeney *et al.*, 1995; Collins, 1996; Kalis *et al.*, 1999, 2002; Soto *et al.*, 2000]. Además tiene un elevado coste, por ello no siempre permite el uso masivo como herramienta diagnóstica [Collins *et al.*, 1990; Kalis *et al.*, 2002; Wells *et al.*, 2002; Pradenas *et al.*, 2008].

Las micobacterias poseen características biológicas especiales por lo que es necesario utilizar técnicas de laboratorio especiales para su aislamiento. En primer lugar y debido a que las muestras obtenidas de animales infectados, especialmente las heces, son un material altamente contaminado, deben someterse a una descontaminación con el fin de destruir los microorganismos contaminantes o bien, otras bacterias competidoras por los nutrientes [de Lisle *et al.*, 1984; Ridge, 1993; Garrido *et al.*, 2000; Olsen *et al.*, 2002; Reddacliff *et al.*, 2003].

Para ello se emplean diferentes agentes bactericidas como el verde malaquita, el hidróxido de sodio, la neomicina, la anfotericina B y el ácido oxálico, si bien varios autores consideran que algunos de estos compuestos reducen sensiblemente la viabilidad de las micobacterias. Otros agentes más eficaces son el cloruro de benzalconio y especialmente el

cloruro de hexadecilpiridinio que ofrecen mejores resultados en cuanto a la viabilidad de las micobacterias y es el más empleado actualmente para el aislamiento de *Map* [Lagadic *et al.*, 1983; Juste *et al.*, 1991; Sotohy y Awad-Maselmeh, 1999].

Después de la descontaminación, se realiza una concentración de los microorganismos por gravedad o por centrifugación, la cual parece favorecer la velocidad de crecimiento y triplica la sensibilidad del cultivo, aunque hay que tener en cuenta que incrementa el número de contaminaciones [Eamens *et al.*, 2000; Reddacliff *et al.*, 2003].

Para el aislamiento primario de *Map* es recomendable el uso de medios de cultivo sólido, habitualmente son usados aquellos a base de huevo como el de Herrold, y el de Lowenstein-Jensen (L-J) [Marco y Adúriz, 1990; Corner, 1994; Withlock, 1998; Pávlik *et al.*, 1999; Whittington *et al.*, 2000], a los cuales es necesario añadir micobactina, que es un agente quelante del hierro [Wayne y Kubica, 1986; Adúriz *et al.*, 1995] necesario para el crecimiento de esta micobacteria. Nielsen *et al.* (2004), consideran que el medio Herrold ofrece un mejor crecimiento y es más rápido que el medio de LJ, mostrando así una mayor eficacia en muestras de ganado bovino, mientras que en pequeños rumiantes sería el LJ el de elección [Juste *et al.*, 1991].

Una alternativa diagnóstica de menor costo para detectar el agente en las heces es el cultivo de una mezcla de deposiciones de varios animales (*pool* fecal), que ofrece una buena sensibilidad y especificidad [Sweeney *et al.*, 1995; Collins, 1996; Kalis *et al.*, 2000; Whittington *et al.*, 2000; Wells *et al.*, 2002, 2003; Van Schaik *et al.*, 2003].

El cultivo de *pool* fecales permite examinar un gran número de animales en una explotación a un menor costo, ya que solo los *pools* positivos necesitan ser re-examinados individualmente para identificar los animales infectados [Pradenas *et al.*, 2008].

Asimismo, la adición de piruvato sódico como estimulante del crecimiento de *M. bovis* fue introducida por Stonebrink. Uno de los medios más utilizados en las últimas décadas ha sido el de Löwestein-Jensen, que resume el medio creado por el primero y la idea del segundo de que el medio tuviese baja proporción de glicerina para que fuese válido para todo tipo de micobacterias [Jensen, 1953], por ello, este medio también se utiliza en el aislamiento de otras bacterias como *Map*. [Ilukevich Anerik, 1974; Juste *et al.*, 1991].

4.3.2. Detección del genoma micobacteriano (PCR).

La genotipificación de aislamientos de las micobacterias ha sido ampliamente utilizada en investigaciones ante brotes epidémicos, como herramienta en estudios de transmisión dinámica y otros aspectos de la epidemiología de la tuberculosis y paratuberculosis. [Cataldi *et al.*, 2002]. El diagnóstico de las enfermedades micobacterianas

se ha visto favorecido en los últimos años por el desarrollo de técnicas de biología molecular que permiten la detección de las secuencias de inserción específicas para cada micobacteria, que en concreto son: IS6110 específica de *M. tuberculosis*, IS1081 específica de *M. bovis*, IS900 específica de *Map* y IS901 específica de *Maa*. [Green *et al.*, 1989; Collins *et al.*, 1993a; Morales *et al.*, 2005; Acosta-Salinas *et al.*, 2009; Solmaz *et al.*, 2009].

Entre los principales métodos genéticos utilizados se encuentra la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (Polymerase chain reaction) [Bull *et al.*, 2000; Coetsier *et al.*, 2001; Englund, 2003]. Este método permite la identificación del agente etiológico, de una manera rápida y específica, tanto en muestras procedentes de heces [Scott *et al.*, 2007], leche [Buergelt y Williams, 2004; Acosta-Salinas *et al.*, 2009; Kaur *et al.*, 2010], sangre o tejidos [Juste *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2010]. Además, permite amplificar de manera selectiva fragmentos de ADN específicos a partir de cantidades mínimas de ADN diana, incluso en presencia de ADN inespecífico [Hughes *et al.*, 1993; Vaneechoutte *et al.*, 1993; Pérez *et al.*, 1994a; Plante *et al.*, 1996; Garrido *et al.*, 1998; Coetsier *et al.*, 2000].

La reacción PCR es un proceso que consta de tres periodos en los que varía la temperatura. Se inicia con la *desnaturalización* de la muestra de ADN, que se consigue mediante la elevación de la temperatura a más de 90°C durante un minuto, resultando una separación de las hebras de ADN. A continuación, comienza la fase de *hibridación*, donde los cebadores o iniciadores (oligonucleótidos sintetizados a partir de una secuencia conocida) se unen de una manera específica a su secuencia de ADN complementaria, durante 1 ó 2 minutos a temperatura de 55- 65°C, variando la temperatura final en función del contenido de G+C de los cebadores. En la fase de *elongación*, aumenta la temperatura generalmente a 72°C durante 2 ó 3 minutos, favoreciendo que la ADN polimerasa forme la nueva hebra de ADN a partir de los cebadores. Todo este proceso se repite un número de ciclos de entre 25 y 40, de forma que sea obtenida la cantidad obtenida de ADN sea suficiente para su visualización. Para ello, existen diferentes técnicas, aunque la más común es la que emplea luz ultravioleta tras el corrido electroforético en gel de agarosa teñido con azul de bromofenol [Persing, 1993; Morán *et al.*, 2000].

La principal ventaja de esta técnica es su rapidez (24- 48 horas) en la obtención de resultados [Coetsier *et al.*, 2000; Garrido *et al.*, 2000; Collins *et al.*, 2002; Estrada-Chávez *et al.*, 2004; Retamal y Ábalos, 2004]. Sin embargo, las características de las micobacterias hacen que la extracción de ADN a partir de las muestras analizar sea un factor importante para asegurar la sensibilidad de la técnica, por lo que se han propuesto diferentes métodos de extracción y purificación, como son la centrifugación y el tratamiento con calor [Vary *et al.*, 1990; Ozbek *et al.*, 2003; Garbaccio, 2006; Ramírez *et al.*, 2006], la extracción mediante xilol, el machacado de las muestras con perlas de zirconio [Challans *et al.*, 1994] la utilización de hidróxido de sodio o la separación inmunogenética [Djonne *et al.*, 2003; Khare *et al.*, 2004].

En un estudio realizado por Garrido *et al.* (1998) se compararon diferentes métodos de extracción de *Map* y su ADN encontrando que compuestos como el SDS y el HPC son más eficaces que el xilol, y que la ruptura de la micobacteria mediante congelación y calor seco alternativamente, y la utilización de Tris-TE tritón X100 consigue un mayor número de resultados positivos.

En el caso de la paratuberculosis, su especificidad y sensibilidad se considera mayor que la del cultivo tanto en animales con lesiones difusas multibacilares y en casos avanzados de la enfermedad [Mason *et al.*, 2001; Estrada-Chávez *et al.*, 2004] como, en animales que eliminan pocas cantidades de micobacterias o que se encuentran en la fase subclínica de la enfermedad [Garrido *et al.*, 2000]. Sin embargo, para otros autores su sensibilidad sería en general inferior a las del cultivo [Pérez *et al.*, 1994a; Withlock, 1999; Mason *et al.*, 2001].

La PCR presenta otra variante de gran valor diagnóstico, que se realiza a partir de muestras de tejido fijadas en formol e incluidas en parafina. Se trata de un método rápido, útil y que presenta una sensibilidad del 71% en relación al cultivo, del 88% con la tinción de Ziehl-Neelsen y del 90% en relación a la inmunohistoquímica [Plante *et al.*, 1996; Miller *et al.*, 1999; Whittington *et al.*, 1999b; Morales *et al.*, 2005], con una especificidad del 100%. Sin embargo, como el formol fragmenta las cadenas de ADN micobacteriano en exposiciones prolongadas (más de una semana), con la consiguiente disminución de la sensibilidad hasta un 70%, precisa una fijación máxima de 24 horas en este tipo de muestras [Miller *et al.*, 1999]. Teniendo en cuenta lo señalado la especificidad de la PCR en muestras incluidas en parafina es extremadamente alta, sin falsos negativos y permite diferenciar entre especies y subespecies de micobacterias [Coetsier *et al.*, 2000; Sanna *et al.*, 2000].

4.4. Métodos diagnósticos basados en la respuesta inmune del animal.

Las infecciones por micobacterias inducen una respuesta inmune de tipo adaptativo (celular y humoral) en los animales, que puede detectarse mediante, diferentes técnicas diagnósticas. Además, se ha encontrado una relación entre el tipo de lesión que muestra el animal y la respuesta inmune periférica, de forma que los animales con lesiones iniciales o latentes subclínicas presentan una respuesta inmune de tipo celular elevada, pero al progresar la infección hacia fases más avanzadas y graves, predomina la respuesta de tipo humoral [Gwozdz *et al.*, 2000a; García-Marín *et al.*, 2000; Stabel, 2006].

Por ello, para detectar la cantidad mayor de animales infectados que se encuentran en las distintas fases de la infección, se recomienda emplear simultáneamente distintas técnicas de diagnóstico inmunológico [Pérez *et al.*, 1994b, 1997; Corpa, 1999; García Marín *et al.*, 1999; Stabel y Withlock, 2001; Chávez *et al.*, 2004]. Es importante tener en

cuenta que en las fases finales de la enfermedad, se pueden observar estados de anergia y estos animales no pueden ser detectados por ninguna prueba inmunológica [Garrido *et al.*, 2000]. Asimismo, la vacunación puede interferir en el diagnóstico mediante este tipo de pruebas [Gwozdz *et al.*, 2000a; Kohler *et al.*, 2001].

4.4.1. Métodos diagnósticos basados en la respuesta inmune celular.

Los animales infectados en fases iniciales o con formas latentes de tuberculosis o paratuberculosis, desarrollan una respuesta inmune de tipo celular que, es detectable mediante diferentes pruebas diagnósticas que se dividen en dos grandes grupos: las pruebas “*in vivo*” como la intradermorreacción o la prueba de la tuberculina [Monaghan *et al.*, 1994; García Marín *et al.*, 1999; Pérez *et al.*, 1999; Kalis *et al.*, 2003] y las pruebas “*in vitro*” o laboratoriales, donde destaca la más empleada, la prueba de liberación del Interferón-gamma (IFN- γ), aunque existen otras como la detección del receptor de interleuquina 2 (IL-2R), la inhibición de la migración linfocitaria y la transformación linfocitaria [Outteridge y Lepper, 1973; Wood *et al.*, 1990; García Marín *et al.*, 1999; Whist *et al.*, 2000; Kalis *et al.*, 2003].

4.4.1.1. Prueba de la tuberculina.

El término tuberculina se aplica a un extracto obtenido de filtrados de cultivos micobacterianos, previamente esterilizados. Las micobacterias son cultivadas en medio líquido, muertas por calor y separadas por filtración. El líquido filtrado se concentra por calor hasta un décimo de su volumen original. En los primeros tiempos se empleaba como medio de cultivo el caldo de carne glicerinado, que posteriormente fue reemplazado por medio sintético (HCSM). Con ello se evitaba agregar al producto final proteínas heterólogas provenientes del medio de cultivo [Mederos *et al.*, 1997]. La preparación de derivados proteicos purificados (PPD) es similar a la de la tuberculina, si bien en vez de concentrar las proteínas por acción del calor, se les separa por precipitación con agentes químicos, tales como: el sulfato de amonio o el ácido tricloroacético [Mederos *et al.*, 1997]. De esta manera, se logra elaborar un producto estandarizado y conservar mejor la estructura proteica original [Burrells *et al.*, 1995; Shirakawa *et al.*, 1997].

En el diagnóstico de la paratuberculosis, los antígenos más utilizados son los derivados proteicos purificados, obtenidos a partir de *Map*, denominados PPD johnina o paratuberculina, o bien a partir de *Maa* (PPD aviar). Esta última, disponible comercialmente, es la más utilizada ya que posee una elevada similitud antigénica con la PPD johnina, con sensibilidades y especificidades muy parecidas [Pávlík *et al.*, 1999; Garrido *et al.*, 2000; Stabel y Withlock, 2001].

La prueba de la tuberculina, descubierta en 1890 por Robert Koch, se utiliza en el diagnóstico de la tuberculosis en el ganado bovino [Buddle *et al.*, 1995; Rivera *et al.*, 2009]. Se basa en la inoculación de las proteínas de origen bacilar en el animal y en la posterior detección de la hipersensibilidad de tipo retardado que ha causado la infección micobacteriana. [Feldman y Fitch, 1936]. En un principio se aplicó de forma subcutánea, pero era costosa en tiempo y esfuerzo, ya que requería tomar al menos 5 veces la temperatura, por lo que fue sustituida por la vía intradérmica de tuberculinización descrita por Moussu y Mantoux en 1908 en la especie humana [Monaghan *et al.*, 1994]. En España y en la mayoría de los países esta prueba se lleva a cabo en la piel de la espalda del animal [Cuezva Samaniego, 1966; O'Reilly, 1993b] aunque en EEUU, Australia y Nueva Zelanda se tuberculiniza en el pliegue de la cola, si bien se ha encontrado que la aplicación de la tuberculina en las tablas del cuello ofrece mayor sensibilidad, mientras que en el pliegue caudal se obtiene una mayor especificidad [Larsen *et al.*, 1957; Kantor *et al.*, 1984; Guanziroli *et al.*, 2005].

La prueba de la tuberculina se ha utilizado desde hace más de 100 años como método de diagnóstico en las campañas de control y erradicación de la tuberculosis, siendo estandarizada por la OMS en 1951. Esta técnica, de bajo coste, constituye una herramienta básica para detectar la presencia de la infección tuberculosa ya que ha permitido reducir marcadamente su prevalencia en los países donde se ha aplicado [O'Reilly, 1969; 1993b; Kantor, 1984; Arcelles *et al.*, 2005; Underwood y Carfagnini, 2005; Marco *et al.*, 2011]. El test intradérmico simple cervical en bovinos se declaró oficial en Finlandia en 1910, extendiéndose en otros países.

El procedimiento de realización de la intradermorreacción o prueba de la tuberculina consiste en la inyección intradérmica en la piel del cuello de 0,1 ml a una dosis igual o superior de 2.000 UI de tuberculina bovina o PPD (obtenida a partir de *M. bovis*) para el diagnóstico de los animales sensibilizados frente a tuberculosis [Feldman y Fitch, 1936; Cuezva Samaniego, 1966] y 0,1 a 0,2 ml de johnina (a partir de *Map*) o PPD aviar (a partir de *Maa*) frente a paratuberculosis [Gilmour y Brotherson, 1966; Chiodinni *et al.*, 1984]. La hipersensibilidad se manifiesta por una inflamación en el sitio de la inyección, que se traduce en un endurecimiento al tacto de volumen de la piel. Esta reacción se valora midiendo el pliegue dérmico en el momento de la inoculación y a las 72 horas de haber efectuado la misma [Huchzermeyer *et al.*, 1994; Whipple *et al.*, 1995; García Marín, 1996; Withlock *et al.*, 1999; Contreras, 2000].

A las 72 horas de la tuberculinización, los individuos sensibilizados a tuberculosis o paratuberculosis, muestran un engrosamiento de la piel, debido al reconocimiento local por parte de los linfocitos T de proteínas del bacilo tuberculoso por un mecanismo de hipersensibilidad celular de tipo retardado [Feldman y Fitch, 1936; Kubabara, 1975 a; b].

La interpretación de la prueba se realiza de acuerdo a lo establecido por la Organización Mundial de la Salud. En el test simple (diagnóstico de tuberculosis bovina) se considera no reaccionante, aquel bovino con engrosamiento del pliegue de piel inferior a 2 mm y sin ningún tipo de signo clínico; dudoso, con un engrosamiento entre 2 y 4 mm sin presentar signos clínicos; positivo, con un engrosamiento superior a 4 mm con o sin signos clínicos o superior a 2 mm y con signos clínicos [NOM-031-ZOO, 1995; Morales *et al.*, 2008].

En el test comparado (diagnóstico de tuberculosis y paratuberculosis) se considera positivo, aquel bovino que presenta un incremento del grosor de la piel superior a 4mm a la reacción de la tuberculina bovina en comparación a la reacción de la tuberculina aviar, o bien, que presente signos clínicos asociados al lugar de inoculación de la tuberculina bovina; dudoso, cuando el grosor de la piel en el lugar de tuberculina bovina es entre 1 y 4 mm superior al del lugar de la tuberculina aviar y no presenta signos asociados, y negativo; cuando la reacción a la tuberculina bovina es menor o igual grosor que la reacción aviar y sin signos clínicos [Monaghan *et al.*, 1994].

El principal inconveniente para la estimación de la sensibilidad y de la especificidad de esta prueba, es la dificultad de la lectura del test por parte del técnico, ya que la asignación de positividad o negatividad en un animal puede haber sido no realizada de la manera adecuada. A esto se suma el no sacrificio de los animales negativos a la prueba para determinar su verdadero estado de infección, siendo imposible calcular los “falsos negativos”. Los valores de sensibilidad en el diagnóstico de tuberculosis bovina se han estimado entre un 77 y 95% [Monaghan *et al.*, 1994] y entre un 90 y 95% [Morrison *et al.*, 2000; Escobar *et al.*, 2004]. Para la prueba simple caudal con PPD bovina, se ha observado una sensibilidad del 81,9% y una especificidad del 96,3% [Rivera *et al.*, 2009] y para la prueba comparada con PPD-bovino y aviar la sensibilidad varía del 72 al 78% y la especificidad del 92 al 99% [Cicuta *et al.*, 2003].

4.4.2. Métodos diagnósticos basados en la respuesta inmune humoral.

Estas pruebas se basan principalmente en la detección de anticuerpos específicos frente a diferentes tipos de micobacterias. Se trata de técnicas rápidas, que permiten analizar un elevado número de muestras simultáneamente. Una vez que se dispone de los antígenos adecuados, la obtención de las muestras es sencilla y su procesado barato, pues no requiere equipos complejos de laboratorio [Ridge *et al.*, 1991; Kalis *et al.*, 2002]. En la paratuberculosis, estas pruebas presentan una sensibilidad baja ya que sólo detectan animales infectados en los que la respuesta humoral se hace evidente [Juste y Adúriz, 1990a; Pérez *et al.*, 1997; Kalis *et al.*, 2002], por lo que serían útiles para confirmar el diagnóstico clínico de la enfermedad o identificar animales excretores de gran cantidad de micobacterias. Sin embargo, presentan una gran desventaja, ya que no son capaces de

identificar animales en fases subclínicas [López *et al.*, 1997]. Por ello, si se pretende detectar un mayor número de animales infectados en una explotación, estas pruebas deberían complementarse con las que valoran la respuesta inmune celular [Pérez *et al.*, 1994b, 1997, 1999; García Marín *et al.*, 1999; Stabel y Whitlock, 2001].

Actualmente, la prueba de inmunidad humoral más empleada es el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), si bien también se utilizaron el y el test de fijación del complemento (FC), la prueba de inmunodifusión en gel de Agar (IDGA) y la prueba del gamma interferón (γ IFN).

4.4.2.1. Prueba de inmunodifusión en gel de agar (IDGA).

Esta prueba consiste en la apreciación a simple vista de la precipitación del complejo antígeno-anticuerpo cuando existen anticuerpos suficientes a través de una placa de gel de agar, enfrentando un antígeno específico con un suero problema, ambos situados en pocillos contiguos [Juste y Adúriz, 1990b; Pérez *et al.*, 1997; Sevilla, 2007]. Se ha empleado en el diagnóstico de la paratuberculosis, demostrando ser un método diagnóstico barato, rápido y fácil de realizar aunque de baja sensibilidad, que varían del 18,9 al 57% en el ganado bovino [Sherman *et al.*, 1984; Ferreira *et al.*, 2002]. Su eficacia depende de la fase de infección en la que se encuentre el animal [Pérez *et al.*, 1997; Sergeant *et al.*, 2003]. En bovinos con síntomas clínicos, confirmados mediante el estudio anatomopatológico y bacteriológico se han comunicado sensibilidades del 96,9% [Sherman *et al.*, 1984] y del 54,5% [Colgrove *et al.*, 1989]. Sockett *et al.* (1992) detectaron un 40,5% de animales excretadores, tanto en la fase clínica como subclínica. En animales con infección subclínica los valores de sensibilidad apenas alcanzaron el 18,9% [Sherman *et al.*, 1990].

En cuanto a la relación entre las lesiones y los resultados a esta prueba diagnóstica, la positividad se encuentra estrechamente relacionada a los últimos estadios de la infección y, a la presencia de lesiones severas difusas multibacilares, pudiendo alcanzar una sensibilidad de entre el 94 y 100% en animales con lesiones de ese tipo en casos naturales de la enfermedad [Clarke *et al.*, 1996; Pérez *et al.*, 1997; García Marín *et al.*, 1992c, 1994, 1999]. Sin embargo, en animales con lesiones difusas paucibacilares sólo detecta entre el 20 y 30% [Clarke *et al.*, 1996; Pérez *et al.*, 1997] y el 5,5% de animales con lesiones leves o focales [García Marín *et al.*, 1992c; Pérez *et al.*, 1997; González, 2003].

La especificidad de esta técnica puede considerarse como elevada, con resultados de hasta el 100% en casos naturales de la infección por paratuberculosis [García Marín *et al.*, 1992c; Pérez *et al.*, 1997; Ferreira *et al.*, 2002; González, 2003; Sergeant *et al.*, 2003].

4.4.2.2. Ensayo inmunoenzimático (ELISA).

El ensayo inmunoenzimático (ELISA) es una técnica ampliamente utilizada en el diagnóstico de paratuberculosis desde su empleo por primera vez por Jorgensen y Jensen en 1978 en la especie bovina. Igualmente, y Thoen *et al.* (1983) describen un procedimiento para el diagnóstico de la tuberculosis bovina. Su éxito se debe a que es una técnica económica, rápida y fácil de realizar. Además permite procesar una gran cantidad de muestras. El test ELISA consiste en hacer reaccionar los anticuerpos presentes en el suero de los animales infectados con un antígeno fijado a las paredes de un pocillo de plástico. Después del lavado de todos los anticuerpos que no se fijaron al antígeno, se revela la presencia de los complejos específicos mediante un reactivo (anticuerpo con afinidad específica por las inmunoglobulinas) que lleva incorporada una enzima (conjugado). Tras lavados para eliminar el exceso de conjugado, se añade el sustrato de enzima. Si la reacción es positiva se podrá detectar una reacción colorimétrica que será proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos presentes en la muestra [Collins *et al.*, 1993a; Díaz *et al.*, 1999; Garrido *et al.*, 2000].

Son muchos los antígenos que se emplean por los diferentes laboratorios para la realización de la técnica, aunque los más utilizados en paratuberculosis son el antígeno protoplasmático purificado crudo o PPA-3 [Lyle y Merkal, 1983; Yokomiso *et al.*, 1983; Richards, 1990; Hardin y Thorne, 1996; Pérez *et al.*, 1997; Garrido, 2001; González, 2003; Balseiro, 2004]. También se emplean otros como el LAM [Sugden *et al.*, 1989; Dolz *et al.*, 1999; Reichel *et al.*, 1999], los antígenos A y D [Sugden *et al.*, 1989], el polipéptido recombinante a362 [Vannuffel *et al.*, 1994], entre otros. En el caso de la tuberculosis, los antígenos más ampliamente utilizados han sido el PPD bovina [Thoen *et al.*, 1983; Hanna *et al.*, 1989], la proteína de secreción MPB70, la cual se ha mostrado como altamente específica [Fifis *et al.*, 1992; Acosta *et al.*, 2000]. Últimamente, se emplean antígenos recombinantes, que están siendo más específicos que los tradicionales [Lyashchenko *et al.*, 1998; Amadori *et al.*, 2002].

En el caso de la paratuberculosis, esta prueba diagnóstica puede dar como resultado falsos positivos, ya que las enfermedades por micobacterias presentan numerosas similitudes antigénicas con otras micobacterias ambientales. Una alternativa para reducir este riesgo consistió en la introducción de una fase previa de preabsorción del suero problema con *Mycobacterium phlei*, lo que permite la eliminación de gran parte de las reacciones cruzadas con otras micobacterias o microorganismos, incrementando la especificidad del ELISA [Yokomiso *et al.*, 1983, 1991; Bech-Nielsen *et al.*, 1992, 1993].

El diagnóstico positivo mediante ELISA indirecto de las infecciones producidas por micobacterias, está estrechamente vinculado a la fase en la que se encuentra el animal. En el caso de la paratuberculosis, presenta una baja sensibilidad en la detección de los

animales en la etapa inicial de la infección que eliminan pequeñas cantidades de micobacterias ya que carecen de anticuerpos o bien estos se encuentran en una cantidad muy baja, insuficiente para desencadenar una reacción positiva a la prueba de ELISA [Garrido, 2001; Soto *et al.*, 2002; Pak *et al.*, 2003].

En este sentido, Sweeney *et al.* (1995) y Withlock *et al.* (2000) coinciden en afirmar, que los animales en etapas iniciales de la enfermedad, aun excretando bacterias en heces, no pueden ser detectados por el test ELISA. En estos casos deberían de transcurrir, varios meses o años para que los niveles de anticuerpos circulantes fueran suficientes para desencadenar una reacción positiva.

La sensibilidad de la prueba de ELISA se ha cifrado en un 45% de promedio, con valores extremos de un 15% y 87% en animales en fase subclínica y clínica respectivamente, con una especificidad entre el 84,7% y 100% [Sweeney *et al.*, 1995; Pérez *et al.*, 1997; Stabel, 1998; Gasteiner *et al.*, 2000; Garrido, 2001; Olsen *et al.*, 2001; Soto *et al.*, 2002].

Los valores de sensibilidad y especificidad de esta prueba se encuentran estrechamente relacionados con los diferentes tipos lesionales, siendo detectados entre un 86,4% y el 100% de con lesiones de tipo difuso multibacilar o de un 10-50% en aquellos con formas difusas de tipo paubacilar. Como se ha señalado, esta técnica es limitado para la detección de animales en la fase subclínica, alcanzando una sensibilidad del 15,8% en el caso de lesiones focales y del 14,3% en lesiones multifocales, en el ganado bovino [González, 2003].

4.4.2.3. La prueba de gamma interferón.

Esta técnica de diagnóstico laboratorial está basada en la liberación de la citoquina gamma-interferón por parte de los linfocitos T sensibilizados estimulados por antígenos micobacterianos y su cuantificación utilizando un anticuerpo monoclonal frente la misma [Wood *et al.*, 1989; Wood *et al.*, 1991; Billman-Jacobe *et al.*, 1992; Pérez *et al.*, 1994b; Burrells *et al.*, 1998]. Aunque en un principio fue desarrollada para el diagnóstico de la tuberculosis bovina, empleando antígenos procedentes de *M. avium* como la PPD aviar o la Johnina, se demostró su utilidad para la detección de la infección paratuberculosa [Wood *et al.*, 1989; Wood *et al.*, 1991; Burrells *et al.*, 1995; McDonalds *et al.*, 1999], no solo en esta especie, sino también en oveja, cabra y búfalo [Rothel *et al.*, 1990; Pérez *et al.*, 1994b; Corpa, 1999].

Se basa en el cultivo de sangre heparinizada con antígeno de *M. bovis* durante 16-24 horas con la medida de producción de una linfoquina, el gamma interferón, por parte de los linfocitos T CD4+ tipo 1 [Wood *et al.*, 1991]. La cuantificación del gamma interferón se

realiza mediante un ELISA de captura en el que las placas llevan fijado un anticuerpo monoclonal antigamma interferón bovino. Como la prueba utiliza el mismo antígeno que el empleado en la prueba de la tuberculina (PPD) aviar para distinguir las reacciones no específicas de las específicas. Esta prueba fue desarrollada como alternativa al test de transformación linfocitaria que cuantifica la proliferación de linfocitos T y, que para el diagnóstico rutinario presenta los inconvenientes de ser un proceso largo, complejo y que precisa instalaciones adecuadas para el manejo de isótopos radioactivos [Wood *et al.*, 1991].

III. MATERIALES Y MÉTODOS

“No estudio por saber más, sino por ignorar menos”

Sor Juana Inés de la Cruz (1651-1695)

III.1. LUGAR DE ESTUDIO.

Nayarit es uno de los 31 estados que junto al Distrito Federal conforman las 32 entidades federativas de México. Se encuentra situado al noroeste, limita al norte con Sinaloa, Durango y Zacatecas, al sur con Jalisco y al oeste con el Océano Pacífico (Fig. III.1.).

El estado se divide en 20 municipios: Acaponeta, Ahuacatlán, Amatlán de Cañas, Bahía de Banderas, Compostela, El Nayar, Huajicori, Ixtlán del Río, Jala, La Yesca, Rosamorada, Ruiz, San Blas, San Pedro Lagunillas, Santa María del Oro, Santiago Ixcuintla, Tecuala, Tepic (capital de Nayarit), Tuxpan y Xalisco (Fig. III.2.).

Según los datos del censo de población y vivienda realizado por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) hasta el año 2010, el estado de Nayarit contaba con una población de 1,084.979 habitantes, de los cuales 541,007 eran hombres y 543,972 mujeres.

Su altitud sobre el nivel del mar es de 2.760 m., con un clima predominante semicálido. La temperatura media anual del estado es de 25°C, con temperaturas mínimas en el mes de enero de 10°C de media y temperaturas máximas ligeramente superiores a los 35°C en los meses de mayo y junio. La precipitación media anual es de 1100 mm.

Las principales actividades son: ganadería (bovino, ovino, caprino, porcino y aves de corral), pesca (robalo, huachinango, salmón y lisa, además de ser el número uno en la producción de gambas), industrias (azucarera y tabacalera), comercio y turismo. La Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación (SAGARPA) informó que en 2013 Nayarit contaba con 679.561 cabezas de ganado bovino (662.651 de carne y 16.910 de leche).

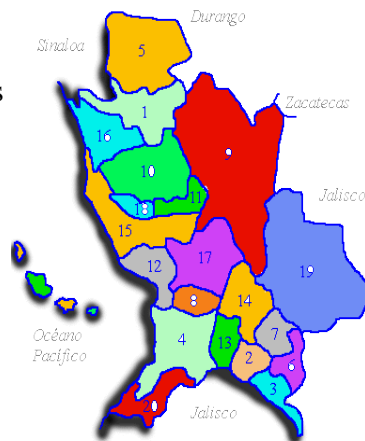
MÉXICO



Figura III.1. Distribución geográfica de México.

NAYARIT

- 1.- Acaponeta
- 2.- Ahuacatlán
- 3.- Amatlán de Cañas
- 4.- Compostela
- 5.- Huajicori
- 6.- Ixtlán del Río
- 7.- Jala
- 8.- Xalisco
- 9.- El Nayar
- 10.- Rosamorada



- 11.- Ruiz
- 12.- San Blas
- 13.- San Pedro Lagunillas
- 14.- Santa María del Oro
- 15.- Santiago Ixcuintla
- 16.- Tecuala
- 17.- *Tepic
- 18.- Tuxpan
- 19.- La Yesca
- 20.- Bahía de Banderas

*Lugar donde fueron tomadas todas las muestras, objeto de estudio.

Figura III.2. Distribución geográfica de Nayarit.

III.2. SELECCIÓN DE ANIMALES.

Para la realización de esta tesis se han empleado animales de la especie bovina que provenían de las campañas de erradicación de la tuberculosis, sacrificados en el matadero de la Ciudad de Tepic (México) en el período de febrero, marzo y abril del 2011 y en el periodo de febrero, marzo y abril del 2012. Se estudiaron 343 bovinos, 289 mayores de dos años y los 54 restantes menores de 2 años de edad, procedentes de los 20 municipios mencionados anteriormente. Se clasificaron en grupos de la A a la T. Del total de animales 62 eran machos y 281 hembras. Los bovinos fueron clasificados por su edad: menores de 2 años [vaquillas (n=21) y toretes (n=33)] y mayores de 2 años [vacas (n=260) y toros (n=29)] y lugar de procedencia. (Tabla III.1).

Procedencia	≤ 2 años	≥ 2 años	Identif.	Grupo
Acaponeta	2	11	A1 a A13	A
Ahuacatlán	2	11	B1 a B13	B
Amatlán de Cañas	2	6	C1 a C8	C
Compostela	7	24	D1 a D31	D
Huajicori	0	12	E1 a E12	E
Ixtlán del Río	1	10	F1 a F11	F
Jala	6	8	G1 a G14	G
Xalisco	1	11	H1 a H12	H
El Nayar	2	19	I1 a I21	I
Rosamorada	4	14	J1 a J18	J
Ruiz	4	7	K1 a K11	K
San Blas	2	6	L1 a L8	L
San Pedro Lagunillas	2	15	M1 a M17	M
Santa María del Oro	4	21	N1 a N25	N
Santiago Ixcuintla	3	6	O1 a O9	O
Tecuala	1	19	P1 a P20	P
Tepic	2	31	Q1 a Q33	Q
Tuxpan	5	8	R1 a R13	R
La Yesca	4	43	S1 a S47	S
Bahía de Banderas	0	7	T1 a T7	T
Total	54	289	343	

Tabla III.1. Distribución de los 343 bovinos en los 20 municipios (grupos A - T).

Las muestras se obtuvieron tras el sacrificio de los bovinos mediante aturdimiento con pistola de "bala cautiva" y desangrado y faenado habitual en matadero.

III.3. ESTUDIOS REALIZADOS.

Se llevaron a cabo las siguientes pruebas diagnósticas que se explican a continuación:

- 1) La prueba de Intradermorreacción (IDR) solo en animales mayores de 2 años: n=289.
- 2) Test ELISA-tb (frente al complejo *M. tuberculosis*) y ELISA-ptb (frente a *M. avium* subsp. *paratuberculosis*): n=320.
- 3) PCR en muestras de tejido (para la identificación de *M. bovis*, *Map* y *Maa*): n=275 y PCR para la identificación de *M. avium* subsp. *avium* (*Maa*): n=14.
- 4) Valoración de lesiones mediante estudios histológicos (Histología): n=62.

En un total de 35 animales se pudieron realizar las cuatro pruebas diagnósticas (IDR, ELISA-tb, ELISA-ptb, PCR-tb, PCR-ptb e histología).

- En 23 bovinos: Histología + ELISA tb y ptb + IDR.
- ELISA tb y ptb + IDR + PCR: 177 animales.
- En 4 animales: ELISA t y ptb + PCR + Histología.
- ELISA tb y ptb + IDR en 38 animales.
- ELISA tb y ptb + PCR en 36 animales.
- En 16 animales, IDR + PCR.
- En un total de 14 animales sólo se efectuó una prueba: en 7 la PCR y en otros 7 el ELISA tb y ptb.

3.1. Intradermorreacción (IDR) simple.

Todos los animales mayores de 2 años (n=289) fueron sometidos a la prueba de intradermorreacción simple en el curso del programa oficial de erradicación de la tuberculosis bovina, aplicada por personal capacitado por el Comité Estatal para el Fomento y Protección Pecuaria de Nayarit, S.C. en cada municipio del cual procedían dichos bovinos.

Dicha prueba se aplicó en el pliegue ano-caudal. Primeramente, se midió el grosor de la piel con un calibre en los puntos en que se iba a proceder a inyectar la tuberculina. A continuación, se inyectó intradérmicamente 0,1 ml de PPD bovina a una concentración de 1mg/ml. La lectura se realizó a las 72 horas midiendo nuevamente el grosor de la piel. Para la interpretación de los resultados se consideraron tres categorías reaccionantes, según la intensidad de la reacción:

- (i) Positivo: 5 mm o mayor.
- (ii) Sospechoso: entre 3 mm y 5 mm.
- (iii) Negativo: menos de 3 mm.

3.2 Prueba del test ELISA indirecto frente a tuberculosis y paratuberculosis.

3.2.1. Toma y procesamiento de muestras.

La valoración de la respuesta inmune humoral periférica frente a la tuberculosis y paratuberculosis, se llevó a cabo en 320 animales. Las muestras de sangre fueron tomadas en tubos de extracción sin aditivos de 5ml (Vacutainer®, Reino Unido), una vez sacrificados los animales, directamente del fluido sanguíneo ocasionado por el degüello. Posteriormente, los tubos se mantuvieron a temperatura ambiente durante 24 horas para permitir una correcta coagulación de la sangre y extraer el suero, que se almacenó congelado a -20°C en tubos viales tipo Eppendorf hasta su procesado.

El procesado de las muestras se realizó mediante el test ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay) siguiendo el protocolo descrito por Pérez *et al.* (1997) con algunas modificaciones, utilizado normalmente por nuestro grupo de investigación.

3.2.2. Desarrollo de la prueba ELISA.

En la tabla III.2 se indican todos los reactivos utilizados en la ejecución de esta técnica.

Tuberculosis.

La adsorción del antígeno al pocillo se realizó mediante incubación de 200 µl/pocillo de una solución de PPD bovina [100 µl de PPD bovina comercial (CZ Veterinaria, Porriño, España) en 20 ml. de tampón carbonato] durante 14 a 16 horas aproximadamente a 4°C. Posteriormente se realizaron lavados con una solución salina. Las placas adsorbidas se lavaban 5 veces para utilizarse el mismo día y 3 veces para congelarse a -20°C hasta su utilización.

Para la realización de la técnica, se emplearon 200 µl de suero problema a una dilución 1:100 en PBS-TG que fueron añadidos en cada pocillo. Las placas se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda. Transcurrido ese tiempo se lavaron 6 veces con PBS-TG. Se utilizó como conjugado proteína G marcada con peroxidasa a una dilución de 1:1.000. Las placas se incubaron de nuevo a temperatura ambiente en cámara húmeda durante 60 minutos y después se lavaron 5 veces con PBS-TG. En este momento se añadían 160 µl de la solución de sustrato y se incubaban durante 25

Materiales y Métodos

minutos en oscuridad y a temperatura ambiente en cámara húmeda, frenándose posteriormente con la adición de 40 µl por pocillo de la solución de frenado.

Paratuberculosis.

El primer paso de la técnica, consistió en adsorber el antígeno protoplasmático de *Map* PPA3 (Allied Monitor Lab. Inc., Fayette, Missouri, EEUU) en microplacas de polietileno de fondo plano. Se dispensaron 100 µl/pocillo del antígeno PPA3 a una concentración de 0,04 mg/ml en tampón carbonato y, posteriormente se incubó entre 14-16 horas. Las placas adsorbidas se lavaron 4 veces para ser usadas en el momento o 3 veces para congelarse a -20°C hasta su utilización.

Por otro lado, se diluían 50 µl de cada suero problema en 50 µl de una suspensión de *Mycobacterium phlei* (Allied Monitor Lab. Inc., Fayette, Missouri, EEUU), a una relación 1:1, en una placa no adsorbida, dejándola 2 horas en agitación a temperatura ambiente en cámara húmeda, con el fin de evitar reacciones inespecíficas. A continuación, se extraían 20 µl de la placa inicial, con ayuda de una pipeta multicanal, mezclándolos con 180 µl de PBS-TG en una placa intermedia no adsorbida, de la que finalmente se volvían a tomar 20 µl que se mezclaban con 80 µl de PBS-TG en la placa final adsorbida con PPA-3 consiguiéndose una dilución final para cada suero de 1/100. Se sometía a incubación otras 2 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda y, trascurrido ese tiempo, la placa se lavaba 5 veces con PBS-TG. A continuación se añadían a cada pocillo 100 µl de conjugado (proteína G) con PBS-T a una dilución de 1/1500. La incubación se repitió en las mismas condiciones que en el paso anterior y, tras realizar 4 nuevos lavados con PBS-TG, se dispensaron 100 µl del sustrato ABTS en cada pocillo. La placa se incubaba de 20 a 25 minutos en oscuridad y agitación. Pasado este tiempo, se detenía la reacción, añadiendo 100 µl de solución de frenado a cada pocillo

Todas las muestras, tanto para tuberculosis como paratuberculosis se procesaron por duplicado en pocillos contiguos. En cada placa se reservaban 12 pocillos para los controles positivos y negativos que se procesaban por duplicado en tres puntos diferentes de la placa, normalmente dos esquinas en diagonal y en el centro como se muestra en la Figura III.3. El control positivo consistía en el suero de un mismo animal infectado, positivo a la prueba ELISA y de valor conocido previamente. Para el control negativo se utilizó tampón PBS-TG.

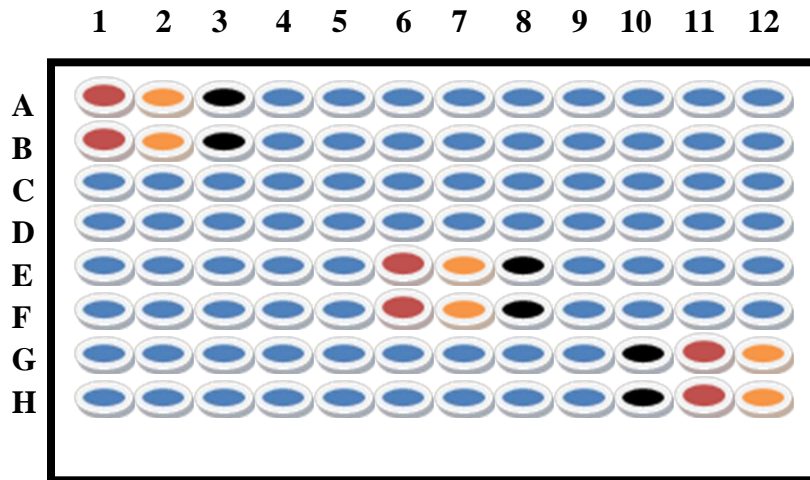





Figura III.3. Distribución de los sueros en la placa del test ELISA PPA-3 y de tuberculosis. Control Positivo:  Control Negativo:  Muestra por duplicado: 

Composición de los reactivos utilizados en la técnica ELISA

1. Solución salina de lavado:

- ❖ Cloruro sódico: 8,5 gr.
- ❖ Tween 80: 0,5 ml.
- ❖ Agua destilada: 1000 ml.

2. PBS-TG (solución para lavar las placas incubadas):

- ❖ Fosfato monosódico monohidratado: 1,8 gr.
- ❖ Fosfato disódico anhidro: 12,36 gr.
- ❖ Cloruro sódico: 8,5 gr.
- ❖ Agua destilada: 993 ml.
- ❖ pH 7.6 ajustado con NaOH.
- ❖ Tween 80: 0,5 ml.

3. Tampón citrato 0,05 M:

- ❖ Ácido cítrico monohidrato: 3,8 gr.
- ❖ Citrato sódico tribásico: 3,52 gr.
- ❖ Añadir agua destilada hasta 500 ml.
- ❖ Ajustar el pH a 4.

4. Tampón carbonato:

- ❖ Carbonato sódico (Na_2CO_3): 5,3 gr.
- ❖ Agua destilada: 1000 ml.
- ❖ pH 9.6 ajustado con HCL.

5. Sustrato ABTS: 2,2'-azino-di-(ethyl-benzyl-thiazoline sulfonate):

- ❖ ABTS: 5,48 gr.
- ❖ Tampón citrato: 50 ml.
- ❖ Añadir 19 μl de solución madre 1/25 de agua oxigenada (5 μl de agua oxigenada comercial de 30 volúmenes en 120 μl de agua destilada).

6. Solución de frenado:

- ❖ Ácido fluorhídrico (45%) 0,1 M: 889,33 μl .
- ❖ Agua destilada: 20 ml.

Tabla III.2. Preparación de los reactivos utilizados en el test ELISA.

3.2.3. Validación de la prueba ELISA e interpretación de los resultados.

La lectura de las placas se realizó en un espectrofotómetro (EL-340 Bio-Tek Instruments ® EEUU) con un filtro de 405 nm.

El valor de absorbancia de cada suero se obtuvo, calculando la media de las densidades ópticas (DO) de cada suero problema, así como la de los controles positivos. Estos valores eran transformados en un índice que se obtenía al dividir el valor medio de la DO de cada suero entre el valor medio de los controles positivos de cada placa:

$$\text{Índice ELISA del suero problema} = \frac{\text{DO media}_{405} \text{ Muestra}}{\text{DO media}_{405} \text{ Control Positivo}} \times 1000$$

Reaccionantes positivos a tuberculosis: índice mayor a 800

Reaccionantes dudosos a tuberculosis: índice entre 601 y 800

Reaccionantes negativos a tuberculosis: índice menor a 600

Reaccionantes positivos a paratuberculosis: índice mayor a 900

Reaccionantes dudosos a paratuberculosis: índice entre 601 y 900

Reaccionantes negativos a paratuberculosis: índice menor a 600

El punto de corte se estableció en base a los resultados de estudios previos, de tal manera que se mantuviera la mayor sensibilidad posible, con la mejor especificidad [Gutiérrez-Cancela, 1996; Pérez *et al.*, 1997; Garrido, 2001; González, 2003]. Además de la calificación otorgada a cada animal, se reflejó también el valor del cociente en cada caso.

3.3. Estudios *post mortem*.

3.3.1. Estudios anatomopatológicos.

3.3.1.1. Examen macroscópico y toma de muestras.

El examen macroscópico se realizó en el total de los animales estudiados, mediante la inspección visual y palpación de varios órganos, con especial atención a la cabeza, y nódulos linfáticos asociados, pulmón y ganglios linfáticos regionales, intestino delgado y ganglios linfáticos ileocecales y mesentéricos. En los 343 animales se tomaron las muestras que se reflejan en la Tabla III.3. y Figura III.4. para su posterior estudio histológico.

Muestras recogidas

❖ **Cabeza:**

Ganglio linfático retrofaríngeo medial (se encuentran en posición medial al asta mayor del hueso hioides, entre la faringe y los músculos rectos ventrales de la cabeza).

Ganglio linfático retrofaríngeo lateral (está situado a ambos lados de la línea media entre la laringe y el agujero magno).

Ganglio linfáticos parotídeos (localizados a cada lado de la cabeza bajo la glándula salival parótida).

❖ **Pulmón:**

Ganglio linfático traqueobronquial izquierdo (situado sobre el bronquio izquierdo, ventral al arco aórtico).

Ganglio linfático mediastínico medio (localizado al lado del traqueobronquial-izquierdo, sobre el bronquio izquierdo).

Ganglio linfático mediastínico caudal (ventral a la aorta, entre los lóbulos diafragmáticos).

❖ **Intestino delgado:**

Ganglio linfático ileocecal (se encuentra junto a la válvula ileocecal).

Ganglio linfático mesentérico (se encuentra situado junto al yeyuno distal)

Tabla III.3. Identificación de las muestras tomadas, tras el sacrificio de cada animal para los diferentes estudios.

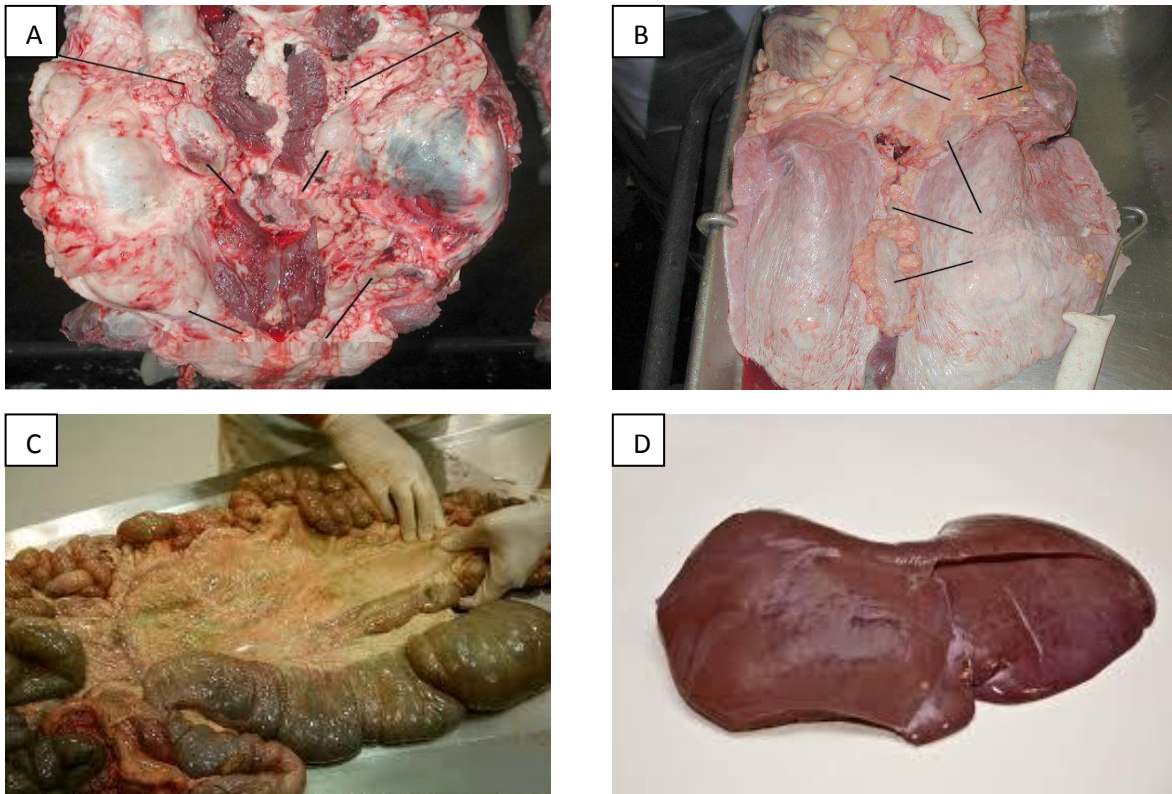


Figura III.4. Localización de los ganglios linfáticos objeto de estudio. A: Ganglios linfáticos de la cabeza. B: Ganglios linfáticos del pulmón. C: Ganglios linfáticos del intestino. D: Hígado.

En el pulmón se procedió a su inspección visual y en los ganglios linfáticos regionales se llevó a cabo su fileteado en secciones de aproximadamente 1 cm. En cada ganglio linfático examinado de la cabeza, se realizó también al menos una incisión. De estos órganos y de la válvula y ganglio linfático ileocecal se tomaron muestras de cada animal, que se fijaron en formol tamponado al 10% durante 7 días a un mes, una vez identificados y etiquetados.

3.3.1.2. Procesado histológico.

Una vez fijados los ganglios linfáticos se tallaron secciones de aproximadamente 3 mm de espesor en busca de lesiones que hubieran podido pasar desapercibidas en el matadero. De cada muestra se tomaron dos secciones que se introdujeron en capsulas plásticas de inclusión (TESPA, Giessen, Alemania). La inclusión en parafina se realizó de forma manual durante 22 horas. Para ello se procedió al lavado en agua y deshidratación en gradientes crecientes de alcohol y xilol, seguido la inmersión en parafina de 56°C de punto de fusión (Vogel Histo-Comp®, Giessen, Alemania), sin realizar un montaje tradicional, ya que dichas muestras tenían que ser transportadas a España. Una vez embebidas en parafina, pero sin llegar a formar el bloque, las muestras permanecieron almacenadas durante tres meses a temperatura ambiente, para después ser trasladadas al Laboratorio de Histología y Anatomía Patología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de León en España donde se realizó el montaje definitivo de los bloques en una unidad formadora de bloques (Myr AP280). Una vez montados los bloques de parafina de las diferentes muestras, se realizaron secciones de 4 µm de espesor mediante un micrótopo de rotación (Finesse®, Termo Shandon) que se recogieron en portaobjetos tratados con poli-L-lisina (Sigma-Aldrich®, Madrid, España).

En el momento de obtener secciones con el micrótopo, observamos que un buen número de bloques se cortaba con dificultad, debido a una intensa deshidratación y deficiente inclusión del tejido, probablemente por las condiciones inadecuadas de la inclusión y de almacenamiento. Por ello, los bloques se sometieron a un proceso de re-inclusión, tras su rehidratación previa. Este tratamiento no tuvo éxito, siendo imposible en todas las muestras llevar a cabo secciones para estudios histológicos adecuados. Únicamente fue posible obtener secciones válidas para su examen al microscopio de muestras de 62 animales.

3.4. Tinciones histológicas.

Tras un secado previo de las secciones en una estufa de 37°C durante 24 horas se realizaron tinciones Hematoxilina-Eosina y Ziehl-Neelsen para la detección de bacilos ácido-alcohol resistentes. El estudio histológico se realizó en 62 animales que aparecen reflejados en la siguiente tabla (Tabla. III.4.).

N° de Identif.	Municipio	Sexo	Edad	Aptitud
M1	San Pedro Lagunillas	♀	+2 años	Carne
B2	Ahuacatlán	♀	+2 años	Carne
N3	Santa María del Oro	♀	+2 años	Carne
Q4	Tepic	♂	+2 años	Carne
I3	El Nayar	♀	+2 años	Carne
D1	Compostela	♀	+2 años	Carne
S14	La Yesca	♀	+2 años	Carne
S16	La Yesca	♀	+2 años	Carne
S18	La Yesca	♀	+2 años	Leche
Q5	Tepic	♂	+2 años	Carne
M2	San Pedro Lagunillas	♀	+2 años	Carne
D5	Compostela	♀	+2 años	Carne
D6	Compostela	♂	+2 años	Carne
D7	Compostela	♀	+2 años	Leche
M3	San Pedro Lagunillas	♀	+2 años	Carne
D9	Compostela	♀	+2 años	Carne
D10	Compostela	♀	+2 años	Carne
D11	Compostela	♀	+2 años	Carne
D12	Compostela	♀	+2 años	Carne
D13	Compostela	♀	+2 años	Carne
C2	Amatlán de Cañas	♀	+2 años	Carne
D15	Compostela	♀	+2 años	Carne
N5	Santa María del Oro	♀	+2 años	Carne
N8	Santa María del Oro	♀	+2 años	Carne
G3	Jala	♀	+2 años	Carne
I6	El Nayar	♀	+2 años	Carne
I7	El Nayar	♀	+2 años	Carne
I8	El Nayar	♀	+2 años	Carne
I9	El Nayar	♀	+2 años	Carne
J4	Rosamorada	♀	-2 años	Carne
L2	San Blas	♂	+2 años	Carne
F4	Ixtlán del Río	♂	-2 años	Carne
N12	Santa María del Oro	♀	+2 años	Carne
E3	Huajicori	♀	+2 años	Carne
Q11	Tepic	♀	+2 años	Carne
I12	El Nayar	♀	+2 años	Carne
M8	San Pedro Lagunillas	♀	+2 años	Carne
A4	Acaponeta	♀	+2 años	Carne
B5	Ahuacatlán	♀	+2 años	Carne
N15	Santa María del Oro	♂	+2 años	Carne
B7	Ahuacatlán	♀	+2 años	Carne
A5	Acaponeta	♀	+2 años	Carne
Q14	Tepic	♀	+2 años	Carne
D20	Compostela	♀	+2 años	Carne
C3	Amatlán de Cañas	♀	+2 años	Carne

C4	Amatlán de Cañas	♂	+2 años	Carne
S39	La Yesca	♀	+2 años	Carne
O4	Santiago Ixcuintla	♀	-2 años	Carne
D21	Compostela	♀	+2 años	Carne
K5	Ruiz	♀	+2 años	Carne
N18	Santa María del Oro	♀	+2 años	Carne
A10	Acaponeta	♀	+2 años	Carne
M9	San Pedro Lagunillas	♀	+2 años	Carne
N20	Santa María del Oro	♂	+2 años	Carne
R7	Tuxpan	♀	+2 años	Carne
O6	Santiago Ixcuintla	♀	+2 años	Carne
S46	La Yesca	♀	+2 años	Leche
H10	Xalisco	♀	+2 años	Carne
N22	Santa María del Oro	♂	+2 años	Carne
N24	Santa María del Oro	♀	+2 años	Carne
C8	Amatlán de Cañas	♂	-2 años	Carne

Tabla III.4. Número de identificación, municipio de procedencia, sexo, edad y aptitud de los 62 animales en los que se realizó el estudio histológico.

Ambas tinciones se realizaron siguiendo los protocolos utilizados en la Universidad de León, descritos a continuación:

Tinción Hematoxilina-Eosina

- Desparafinar e hidratar pasando por xilol y alcoholes de grado decreciente.
- Lavar durante 10 minutos.
- Teñir 4 minutos en hematoxilina de Harris.
- Lavar durante 10 minutos.
- Teñir 30 segundos en eosina.
- Lavar durante 30 segundos introduciendo los portaobjetos en 2 recipientes.
- Deshidratar con alcoholes de grado creciente y xilol.
- Montaje con DPX (BDH®, Reino Unido).

Tabla III.5. Protocolo de la tinción Hematoxilina-Eosina (H-E).

Reactivos para la tinción Hematoxilina-Eosina

❖ Hematoxilina de Harris.

Hematoxilina (Merck®, Darmstadt, Alemania): 1 gr.

Alcohol 100°: 10 ml.

Alumbre amónico (Merck®, Darmstadt, Alemania): 20 gr.

Agua destilada: 200 ml.

Óxido de mercurio (Merck®, Darmstadt, Alemania): 0,5 gr.

❖ Eosina.

Eosina (Merck®, Darmstadt, Alemania): 1 gr.

Agua destilada: 100 ml.

Ácido acético glacial al 100%: 2-3 gotas.

Tabla III.6. Reactivos empleados para la tinción Hematoxilina-Eosina (H-E).

Tinción Ziehl-Neelsen
<ul style="list-style-type: none"> • Desparafinar e hidratar con xilol y alcoholes de grado decreciente. • Lavar durante 10 minutos. • Solución de carbol-fucsina 1 hora a temperatura ambiente. • Lavar durante 5 minutos. • Decolorar con la solución de alcohol-ácido hasta que la preparación se haga rosa pálida. • Lavar durante 8 minutos. • Colorear con la solución de trabajo azul de metileno 15 segundos. • Lavar en agua de grifo y luego en agua destilada. • Deshidratar pasando por alcoholes de grado creciente y xilol. • Montar con DPX (BDH ®, Reino Unido).

Tabla III.7. Protocolo para la tinción Ziehl-Neelsen (Z-N).

Reactivos empleados en la tinción Ziehl-Neelsen
<p>❖ Coloración: Carbolfucsina.</p>
<p>❖ Decoloración: Alcohol de 70°: 100ml. Ácido clorhídrico.</p>
<p>❖ Contraste: Solución madre de Azul de Metileno: Azul de metileno. Alcohol de 95°: 100 ml. Solución de trabajo de Azul de Metileno: Solución madre de azul de metileno: 10 ml. Agua corriente: 90 ml.</p>

Tabla III.8. Reactivos empleados para la tinción Ziehl-Neelsen (Z-N).

3.4.1. Valoración de las lesiones.

La valoración macroscópica de las lesiones tuberculosas en ganado bovino se realizó atendiendo la descripción clásica de los textos [Pallaske, 1962; Nieberle y Cohrs, 1966].

En el caso de las lesiones microscópicas asociadas a tuberculosis, se tomó como referencia para la clasificación lesional los tipos propuestos por García Castro (2007), que reconoce los tipos que se explican brevemente a continuación:

Tipo I:

En algunos ganglios se observó la presencia de pequeños granulomas (tubérculos miliares y submiliares) formados por macrófagos, células gigantes de Langhans muy diferenciadas, de gran tamaño y numerosos núcleos. Estos granulomas estaban bien delimitados del tejido circundante pero sin presencia de encapsulación. Cuando el tamaño de los mismos era mayor comenzaban a observarse zonas de necrosis de mayor tamaño delimitadas por linfocitos, macrófagos y abundantes células gigantes bien diferenciadas. En el seno de esta necrosis eran abundantes los restos celulares y apenas se observaba calcificación. La extensión de las lesiones era variable, con tendencia a localizarse en la zona interfolicular preservándose la mayor parte de los folículos y zona medular.

Tipo II:

La lesión era semejante a la anterior, pero con un número moderado de células gigantes de diferente tamaño y localizadas en la periferia de los granulomas. Asimismo, en algunas zonas de esta necrosis se apreciaba el inicio de una fina cápsula fibrosa. Junto con estas lesiones se observaban también áreas de necrosis con calcificación más extensas y delimitadas por una cápsula fibrosa y muy escaso componente celular, siendo la cantidad de células gigantes esporádica.

Tipo III:

Era característica la presencia de focos de necrosis de tamaño variable, con intensa calcificación y delimitados por una gruesa y densa cápsula fibrosa en la que habitualmente no se observaban células gigantes, siendo esporádicas y de pequeño tamaño cuando aparecían en la lesión, conformando un tejido semejante al de granulación. El número de estos focos era variable en cada caso, destruyéndose completamente la estructura del ganglio linfático en las zonas donde se localizaba.

En el caso de la paratuberculosis, para la valoración de las lesiones microscópicas se utilizaron los criterios propuestos por González *et al.* (2005) que, en función de su extensión y las características morfológicas, las clasifica en focales formadas por pequeños granulomas en el tejido linfoide, multifocales cuando también aparecían en la lámina propia, y difusas cuando el infiltrado ocupaba amplias zonas del intestino.

3.5. Detección de micobacterias mediante PCR y selección de muestras.

La detección del genoma micobacteriano de *M. bovis* y *Map* se realizó en 275 animales, empleando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), un conjunto o “pool” de muestras de cada animal. En otros 14 animales, en muestras individuales

elegidas en función de la presencia de lesiones, se realizó una PCR para la detección de ácido nucleicos de *Maa*, en ambos casos las muestras habían sido fijadas en formol, por un periodo de tiempo de aproximadamente 7 días e incluidas en parafina.

3.5.1. Procesado de las muestras.

Dichas secciones se obtuvieron mediante un micrótomo de rotación de forma que, entre cada bloque de parafina se procedía a la limpieza del micrótomo y de la cuchilla con lejía al 19% para evitar contaminaciones de ADN y con xilol para eliminar restos de parafina. Se utilizó una cuchilla por cada 3 animales (lado derecho, centro y lado izquierdo). Las secciones se colocaron en tubos de 1,5 ml. estériles y libres de DNAsas con la ayuda de unas pinzas estériles.

Como controles positivos, se emplearon bloques de tejido incluidos en parafina, de muestras de vacas ya conocidas de antemano por ser positivas a *Map*, *M. bovis* o *Maa*. Las secciones de los controles positivos se obtuvieron independientemente.

3.5.2. Lisis de la micobacteria y extracción del ADN.

Frente a *M. bovis* y *Map* (“pool”).

Para la extracción de las micobacterias, las muestras se centrifugaron durante 3 minutos a 7500 rpm para compactar. A cada muestra se le agregaron 200µm de Tween 20 (0,5 %). Después procedimos a la lisis empleando el método de rotura de las micobacterias por congelación/descongelación descrito por Garrido (2001), por el cual, los viales se sometieron a temperaturas de 100°C durante 10 minutos en una placa térmica para sumergirlas a continuación en nitrógeno líquido durante 10 minutos. Este proceso se repitió dos veces para la detección del genoma micobacteriano de *Map* y *M. bovis*.

A continuación, se introdujeron a la centrífuga a 5500 rpm durante 20 minutos. Para finalizar se recogieron aproximadamente entre 40 y 80µl del sobrenadante sin parafina. Las muestras se congelaron a -20°C hasta la realización de la PCR.

Extracción y lisis del ADN mediante el kit comercial.

Frente a *M. bovis*, *Map* y *Maa* (individual).

La extracción y lisis de ADN se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Los componentes del kit de extracción se almacenaron a temperatura ambiente (con la excepción de la proteinasa K que se conservaba en refrigeración a 4°C) y vienen descritos en la tabla III.9.

Componentes del kit comercial Speedtools Tissue DNA extraction kit®
<ul style="list-style-type: none">❖ Buffer BT1 (Contiene hidrocloreuro de guanidina)❖ Proteinasa K (Liofilizada): 30 mg.❖ Buffer proteinasa: 1,8 ml. <p>-Al abrir el kit la primera vez se tiene que reconstruir la proteinasa K liofilizada con 1,35 ml de Buffer proteinasa.</p> <ul style="list-style-type: none">❖ Reactivo BB1: 10 ml.❖ Reactivo BB2: 2,5 ml. <p>-Al abrir el kit se transfiere todo el contenido del Buffer BB1 en el reactivo BB2, se mezcla y la solución restante se convierte en el Buffer BB3 (contiene hidrocloreuro de guanidina).</p> <ul style="list-style-type: none">❖ Buffer BBW: (Contiene hidrocloreuro de guanidina): 30 ml.❖ Buffer BB5: (Concentrado): 7 ml. <p>-Al abrir el kit la primera vez se diluye este buffer en 28 ml de etanol.</p> <p>Buffer de elución BBE (Tris/HCL 5mM, pH 8,5): 13 ml. No contiene EDTA en su composición.</p> <ul style="list-style-type: none">❖ Columnas de unión ADN❖ Tubos de 2 ml.

Tabla.III.9. Componentes del kit comercial Speedtools Tissue DNA extraction kit (Biotools® B&M Labs., S.A., Madrid, España) para la extracción y purificación de ADN.

Tras añadir 180 µl de Buffer BT1 y 25 µl de proteinasa K, se incubaron las muestras en baño maría a 56°C durante 2-3h, homogeneizándolas ocasionalmente con ayuda de un agitador vórtex, hasta alcanzar una digestión completa del tejido. Con el fin de romper las células, completar la lisis de las muestras y así poder extraer y purificar el ADN, se dispensaron 200 µl de Buffer BB3 de lisis, homogeneizado nuevamente las muestras mediante vórtex e incubándolas a 70°C durante 10 min. Tras una centrifugación a 13000 rpm durante 5 min. Para precipitar el resto de partículas insolubles, se transfirió el sobrenadante a un nuevo vial de 1,5 ml para PCR.

La extracción de ADN se realizó mediante el uso de columnas de unión de ADN previamente colocadas sobre tubos de PCR de 2 ml (incluidos en el kit). Para ello, tras añadir 210 µl de etanol (Probalo™, Briare, Francia) al lisado y mezclar por inversión, se cargó la muestra a su columna correspondiente, que fue centrifugada durante 90 seg a 13000 rpm para favorecer la unión del ADN a la membrana de sílica. A continuación se procedió al lavado de dicha membrana con el fin de eliminar cualquier impureza. Así, se realizó un primer lavado con 500 µl de Buffer BBW y, tras centrifugar durante 90 seg a 13000 rpm, se llevó a cabo un segundo lavado con 600 µl de Buffer BB5 y centrifugado durante 2 min. A la misma velocidad. Para eliminar el etanol residual, se procedió al secado de la membrana con el ADN adherido, centrifugado durante 2 min a 13000 rpm.

Finalmente se llevó a cabo la elución del ADN puro, transfiriendo la columna vial de 1,5 ml estéril y libre de ADNAsas y dispensando 50 µl de Buffer BBE precalentado a

70°C directamente en la membrana (sin llegar a tocarla). Se incubaron las muestras durante 3 min y finalmente se centrifugaron 2 min a 13000 rpm para recoger el ADN puro extraído en el vial de 1,5 ml. Se volvió a repetir el paso de elución en las mismas condiciones, de tal forma que el ADN recogido acabó diluido en 100 µl de Buffer BBE. A continuación, o bien se pasaba directamente a la fase de amplificación del ADN, o bien se almacenaban las muestras a -20°C hasta su posterior uso.

3.5.3. Amplificación del ADN micobacteriano.

La amplificación del ADN se realizó en un termociclador XP Thermal Cycler® (Bioer Technology Co., LTD, Japón). Las secuencias de los oligonucleótidos de los cebadores utilizados para la amplificación del ADN micobacteriano se detallan a continuación [Collins *et al.*, 1993b]:

Para amplificar un fragmento de 217 pares de bases (pb) **IS900** específico de *Map* sometiendo a las muestras al siguiente protocolo:

*Desnaturalización: 96° 3 min.

*Amplificación: 40 ciclos.

°Desnaturalización: 96° 1 min.

°Cebado: 65° 1 min.

°Extensión: 72° 2 min.

*Extensión: 72° 8 min.

C1: GAT CGG AAC GTC GGC TGG TCA GG

C2: GAT CGC CTT GCT CAT CGC TGC CG

Para amplificar un fragmento de 123 pares de bases (pb) **IS6110** específico del complejo *M. tuberculosis*, empleando el siguiente ciclo de temperaturas y tiempos:

*Desnaturalización: 94° 1 min.

*Amplificación: 50 ciclos.

°Desnaturalización: 94° 45 seg.

°Cebado: 72° 75 seg.

°Extensión: 72° 10 min.

*Extensión: 72° 8 min).

TB1: CTC GTC CAG CGC CGC TTC GG

TB2: CCT GCG AGC GTA GGC GTC GG

Para amplificar un fragmento de 257 pares de bases (pb) **IS901** específico del complejo *M. avium avium*, empleando el siguiente ciclo de temperaturas y tiempos:

*Desnaturalización: 94° 10 min.

*Amplificación: 50 ciclos.

°Desnaturalización: 94° 1 min.

Materiales y Métodos

°Cebado: 65° 15 seg.

°Extensión: 72° 75 seg.

*Extensión: 72° 8 min.

MAA1: AAG CCG AGG TGG TGT ATG T

MAA2: AGG GAA GAT GGC GGT GAG CAT

Para llevar a cabo este proceso, se preparaba una “pre-mezcla” de amplificación, utilizando los siguientes reactivos descritos en la siguiente tabla III.10.

Reactivos	Concentración Inicial	Volumen (μl)/muestra Tb	Volumen (μl)/muestra Ptb
H ₂ O		13,3	14,3
Buffer (5Prime Inc.; EEUU)	10X	2,5	2,5
Mezcla de dNTPs (Bioline®; Reino Unido)	2,5 mM	2	2
Primer's (Invitrogen; EEUU)	20 μM	Tb ₁ 1	C ₁ 0,5
	20 μM	Tb ₂ 1	C ₂ 0,5
Taq ADN polimerasa (5Prime Inc.; EEUU)	5 U/μl	0,2	0,2
ADN muestra		5	5
Total		25	25

Tabla III.10. Reactivos empleados en la fase de amplificación de la PCR para las secuencias de inserción IS900 de *Map*, IS6110 de *M. bovis* e IS901 de *Maa*.

La pre-mezcla se preparó en un cuarto destinado únicamente a este uso, el cual está provisto de una lámpara de luz ultravioleta que, se encendía siempre aproximadamente 20 minutos antes de cada sesión de trabajo, con la finalidad de degradar cualquier ADN presente en las instalaciones, puntas, pipetas o en los mismos reactivos.

El paso siguiente fue introducir 20 μl de esta pre-mezcla de amplificación en unos viales de 0,2 ml de paredes estériles y libres de ADNasas (VWR collection®). En otro habitáculo diferente se añadieron 5 μl de ADN de las muestras problemas a esta pre-mezcla. Para asegurar que el proceso de amplificación de ADN fuera el correcto, se incluyó un control “positivo” ya conocido y otro “negativo”, sin ADN añadido (H₂O Milli Q) para cada reacción de PCR. Por último los viales se colocaron simétricamente en el termociclador y eran sometidos a los ciclos antes señalados.

Finalmente, las muestras obtenidas se refrigeraron a 4°C para conservarlas hasta llevar a cabo el proceso de identificación del producto amplificado mediante electroforesis.

3.5.4. Identificación del segmento amplificado.

Este proceso se realizó en un cuarto y con material exclusivo para trabajar específicamente con “amplicones”. Los fragmentos de ADN amplificados tras la PCR se visualizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa (SeaKem®LE Agarose, Iberlabo, S.A., Madrid, España) al 3% en tampón TBE 0,5X. Los reactivos y el proceso de elaboración se describen en la siguiente tabla (Tabla III.11.).

Preparación del gel de agarosa al 3% en tampón TBE 0,5X
<p>Reactivos:</p> <ul style="list-style-type: none"> ❖ Tampón TBE 10 X (1 litro): Tris básico (Merck®, Darmstadt, Alemania): 108 gr. Ácido bórico (H₃BO₃) (Calbiochem®; Merck, Alemania): 55 gr. EDTA 0,02 M pH 8 (Panreac, Barcelona, España): 7,44 gr. Diluir los 3 reactivos en 1000 ml. de agua destilada. ❖ Tampón TBE 1 X (1 litro): 100 ml. de solución tampón TBE 10 X 900 ml. de agua destilada ❖ Tampón TBE 0,5 X (1 litro): 50 ml. de solución tampón TBE 10 X 950 ml. de agua destilada ❖ Agarosa (SeaKem®LE Agarose, Iberlabo, S.A., Madrid, España) <p>Modo de preparación:</p> <ul style="list-style-type: none"> -Disolver 3 gr. de agarosa en 100ml. de TBE 0,5 X -Calentar la mezcla en el horno de microondas hasta que se disuelva completamente. -Dejar atemperar, para después verter en una bandeja de electroforesis con una rendija para marcar los pocillos. -Dejar enfriar durante 1 hora. -Una vez el gel seco, se introdujo en una cubeta de electroforesis llena con TBE 1 X el cual cubría unos 5 mm. sobre la superficie del gel.

Tabla III.11. Reactivos y protocolo de preparación del gel de agarosa para la visualización de los fragmentos de ADN amplificados.

Materiales y Métodos

Una vez que el gel se encontraba en la cubeta de electroforesis, procedimos a colocar una serie de “huellas circulares” sobre la superficie de papel parafinado (Parafilm®), donde se mezclaron mediante suaves pipeteos, 10 µl de la muestra problema obtenida tras la amplificación y 5µl de azul de bromofenol con ARNasas (Ecogen®, Madrid, España) en agua destilada libre de ADNasas y estéril, como tampón de carga. Finalmente se cargó el gel con los 15µl en su pocillo correspondiente. Este proceso fue el mismo para cada muestra, incluidos el control positivo y negativo.

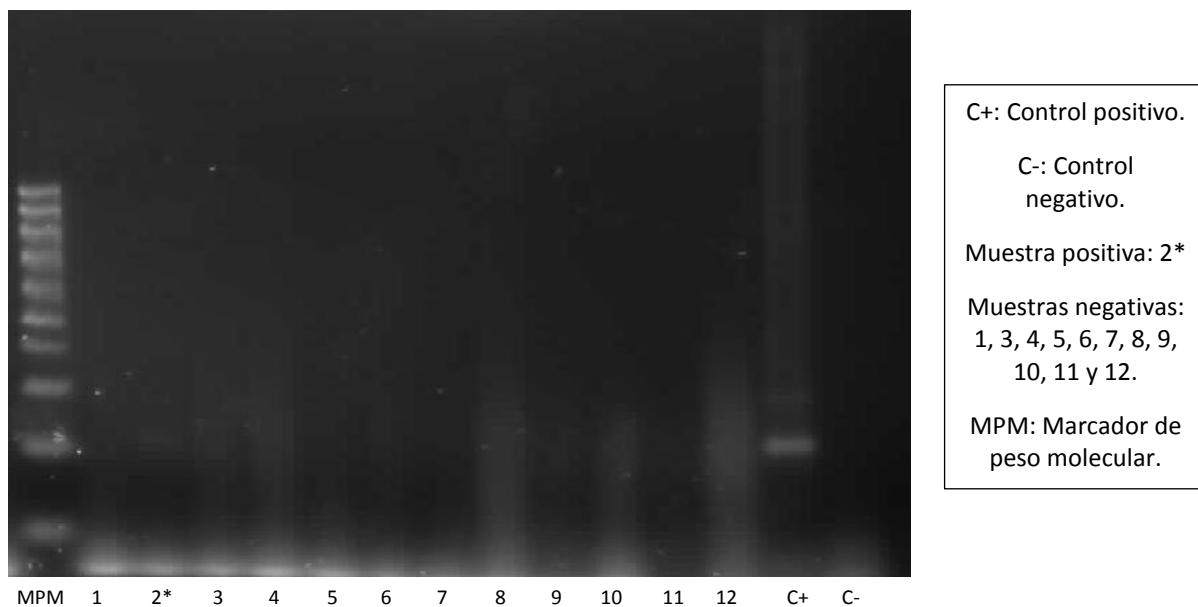


Figura III.5. Revelado de la PCR en gel de agarosa.

A continuación el gel fue sometido a una corriente eléctrica de 90 V al conectar la cubeta de electroforesis durante aproximadamente 90 minutos hasta que la banda azul de las muestras llegaba a pocos centímetros antes del borde del gel. Seguidamente el gel se tiñó en un baño en agitación con una solución de 0,5 µg/ml de azul de bromofenol (Merck®, Darmstadt, Alemania) durante 30 minutos. Finalmente, se realizó la lectura en una cámara con luz ultravioleta a 240 nm conectada a un sistema informático de tratamiento de imágenes (BioCapt MW1).

La interpretación de los resultados se llevó a cabo tras comprobar que en las muestras positivas aparecía una banda fluorescente de 123, 217 y 257 pb, correspondientes al fragmento amplificado de la secuencia de inserción IS6110, IS900 y IS901 respectivamente.

III.4. MATERIAL ÓPTICO Y FOTOGRÁFICO.

Para el estudio de las secciones histológicas se empleó un microscopio Leitz Diaplan con cabezal múltiple de discusión y con óptica PL Fluotar, alternando entre los distintos objetivos de 4X, 10X, 25X, 40X y 63X según el caso. Las microfotografías se realizaron en un microscopio Olympus Provis Ax70 (Tokio, Japón) con una cámara digital Nikon Digital Camera DMX 1200.

Para la realización de las fotografías macroscópicas se empleó una cámara digital Fujifilm FinePix Z33WP.

III.5. MATERIAL INFORMÁTICO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los programas informáticos empleados para la realización de este estudio fueron el Word, como procesador de textos, el Excel como hoja de cálculos y para obtención de gráficos, ambos del paquete Microsoft Office 2010TM. Además, el análisis de datos obtenidos mediante PCR se realizó a través de los programas MJ Opticon Monitor 3TM Analysis Software (Biorad, CA, EEUU) y Qbaseplus (Biogazelle©, Ghent, BE). Por último, se empleó el programa informático Win Episcopes Ver. 2.0 para la obtención del grado de concordancias entre pruebas diagnósticas y la prueba estadística de chi-cuadrado para la comparación de proporciones, con un nivel de confianza del 95% en ambos casos.

Para la valoración de la concordancia entre pruebas se utilizó la variable estadística kappa, cuyos valores pueden oscilar entre -1 y +1, donde +1 indica concordancia total, -1 equivale a la discordancia total, mientras que 0 indica que la concordancia observada es debida exclusivamente al azar. Por convención, los valores comprendidos entre 0 y 0,2 indican una concordancia débil; aquellos entre 0,2 y 0,4 se interpretan como concordancia escasa; entre 0,4 y 0,6 concordancia moderada; entre 0,6 y 0,8 concordancia significativa y finalmente valores de kappa entre 0,8 y 1 sugieren una concordancia casi perfecta (Smith, 1995).

IV.RESULTADOS

“Aprender es como remar contra corriente: en cuanto se deja, se retrocede”

Edward Benjamin Britten (1913-1976).

IV.1. VALORACION DE LA RESPUESTA INMUNE PERIFÉRICA FRENTE A TUBERCULOSIS Y PARATUBERCULOSIS.

En la Tabla IV.26 (pág. 105). se relacionan los animales estudiados así como los resultados de las pruebas diagnósticas realizadas.

1.1. Pruebas de inmunidad celular.

1.1.1. Intradermorreacción simple bovina.

Como ya se ha mencionado en el capítulo de Materiales y Métodos, la prueba de intradermorreacción (IDR) simple con PPD bovina se realizó en un total de 289 animales, de los cuales 26 (8.99%) se consideraron como positivos según los criterios expuestos en el capítulo II-4.4.1.1, al producirse un incremento de grosor superior a 4 mm del pliegue ano-caudal donde se inoculó la PPD bovina, mientras que 263 animales (91,01%) se consideraron negativos al no producirse ningún incremento (Fig. IV.1).

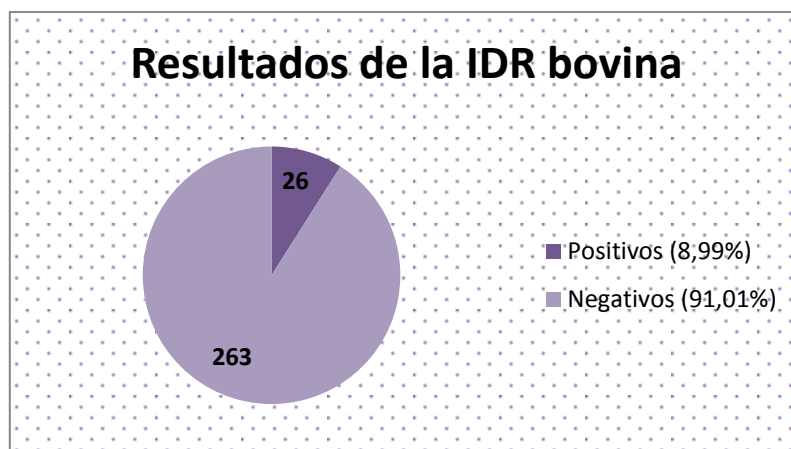


Gráfico IV.1. Resultados en la prueba de IDR bovina sobre 289 animales.

Dichos positivos se distribuían en los grupos A, B, D, E, H, I, J, K, M, N, O, Q, S y T con 18,18%, 9,09%, 12,5%, 8,33%, 9,09%, 5,26%, 14,28%, 28,57%, 6,66%, 9,52%, 16,66%, 6,45%, 11,62% y 14,28% de reaccionantes positivos respectivamente, siendo el porcentaje global de positividad de estos 14 grupos de 12,17% (Tabla IV.1.).

Cuando se llevó a cabo la prueba de chi-cuadrado de comparación de proporciones, no se observaron diferencias significativas en el nivel de prevalencia entre grupos ($p=0,99$).

Resultados

Grupo (Municipio)	N° Animales	N°+	+%
A	11	2	18,18
B	11	1	9,09
D	24	3	12,5
E	12	1	8,33
H	11	1	9,09
I	19	1	5,23
J	14	2	14,28
K	7	2	28,57
M	15	1	6,66
N	21	2	9,52
O	6	1	16,66
Q	31	2	6,45
S	43	5	11,62
T	7	1	14,28
TOTAL	232	25	10,77

Tabla IV.1. Resultado de los grupos a la prueba de intradermorreacción. N° Animales: Total de animales de cada grupo. N°+: Numero de reaccionantes positivos a la PPD bovina; %+: Porcentaje de reaccionantes positivos a la PPD bovina.

1.2. Prueba de inmunidad humoral.

1.2.1. Test de ELISA.

Tuberculosis:

La prueba ELISA, se realizó en un total de 320 animales (Gráfico IV.1.), 16 de ellos (5%) se consideraron positivos intenso (++) al presentar un índice superior a 1000, 42 animales (13,12%) resultaron positivos moderados (+) con un índice entre 801 y 1000, mientras que 149 animales (46,56%) resultaron dudosos ya que el índice serológico osciló entre 501 y 800. Por último, 113 animales (35,31%), se consideraron negativos ya que el índice serológico fue inferior a 500 (Tabla IV.2.).

Paratuberculosis:

La prueba ELISA para paratuberculosis se realizó en 320 animales (Gráfico IV.1.), 20 de ellos (6,25%) se consideraron positivos intenso (++) al presentar un índice superior a 1000, 11 animales (3,43%) resultaron positivos moderado (+) con un índice entre 901 y 1000, mientras que 71 (22,18%) fueron dudosos, con un índice serológico entre 601 y 900.

Por último, 218 animales (63,55%) resultaron negativos ya que el índice serológico fue inferior a 600 (Tabla IV.2.).

GRUPO	<i>M. bovis</i>			<i>Map</i>		
	(++)	(+)	(+/-)	(++)	(+)	(+/-)
A	0	2 (18,18%)	5 (45,45%)	0	1(9,09%)	2(18,18%)
B	0	1(8,33%)	4(33,33%)	1(8,33%)	1(8,33%)	2(16,66%)
C	1(12,5%)	0	4(50%)	0	2(25%)	1(12,5%)
D	2(6,90%)	1(3,45%)	18(62,05%)	1(3,44%)	1(3,44%)	7(24,13%)
E	0	1(10%)	6(60%)	1(10%)	1(10%)	0
F	0	1(10%)	5(50%)	1(10%)	0	1(10%)
G	0	3(30%)	4(40%)	0	1(10%)	2(20%)
H	1(9,09%)	2(18,18%)	7(63,63%)	1(9,09%)	0	0
I	0	3(14,28%)	8(38,09%)	1(4,76%)	0	5(23,80%)
J	3(18,75%)	2(12,5%)	6(37,5%)	0	0	4(25%)
K	0	2(20%)	4(40%)	1(10%)	1(10%)	4(40%)
L	0	2(25%)	3(37,5%)	0	1(12,5%)	2(25%)
M	0	5(33,33%)	7(46,66%)	2(13,33%)	2(13,33%)	4(26,66%)
N	4(16%)	3(12%)	4(16%)	1(4%)	0	8(32%)
O	0	2(22,22%)	2(22,22%)	1(11,11%)	1(11,11%)	3(33,33%)
P	1(5,88%)	2(11,76%)	11(64,70%)	1(5,88%)	2(11,76%)	4(23,52%)
Q	0	5(15,62%)	14(43,75%)	1(3,12%)	2(6,25%)	5(15,62%)
R	3(25%)	0	9(75%)	0	1(8,33%)	4(33,33%)
S	1(2,12%)	3(6,38%)	23(48,93%)	2(4,25%)	0	9(19,14%)
T	0	2(28,57%)	5(71,43%)	0	0	3(42,85%)
TOTAL	16(5%)	42(13,12%)	149(46,56%)	15(4,68%)	17(5,31%)	75(23,43%)

Tabla IV.2. Resultado del test ELISA frente a *M. bovis* y a *Map*.

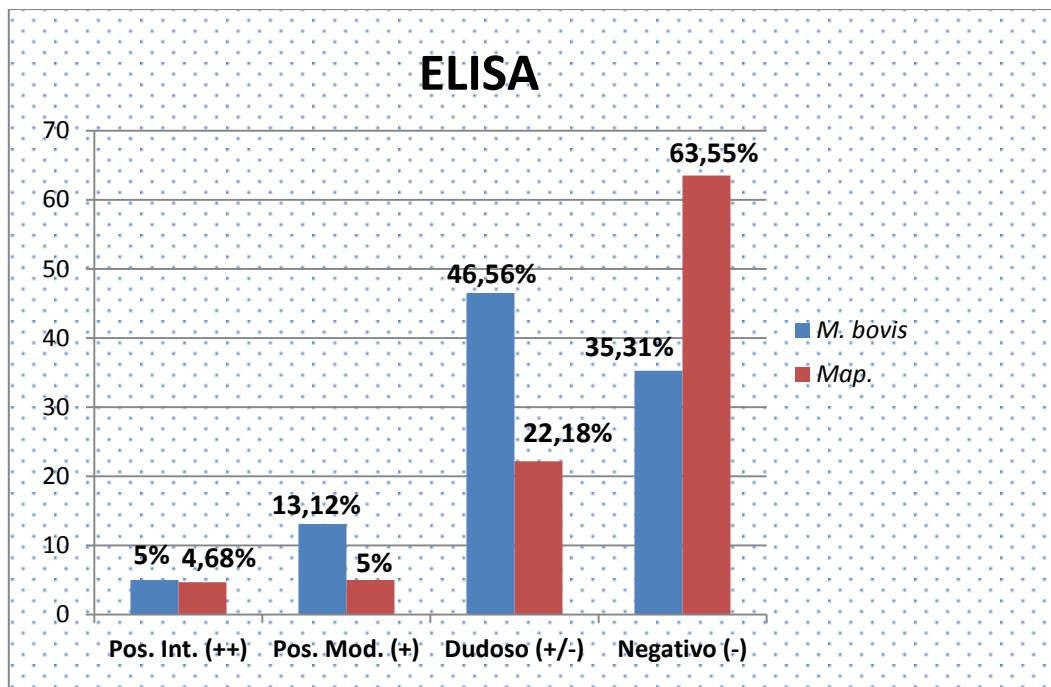


Gráfico IV.2. Resultados del test ELISA sobre 320 animales.

Los grupos que presentaron un porcentaje de positividad mayor del 25% fueron 8: G (30%), H (27,27%), J (31,25%), L (25%), M (33,33%), N (28%), R (25%) y T (28,57%). El porcentaje global de positividad de los 14 grupos fue del 28,84%.

Los reaccionantes positivos se distribuían en su mayoría en los grupos B (25%), C (25%), E (20%), K (20%), M (26,67%) y O (22,22%). El porcentaje en el conjunto de los grupos ascendía a 23,14%.

De acuerdo a la edad los animales, éstos se dividieron en dos grupos, como ya se mencionó en el capítulo de Materiales y Métodos: animales menores de 2 años y animales mayores de 2 años. La prueba ELISA, se realizó en 47 animales menores de dos años, obteniéndose los resultados que se exponen en la tabla IV.3. Cuando se analizaron los datos mediante la prueba de chi-cuadrado, no se encontró una asociación entre el nivel de positividad y la edad de los animales para ninguna de las técnicas.

GRUPO	Nº Animales	+ TB	+PTB
≤2 años	47	11(23,40%)	6(12,76%)
≥2 años	273	47(17,21%)	25(9,15%)
TOTAL	320	58(18,12%)	31(9,68%)

Tabla. IV.3. Resultado del test ELISA frente a *M. bovis* y *Map* por edad. Nº Animales: Número total de animales. +TB: Número de animales positivos al test ELISA frente a *M. bovis*. +PTB: Número de animales positivos al test ELISA frente a *Map*.

Tuberculosis.

De los 47 animales menores de 2 años, 5 de ellos (10,63%) se consideraron positivos intensos (++) al presentar un índice superior a 1000, 6 animales (12,76%) se consideraron positivos moderados (+) al presentar un índice mayor a 800 y menor de 1000, mientras que 20 animales (45,55%) resultaron dudosos ya que el índice serológico osciló entre 501 y 800. Por último, 16 animales (34,01%), se consideraron negativos ya que el índice serológico fue inferior a 500. En los mayores de dos años la prueba de ELISA se realizó en 273 animales, de los cuales, 46 (16,84%) se consideraron positivos al presentar un índice superior a 801, mientras que 127 animales (46,52%) resultaron dudosos ya que el índice serológico osciló entre 501 y 800. Por último, 100 (36,63%), se consideraron negativos ya que el índice serológico fue inferior a 500.

Paratuberculosis.

Del total de individuos menores de 2 años, 6 animales (12,76%) resultaron positivos intensos (++) al presentar un índice superior a 1000, mientras que 8 (17,02%) animales fueron dudosos, con un índice entre 601 y 900. Por último, 33 animales (70,12%) resultaron negativos ya que el índice serológico fue inferior a 600. En mayores de dos años la prueba se realizó en 273 animales, de los cuales 26 animales (9,52%) resultaron positivos al presentar un índice superior a 900, mientras 64 animales (23,44%) se consideraron dudosos con un índice entre 601 y 900. Por último, 183 (67,03%) resultaron negativos ya que el índice serológico fue inferior a 600.

De los 17 animales menores de 2 años positivos a ELISA frente a *M. bovis* y *Map*, 3 lo fueron a ambas pruebas.

IV.2. RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS *post mortem*.

2.1. Observaciones macroscópicas.

Se apreciaron lesiones compatibles con la infección tuberculosa en 2 (D12 e I6) de los 343 animales estudiados.

En el animal I6 la lesión pudo observarse solo en ganglios linfáticos mesentéricos y en el animal D12 en ganglios linfáticos del pulmón (mediastínicos). En los dos casos, el aspecto externo del ganglio no se veía alterado sin apreciarse tumefacción evidente. A la sección, se observó un número reducido de nodulillos, del tamaño de la cabeza de un alfiler, con un color blanquecino y con calcificación, que se distribuían fundamentalmente por la zona de la cortical del ganglio.

2.2. Lesiones paratuberculosas.

No se observaron alteraciones macroscópicas evidentes.

2.2.1. Características microscópicas.

El examen histológico se llevó a cabo en 62 animales, lo que supone el 18,07% del total de los animales estudiados. (Tabla IV.4.). La presencia de lesiones granulomatosas asociadas a infecciones por micobacterias se valoró en: pulmón, ganglios linfáticos de la cabeza (retrofaríngeos, GLC), ganglios linfáticos del pulmón (mediastínicos, GLP) hígado y ganglios linfáticos mesentéricos (GLM).

En un total de 35 animales (56,45%) se encontraron lesiones granulomatosas, que fueron clasificadas en varios tipos, tomando como referencia los criterios propuestos por González *et al.* (2005) para la paratuberculosis bovina o la propuesta por García Castro (2007) para la tuberculosis bovina, que consideran la extensión de la lesión y los tipos celulares presentes.

Siguiendo estos criterios tan solo se observaron lesiones compatibles con las descritas en paratuberculosis y localizadas en nódulos linfáticos, que fueron divididas en 3 grupos principales:

1A) Esta lesión estaba caracterizada por la presencia, en la zona interfolicular de los ganglios linfáticos mesentéricos e ileocecales, de pequeños granulomas compuestos por entre 10 y 50 células de morfología macrofágica, con abundante citoplasma claro y presencia de un pigmento marrón-negruzco (ceroide) en menor o mayor medida en el mismo. Entre los macrófagos podían observarse algunos linfocitos (Fig.IV.1.).

1B) Se caracterizaba por presentar entre 5 ó 20 granulomas de diferente tamaño, formados por un número mayor de células que en 1A, llegando a confluir en algunos casos y ocupando una amplia superficie de la zona interfolicular del nódulo linfático, pero con una distribución multifocal (Fig.IV.1.).

1C) Se observaba la presencia de granulomas similares a los descritos en 1A-1B de mayor tamaño y distribuidos por toda la cortical, llegando a llenar todo el espacio interfolicular en algunos casos, presentando una distribución difusa.

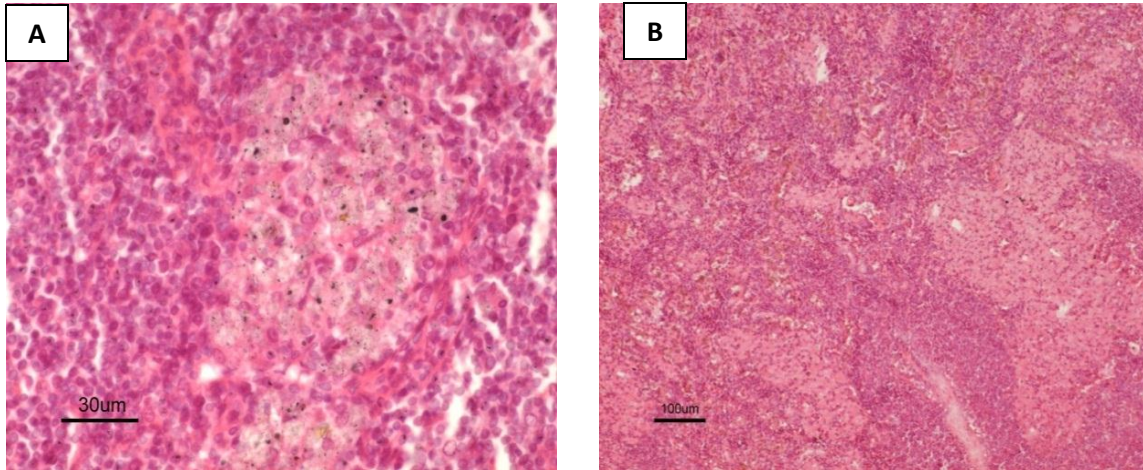


Figura IV.1. Lesiones microscópicas. A: Tipo 1A. Se observa un granuloma bien delimitado, formado por abundantes macrófagos cargados de pigmento ceroide. B: Tipo 1B. La lesión granulomatosa muestra una mayor extensión, ocupando gran parte de la región paracortical.

En un total de 5 animales con lesiones se realizó la tinción de Ziehl-Neelsen: dos de ellos no tenían lesiones; en dos las lesiones ganglionares fueron del tipo 1C y en uno de tipo 1B, que fueron negativas a la presencia de BAAR en todos los casos.

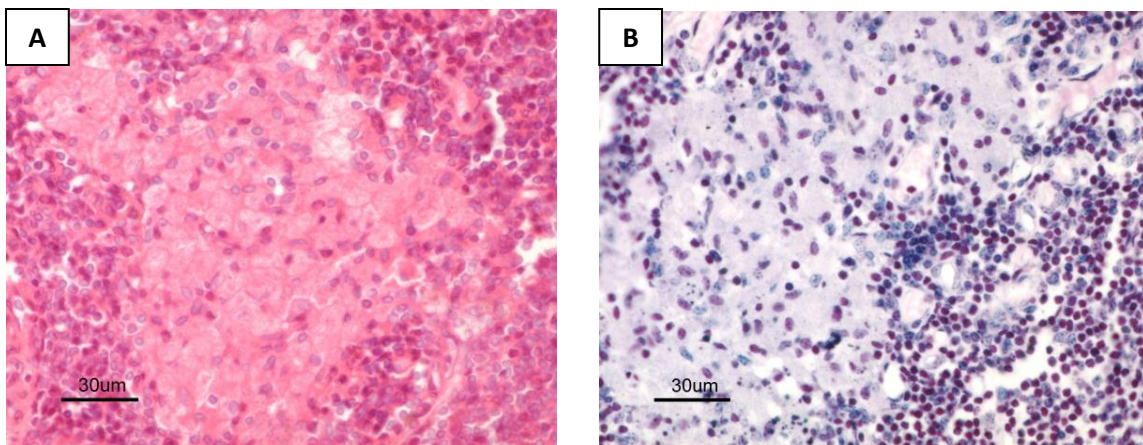


Figura IV.2. Lesión de tipo 1B (A), negativa a la presencia de BAAR mediante la técnica de Ziehl-Neelsen (B).

Además de las descritas, también se observaron piogranulomas en los ganglios linfáticos mesentérico y mediastínico, caracterizados principalmente por la presencia de neutrófilos y macrófagos, rodeados por una cápsula de tejido conjuntivo, que se correspondían con las lesiones observadas macroscópicamente en 2 animales (D12 e I16).

Resultados

GRUPO (Municipio)	N° animales/con lesiones	%
A	3/2	66,66%
B	3/1	50%
C	4/3	75%
D	12/6	50%
E	1/0	0%
F	1/0	0%
G	1/0	0%
H	1/0	0%
I	6/3	50%
J	1/1	100%
K	1/0	0%
L	1/1	100%
M	5/2	40%
N	9/6	66,66%
O	2/2	100%
P	0/0	0%
Q	5/4	80%
R	1/0	0%
S	5/4	80%
T	0/0	0%

Tabla. IV.4. Distribución del número de animales con lesiones según el grupo (municipio).

En un total de 36 (58,06%) animales se encontraron lesiones. En 10 bovinos (27,77%) aparecieron lesiones en los GLC. En 4 animales (11,11%) en los GLP, en 2 animales (5,55%) pudieron observarse lesiones en GLC y GLP, en 2 animales (5,55%) en pulmón y GLP. En 12 animales (33,33%) las lesiones se observaron en los GLM. En 2 animales (5,55%) la lesión se observó en GLC y GLM, en un animal (2,77%) en GLP y GLM, y por último en 3 animales (8,33%) pudieron observarse lesiones en hígado y ganglios linfáticos mesentéricos. (Tabla IV.5.).

Identif.	Pulmón	GLC	GLP	Hígado	GLM
A4	-	-	-	-	-
A5	-	-	-	-	+1A
A10	-	+1A	-	-	+1A
B2	-	-	-	-	-
B5	-	-	-	-	+1A
B7	-	-	-	-	-
C2	-	-	-	-	+1B
C3	-	-	-	-	-
C4	-	+1A	-	-	-
C8	-	-	-	-	+1A

D1	-	-	-	-	+1A
D5	-	-	+1B-1C	-	-
D6	-	-	-	-	-
D7	-	-	-	-	-
D9	-	-	-	-	-
D10	-	-	-	+1A	+1A
D11	-	-	-	-	-
D12	-	-	-	-	-
D13	+1B-1C	-	+1B-1C	-	-
D15	-	-	-	-	-
D20	-	-	-	-	-
D21	-	+1A	-	-	-
E3	-	-	-	-	-
F4	-	-	-	-	-
G3	-	-	-	-	-
H10	-	-	-	-	-
I3	-	+1B	+1B	-	-
I6	-	-	-	+1A	+1A
I7	-	-	-	-	-
I8	-	-	-	-	-
I9	-	-	-	-	-
I12	-	+1B	-	-	-
J4	-	+1A	+1B	-	-
K5	-	-	-	-	-
L2	-	-	+1A	-	+1A
M1	-	+1B	-	-	-
M2	-	-	-	-	+1B
M3	-	-	-	+1C	+1C
M8	-	-	-	-	-
M9	-	-	-	-	-
N3	-	-	-	-	-
N5	-	+1A	-	-	-
N8	-	-	-	-	-
N12	-	-	-	-	+1A
N15	-	+1A	-	-	-
N18	-	-	-	-	-
N20	-	-	-	-	+1C
N22	-	+1A-1B	-	-	-
N24	-	-	-	-	+1C
O4	-	-	-	-	+1A
O6	-	+1C	-	-	-
Q2	-	-	+1B	-	-
Q4	-	-	-	-	+1C
Q5	-	+1B	-	-	-
Q11	-	+1C	-	-	-
Q14	-	-	-	-	-

Resultados

R7	-	-	-	-	-
S14	-	-	+1B	-	-
S16	-	-	-	-	-
S18	+1A	-	+1A	-	-
S39	-	-	-	-	+1C
S46	-	-	+1B	-	-

Tabla IV.5. Identificación de los animales en los que se valoraron las lesiones histológicas. -: sin lesión; +: con lesión. GLC: ganglios linfáticos de la cabeza; GLP: ganglios linfáticos del pulmón; GLM: ganglios linfáticos mesentéricos.

Localización Anatómica	1A	1B	1C	Total con lesión/examinados%
Ganglios linfáticos de la cabeza	7	5	2	14/37 (37,83%)
Ganglios linfáticos del pulmón	2	7	2	11/28 (39,28%)
Ganglios linfáticos mesentéricos	10	2	5	17/35 (48,57%)
Pulmón	1	1	1	3/26 (11,53%)
Hígado	0	0	1	1/33 (3,03%)
Total	20	15	11	46/159 (28,93%)

Tabla.IV.6. Número de lesiones según la distribución anatómica y su tipo.

IV.3. RESULTADOS EN LA PRUEBA DE DETECCIÓN DE MICOBACTERIAS MEDIANTE LA PCR.

La técnica PCR se realizó en un “pool” que contenía muestras de ganglio linfático retrofaríngeo, ganglio linfático mediastínico, pulmón, hígado y ganglio linfático mesentérico, frente a *M. bovis* y *Map*. Utilizando el kit comercial Speedtools Tissue DNA se realizó el PCR frente a *Maa* en muestras individuales de animales seleccionados con lesiones histopatológicas (tipo 1A, 1B y 1C) a partir de tejido incluido en parafina.

De los 275 animales examinados, 20 resultaron positivos (7,28%) para tuberculosis (*M. bovis*), mientras que 11 animales resultaron positivos (4%) a paratuberculosis (*Map*), al aparecer la banda característica en el gel de agarosa en dichas enfermedades (Tabla IV.7.).

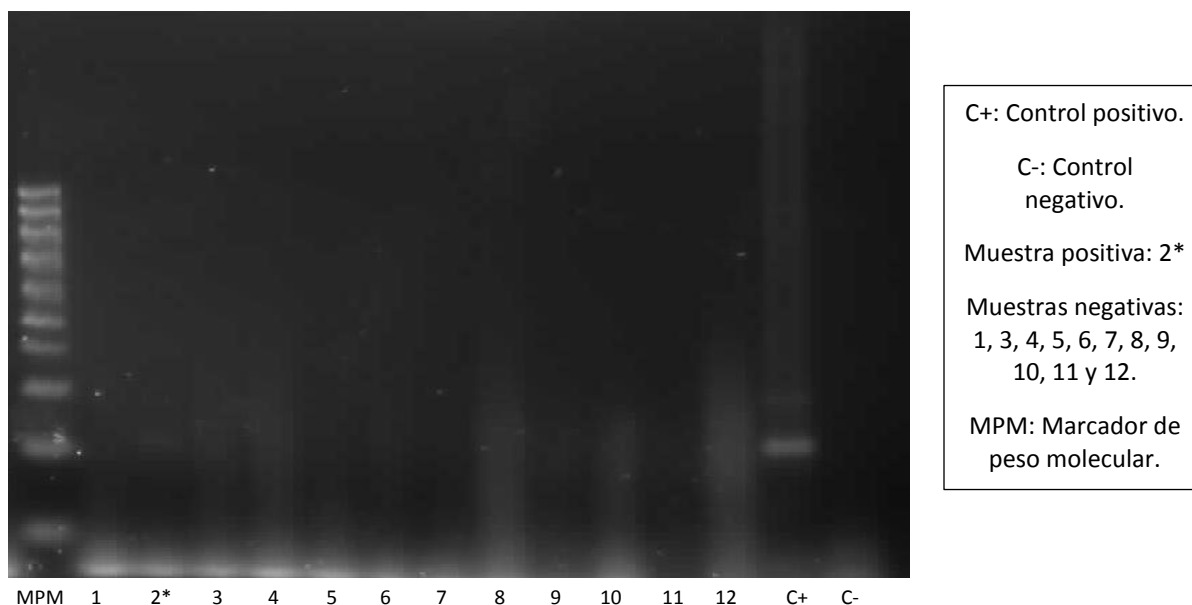


Figura IV.3. Revelado de la PCR en gel de agarosa con muestras positivas a la secuencia de inserción IS6110 de *M. bovis*.

GRUPO (Municipio)	N° Animales	<i>M. bovis</i> +	<i>Map</i> +
A	13	0	1(7,69%)
B	11	0	0
C	6	0	0
D	12	1 (8,33%)	1(8,33%)
E	12	3(25%)	1(8,33%)
F	8	0	0
G	14	0	0
H	12	1(8,33%)	1(8,33%)
I	16	2(12,5%)	1(6,25%)
J	16	3(18,75%)	1(6,25%)
K	11	1(9,09%)	1(9,09%)
L	8	0	0
M	14	2(14,28%)	0
N	22	2(9,09%)	0
O	9	2(22,22%)	1(11,11%)
P	17	0	0
Q	27	1(3,70%)	1(3,70%)
R	13	1(7,69%)	0
S	27	1(3,70%)	1(3,70%)
T	7	0	1(14,28%)
TOTAL	275	20(7,27%)	11(4%)

Tabla IV.7. Resultados de la PCR frente a *M. bovis* y *Map* realizada sobre 275 animales.

Resultados

Los reaccionantes positivos a tuberculosis se distribuían en 12 grupos (municipio): D (8,33%), E (25%), H (8,33%), I (12,5%), J (18,75%), K (9,09%), M (14,28%), N (9,09%), O (22,22%), Q (3,70%), R (7,69%) y S (3,70%). El porcentaje de positividad global fue del 11,89%. Frente a paratuberculosis los reaccionantes positivos se distribuían en 11 grupos: A (7,69%), D (8,33%), E (8,33%), H (8,33%), I (6,25%), J (6,25%), K (9,09%), O (11,11%), Q (3,70%), S (3,70%) y T (14,28%). El porcentaje de positividad global fue del 7,91%.

De acuerdo a la edad los animales se dividieron en dos grupos, como ya se mencionó en el capítulo de materiales y métodos: animales menores de 2 años y animales mayores de 2 años. La técnica de la PCR, se realizó en 47 animales menores de dos años y en 228 animales mayores de dos años.

La PCR frente a *M. bovis* en animales menores de dos fue positiva en 3 de ellos (6,38%) y, en los mayores de dos años, 17 (7,45%) animales fueron positivos. La PCR frente a *Map* en animales menores de dos años, sólo fue positiva en uno (2,12%) y en animales mayores de dos años, 10 (4,38%) animales fueron positivos (Gráfico IV.3.). Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

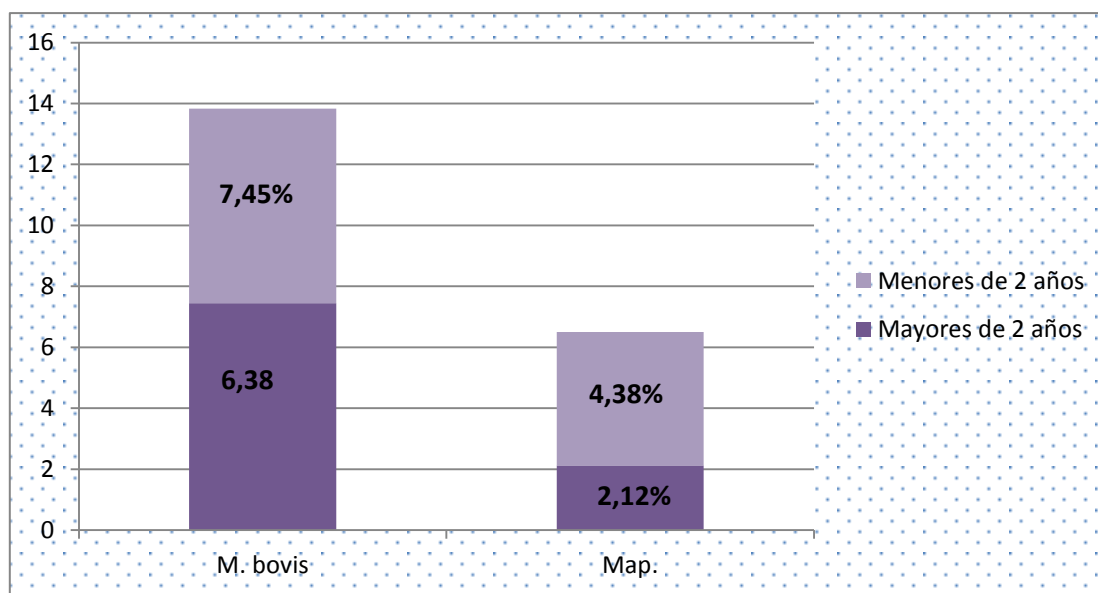


Gráfico.IV.3. Porcentaje de acuerdo a la edad en la PCR frente a *M. bovis* y *Map*.

La PCR frente a *Maa* se realizó en 14 animales con lesiones a partir de muestras de ganglios linfáticos mesentéricos (n=6), retrofaríngeos (n=6) y mediastínicos (n=3). De los 14 animales examinados, 13 (93,33%) resultaron positivos a *Maa* al aparecer la banda característica en el gel de agarosa (Tabla IV.8.). De ellos, dos (S18, D12) también lo fueron a *M. bovis*, mientras que todos fueron negativos a *Map*.

Identif. Animal/ Localización	<i>M. bovis</i>	<i>Map</i>	<i>Maa</i>
M1 (GLC)	NEG.	NEG.	POS.
I3 (GLC)	NEG.	NEG.	NEG.
S18 (GLP)	POS.	NEG.	POS.
D5 (GLP)	NEG.	NEG.	POS.
M3 (GLM)	NEG.	NEG.	POS.
D11 (GLP)	NEG.	NEG.	POS.
D12 (GLP)	NEG.	NEG.	POS.
D12 (GLC)	POS.	NEG.	POS.
D13 (GLP)	NEG.	NEG.	POS.
C2 (GLM)	NEG.	NEG.	POS.
N12 (GLP)	NEG.	NEG.	POS.
C4 (GLC)	NEG.	NEG.	POS.
S39 (GLM)	NEG.	NEG.	POS.
N20 (GLM)	NEG.	NEG.	POS.
O6 (GLC)	NEG.	NEG.	POS.
C8 (GLM)	NEG.	NEG.	POS.

Tabla.IV.8. Resultados de la PCR realizada sobre 14 animales en los que se analizaron las tres micobacterias (*M. bovis*, *Map*: *M. avium* subsp *paratuberculosis*; *Maa*: *M. avium* subsp *avium*).

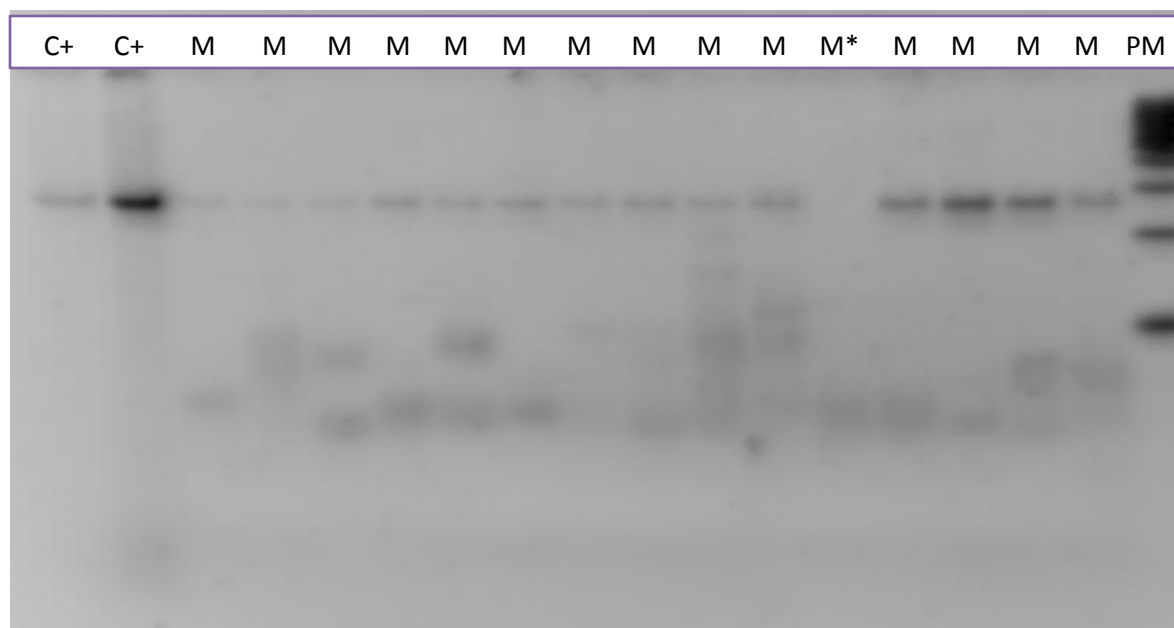


Figura.IV.4. Revelado de la PCR en gel de agarosa. Muestras positivas a la secuencia de inserción *IS901* de *Maa* C+: control positivo. M: muestra positiva. M*: muestra negativa. PM: peso molecular.

IV. 4. COMPARACIÓN ENTRE TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS.

4.1. Comparación entre el diagnóstico histopatológico y el diagnóstico inmunológico.

4.1.1. Comparación entre el diagnóstico histopatológico y la IDR.

Ambas técnicas se llevaron a cabo en 58 animales de los cuales 7 (12,06%) resultaron positivos a la prueba de IDR. De ellos, 2 presentaron lesiones en los ganglios linfáticos de la cabeza y el resto no presentó lesiones microscópicas (Tabla IV.9.).

De los 51 animales con resultado negativo a la prueba de IDR, en 21 no se observaron lesiones, mientras que en los 30 restantes con lesiones, 10 animales presentaban lesiones sólo en los ganglios linfáticos de la cabeza, 12 animales en ganglios linfáticos mesentéricos y en 4 animales en ganglios linfáticos mediastínicos. Por último, en 3 animales en hígado y ganglios linfáticos mesentéricos, en dos animales en pulmón y ganglios linfáticos mediastínicos, en dos animales en ganglios linfáticos de la cabeza y mediastínicos, en un animal en ganglios linfáticos de la cabeza y ganglios linfáticos mediastínicos y en un animal en ganglios linfáticos mediastínicos y mesentéricos.

	HISTOPALOGÍA		TOTAL
	Positivos	Negativos	
IDR +	2	5	7
IDR -	30	21	51
TOTAL	32	26	58

Tabla. IV.9. Relación del número de animales con lesiones y la respuesta a la intradermoreacción (IDR) con PPD bovina.

El índice kappa fue 0,119, lo que indica una concordancia débil entre las dos técnicas diagnósticas.

4.1.2. Comparación entre el diagnóstico histopatológico y el ELISA.

Tuberculosis.

Ambas pruebas se realizaron en 62 animales, de los cuales 17 (27,41%) fueron positivos a la prueba ELISA, 6 animales no presentaron lesiones, en 5 animales pudimos observar lesiones en los ganglios linfáticos de la cabeza, en 4 animales en ganglios linfáticos mesentéricos, en uno en ganglios linfáticos mediastínicos y por último, sólo en un animal pudimos observar lesiones en los ganglios linfáticos de la cabeza y mesentéricos. De los 25 (40,32%) animales dudosos (índice se entre 601 y 800), en 11 animales no se

encontraron lesiones, mientras que en 3 animales se observaron lesiones en ganglios linfáticos de la cabeza, en 3 animales en ganglios linfáticos mesentéricos y en dos animales en ganglios linfáticos mediastínicos. Además, pudimos observar lesiones múltiples en un mismo animal, en dos se observaron lesiones en ganglios linfáticos de la cabeza y ganglios linfáticos mediastínicos, en dos animales en pulmón y ganglios linfáticos mediastínicos y en 2 animales en hígado y ganglios linfáticos mesentéricos (Tabla IV.10.).

	HISTOPATOLOGÍA		TOTAL
	+	-	
ELISA +	11	6	17
ELISA +/-	14	11	25
ELISA -	10	10	20
TOTAL	35	27	62

Tabla. IV.10. Relación entre los resultados del test ELISA frente a *M. bovis*.

Tomando los animales con resultado dudoso en el grupo de los negativos, el ELISA presentó un índice kappa de 0,037, lo que indica una concordancia débil entre las dos técnicas diagnósticas. Cuando los animales con resultado dudoso en el ELISA se consideraron positivos, el índice kappa fue 0,046, siendo igualmente una concordancia débil.

Paratuberculosis.

De los 11 (17,74%) animales positivos a la prueba ELISA, 6 animales presentaron lesiones, 3 de ellos en los ganglios linfáticos de la cabeza y 3 animales en los ganglios linfáticos mesentéricos. En 16 animales el índice se situó entre 6001 y 900, y por lo tanto se consideraron dudosos; de estos, en 4 no se encontraron lesiones, mientras que en 4 animales se observaron lesiones en los ganglios linfáticos mesentéricos, en 3 animales lesiones en ganglios linfáticos de la cabeza, en 2 animales en ganglios linfáticos mediastínicos, en 2 animales la lesión se observó en hígado y ganglios linfáticos mesentéricos, en un animal en ganglios linfáticos mediastínicos y mesentéricos (Tabla IV.11.).

	HISTOPATOLOGÍA		TOTAL
	+	-	
ELISA +	6	5	11
ELISA +/-	12	4	16
ELISA -	17	18	35
TOTAL	35	27	62

Tabla IV.11. Relación entre los resultados del test ELISA frente a *Map*.

Resultados

Tomando los animales con resultado dudoso en el grupo de los negativos, el ELISA presentó un índice kappa de -0,005, lo que indica una falta de concordancia entre las dos técnicas diagnósticas. Cuando los animales con resultado dudoso en el ELISA se consideraron positivos, el índice kappa fue 0,080, lo que supone una concordancia débil.

4.1.3. Comparación entre el diagnóstico histopatológico y la PCR.

PCR frente a *M. bovis*.

Ambas técnicas se llevaron a cabo en 39 animales, de los que 9 (23,07%) resultaron positivos a la PCR. De estos, 3 animales presentaron lesiones en los ganglios linfáticos de la cabeza, un animal presentó lesiones en los ganglios linfáticos del pulmón y en un animal la lesión pudo observarse en el hígado y ganglios linfáticos mesentéricos, mientras que los 4 restantes no presentaron lesiones. Entre los 30 animales negativos a la técnica PCR, 14 no presentaron lesiones histológicas. En los 16 animales restantes con lesiones, en 8 animales se encontraron afectados los ganglios linfáticos mesentéricos, en 5 animales los ganglios linfáticos de la cabeza, en un animal en ganglios linfáticos de la cabeza y mediastínicos, en un animal en ganglios linfáticos de la cabeza y mesentéricos y en un animal en ganglios linfáticos mediastínicos y mesentéricos (Tabla IV.12.). El índice de kappa fue 0,009, lo que indica una concordancia débil.

	HISTOPATOLOGÍA		TOTAL
	+	-	
PCR +	5	4	9
PCR -	16	14	30
TOTAL	21	18	39

Tabla. IV.12. Relación entre los resultados de la PCR frente a *M. bovis* y presencia de lesiones, expresado como número de animales.

PCR frente a *Map*.

Ambas técnicas se llevaron a cabo en 39 animales, de ellos dos (5,12%) resultaron positivos a la PCR, y sólo un animal presentó lesiones, en ganglios linfáticos de la cabeza. De los 37 animales negativos a la técnica PCR 17 no presentaron lesiones histológicas. De los 20 animales con lesiones, en 9 animales se observaron lesiones en ganglios linfáticos mesentéricos, en 7 animales en ganglios linfáticos de la cabeza, en un animal en ganglios linfáticos del pulmón, en un animal en ganglios linfáticos de la cabeza y del pulmón, en un animal en ganglios linfáticos de la cabeza y mesentéricos y en un animal en ganglios

linfáticos del pulmón y mesentéricos. (Tabla IV.13.). El índice kappa fue de -0,006, lo que supone una falta de concordancia entre las dos técnicas diagnósticas.

	HISTOPATOLOGÍA		TOTAL
	+	-	
PCR +	1	1	2
PCR -	20	17	37
TOTAL	21	18	39

Tabla. IV.13. Relación entre los resultados de la PCR frente a *Map.*

PCR frente a *Maa.*

Esta técnica se llevó a cabo en 14 animales seleccionados con lesiones histopatológicas, de ellos 13 (93,33%) resultaron positivos a la PCR, 4 (30,76%) animales presentaron lesiones en ganglios linfáticos de la cabeza, 3 (23,07%) animales en ganglios linfáticos del pulmón y 6 (46,15%) animales en ganglios linfáticos mesentéricos. El animal que resulto negativo a la técnica PCR presento lesiones histológicas en ganglios linfáticos de la cabeza y del pulmón (Tabla.IV.14.).

	HISTOPATOLOGÍA		TOTAL
	+	-	
PCR +	13	0	13
PCR -	1	0	1
TOTAL	14	0	14

Tabla. IV.14. Relación entre los resultados de la PCR frente a *Maa.*

4.1.4. Relación entre la respuesta a la intradermorreacción (IDR) y el ELISA.

Tuberculosis.

Ambas técnicas se llevaron a cabo en 273 animales de los cuales 25 (9,15%) resultaron positivos a la IDR. De estos animales 8 (32%) fueron positivos a la prueba ELISA, 10 (40%) fueron dudosos y 7 animales (28%) negativos. De los 248 animales negativos a la IDR, 38 animales (15,32%) resultaron positivos a la prueba ELISA, 120 animales (48,38%) fueron dudosos al presentar un índice entre 601 y 800 y, 90 animales (36,29%) resultaron negativos a ambas pruebas (Tabla IV.15.).

Resultados

	ELISA				
	Positivos +	Dudosos +/-	Negativos -	(Dudosos/Negativos)	TOTAL
IDR +	8	10	7	17	25
IDR -	38	120	90	210	248
TOTAL	46	97	130	227	273

Tabla. IV.15. Número de animales IDR positivos y negativos al test ELISA frente a *M. bovis*.

Tomando a los animales tanto con resultado dudoso como negativos a la prueba ELISA, se observó un índice de kappa del 0,121, lo que indica una concordancia débil. Mientras que considerando conjuntamente a los animales con resultado dudoso y positivo el índice kappa fue 0,022, con una concordancia igualmente débil.

Paratuberculosis.

La prueba se realizó en 273 animales de los cuales 25 (9,15%) resultaron positivos a la IDR. De estos mismos animales, 10 (40%) animales fueron positivos a la prueba ELISA, 7 (28%) resultaron dudosos y 8 (32%) animales fueron negativos a dicha prueba. El resto de los animales (n=248) fue negativo a la IDR, de los que 16 animales (6,45%) resultaron positivos a la prueba ELISA, 56 animales (22,58%) fueron dudosos al presentar un índice entre 601 y 800 y, 176 animales (70,96%) resultaron negativos a ambas pruebas (Tabla IV.16.).

	ELISA				
	Positivos +	Dudosos +/-	Negativos -	(Dudosos/Negativos)	TOTAL
IDR +	10	7	8	15	25
IDR -	16	56	176	323	248
TOTAL	26	63	184	343	273

Tabla. IV.16. Número de animales IDR positivos y negativos al test ELISA frente a *Map*.

Tomando a los animales tanto con resultado dudoso como negativos a la prueba ELISA, el índice de kappa fue del 0,330, lo que indica una concordancia escasa. Considerando a los animales con resultado dudoso y positivo el índice kappa fue 0,181, siendo una concordancia débil.

4.1.5. Relación entre la PCR y la IDR.

Tuberculosis.

Ambas técnicas se llevaron a cabo en 228 animales de los cuales 17 animales (7,45%) resultaron positivos a la PCR frente a *M. bovis*, 21 animales (5,70%) resultaron positivos a la IDR y, 8 animales resultaron positivos para ambas técnicas, mientras que en 198 animales el resultado fue negativo para ambas técnicas (Tabla IV.17.).

	PCR		TOTAL
	Positivos	Negativos	
IDR +	8	13	21
IDR -	9	198	207
TOTAL	17	211	228

Tabla IV.17. Número de animales PCR positivos y negativos frente a *M. bovis* y a la IDR simple bovina.

Tomando la PCR como referencia, la IDR presentó un valor de sensibilidad y especificidad del 47,05% y del 93,83% respectivamente, siendo el índice kappa 0,369, lo que indica una concordancia escasa.

Paratuberculosis.

Ambas técnicas se llevaron a cabo en 228 animales de los cuales 11 animales (4,82%) resultaron positivos a la PCR frente a *Map*, 21 animales (5,70%) resultaron positivos a la IDR, 3 animales resultaron positivos para ambas técnicas, mientras que en 199 animales el resultado fue negativo tanto para PCR como para IDR (Tabla IV.18.).

	PCR		TOTAL
	Positivos	Negativos	
IDR +	3	18	21
IDR -	8	199	207
TOTAL	11	217	228

Tabla IV.18. Número de animales PCR positivos y negativos frente a *Map* y a la IDR simple bovina.

Tomando la PCR como referencia, la IDR presentó un valor de sensibilidad y especificidad del 27,27% y del 91,70% respectivamente, siendo el índice kappa 0,133, lo que indica una concordancia débil.

4.1.6. Relación entre la PCR y el ELISA

4.1.6.1. Relación entre la PCR tb y el ELISA frente a *M. bovis*.

Ambas técnicas se llevaron a cabo en 252 animales y, 18 (7,17%) resultaron positivos a la PCR. De ellos, 13 animales (72,22%) fueron positivos a la prueba ELISA, 2 (11,11%) animales resultaron dudosos y 3 (16,67%) animales fueron negativos. De los 234 animales PCR negativos, 41 (16,33%) resultaron positivos la prueba ELISA, 119 (50,85%) fueron dudosos al presentar un índice entre 601 y 800, mientras que 74 (29,48%) resultaron negativos a ambas pruebas (Tabla IV.19.).

Tomando como referencia la PCR, e incluyendo los animales con resultado dudoso en el grupo de los negativos, la prueba ELISA presentó una sensibilidad del 24,07% y una especificidad del 97,47%. El índice kappa fue de 0,284, lo que indica una concordancia débil entre las dos técnicas diagnósticas. Cuando los animales con resultado dudoso en el ELISA se consideraron positivos, la sensibilidad y especificidad fueron del 11,53% y del 97,54% respectivamente, mientras que el índice kappa fue de 0,088, lo que supone una concordancia débil.

	ELISA <i>M. bovis</i>				TOTAL
	Positivos +	Dudosos -	Negativos -	(Dudosos/Negativos)	
PCR +	13	2	3	5	18
PCR -	41	74	119	193	234
TOTAL	54	76	122	198	252

Tabla IV.19. Número y porcentaje de animales PCR (frente a *M. bovis*) positivos y negativos al test ELISA frente a *M. bovis*.

4.1.6.2. Relación entre la PCR tb y el ELISA frente a *Map.*

Ambas técnicas se llevaron a cabo en 252 animales, 18 (7,17%) resultaron positivos a la PCR, de los cuales 8 animales (44,46%) fueron positivos a la prueba ELISA, 5 (27,77%) animales resultaron dudosos y 5 (27,77%) animales fueron negativos. De los 234 animales PCR negativos, 23 (9,82%) resultaron positivos a la prueba ELISA con un índice superior a 900, 55 (23,50%) fueron dudosos al presentar un índice entre 601 y 900, mientras que 156 (66,66%) resultaron negativos a ambas pruebas (Tabla IV.20.).

El índice kappa fue de 0,260, lo que indica una concordancia escasa entre las dos técnicas diagnósticas. Cuando los animales con resultado dudoso se consideraron como positivos el índice kappa fue 0,135 (concordancia débil).

	ELISA				TOTAL
	Positivos +	Dudosos +/-	Negativos -	(Dudosos/Negativos)	
PCR +	8	5	5	10	18
PCR -	23	55	156	211	234
TOTAL	31	60	161	221	252

Tabla IV.20. Número y porcentaje de animales PCR (frente a *M. bovis*) positivos y negativos al test ELISA frente a *Map*.

4.1.6.3. Relación entre la PCR ptb y el ELISA frente a *M. bovis*.

Ambas técnicas se llevaron a cabo en 252 animales, 8 (3,17%) resultaron positivos a la PCR, de los cuales 6 animales (75%) fueron positivos a la prueba ELISA, un (25%) animal resultó dudoso y un animal (25%) negativo. De los 244 animales PCR negativos, 48 (19,67%) resultaron positivos a la prueba ELISA con un índice superior a 900, 120 (49,18%) fueron dudosos al presentar un índice entre 601 y 900, mientras que 76 (31,14%) resultaron negativos a ambas pruebas (Tabla IV.21.).

El índice kappa fue de 0,146, lo que indica una concordancia débil entre las dos técnicas diagnósticas. Cuando los animales con resultado dudoso se consideraron como positivos, el índice kappa fue de 0,017, indicando una concordancia también débil.

	ELISA				TOTAL
	Positivos+	Dudosos +/-	Negativos-	(Dudosos/Negativos)	
PCR +	6	1	1	2	8
PCR -	48	120	76	196	234
TOTAL	54	121	77	198	252

Tabla IV.21. Número y porcentaje de animales PCR (frente a *Map*) positivos y negativos al test ELISA frente a *M. bovis*.

4.1.6.4. Relación entre la PCR ptb y el ELISA frente a *Map*.

Ambas técnicas se llevaron a cabo en 252 animales, 8 (3,17%) resultaron positivos a la PCR, de los cuales 4 animales (50%) fueron positivos a la prueba ELISA, 2 (25%) animales resultaron dudosos y 2 (25%) animales negativos. De los 244 animales PCR negativos, 26 (10,65%) resultaron positivos a la prueba ELISA con un índice superior a 900, 59 (24,18%) fueron dudosos al presentar un índice entre 601 y 900, mientras que 159 (65,16%) resultaron negativos a ambas pruebas (Tabla IV.22.).

Resultados

Tomando como referencia la PCR, y considerando a los animales con resultado dudoso como negativos, la prueba ELISA presentó una sensibilidad del 13,33% y una especificidad del 98,19%, con un índice kappa de 0,169, lo que indica una concordancia débil entre las dos técnicas diagnósticas. Cuando los animales con resultado dudoso se consideraron como positivos, la sensibilidad y especificidad fueron del 6,59% y del 98,75% respectivamente, con un índice kappa de 0,067 (concordancia débil).

	ELISA				
	Positivos +	Dudosos +/-	Negativos -	(Dudosos/Negativos)	TOTAL
PCR +	4	2	2	4	8
PCR -	26	59	159	218	244
TOTAL	30	61	161	222	252

Tabla IV.22. Número de animales PCR (frente a *Map*) positivos y negativos al test ELISA frente a *Map*.

4.1.7.- Relación entre el ELISA indirecto frente a paratuberculosis y tuberculosis.

La técnica se llevó a cabo en 320 animales tanto frente a paratuberculosis como a tuberculosis; 58 animales (18,12%) resultaron positivos a tuberculosis, de los cuales 15 (25,86%) fueron positivos a la prueba ELISA frente a tuberculosis y a paratuberculosis y 43 animales (74,14%) fueron positivos solo a tuberculosis con un índice superior a 800. Mientras que 262 animales (81,87%) fueron negativos a tuberculosis, de los cuales 246 (76,87%) resultaron negativos tanto a tuberculosis como a paratuberculosis. (Tabla IV.23.).

Considerando a los animales con resultado dudoso como negativos, se obtuvo un índice kappa de 0,676, lo que indica una concordancia significativa entre tuberculosis y paratuberculosis.

	ELISA PTB +	ELISA PTB -	TOTAL
ELISA TB +	15	43	58
ELISA TB -	16	246	262
TOTAL	31	289	320

Tabla IV.23. Número de animales positivos y negativos al test ELISA frente a *M. bovis* y *Map*.

IV.5. RESULTADO DE LAS DIFERENTES TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS.

En la siguiente tabla se muestra el porcentaje de animales positivos a las diferentes técnicas diagnósticas según el grupo (municipio). No se observaron diferencias significativas.

GRUPO	%IDR	%ELISA TB	%ELISA PTB	%PCR TB	%PCR PTB
A	18,18	18,18	18,18	0	7,69
B	9,09	8,33	25	0	0
C	0	12,5	25	0	0
D	12,5	13,79	10,34	8,33	8,33
E	8,33	20	20	25	8,33
F	0	10	10	0	0
G	0	40	10	0	0
H	9,09	36,36	9,09	8,33	8,33
I	5,23	23,80	19,04	12,5	6,25
J	14,28	37,5	12,5	18,75	6,25
K	28,57	30	30	9,09	9,09
L	0	25	25	0	0
M	6,66	40	33,33	14,28	0
N	9,52	28	4	9,09	0
O	16,66	22,22	44,44	22,22	11,11
P	0	41,17	23,52	0	0
Q	6,45	18,75	15,62	3,70	3,70
R	0	33,33	25	7,69	0
S	11,62	12,76	10,63	3,70	3,70
T	14,28	71,42	28,57	0	14,28

Tabla VI. 24. Porcentaje de animales positivos a las diferentes técnicas diagnósticas

Resultados

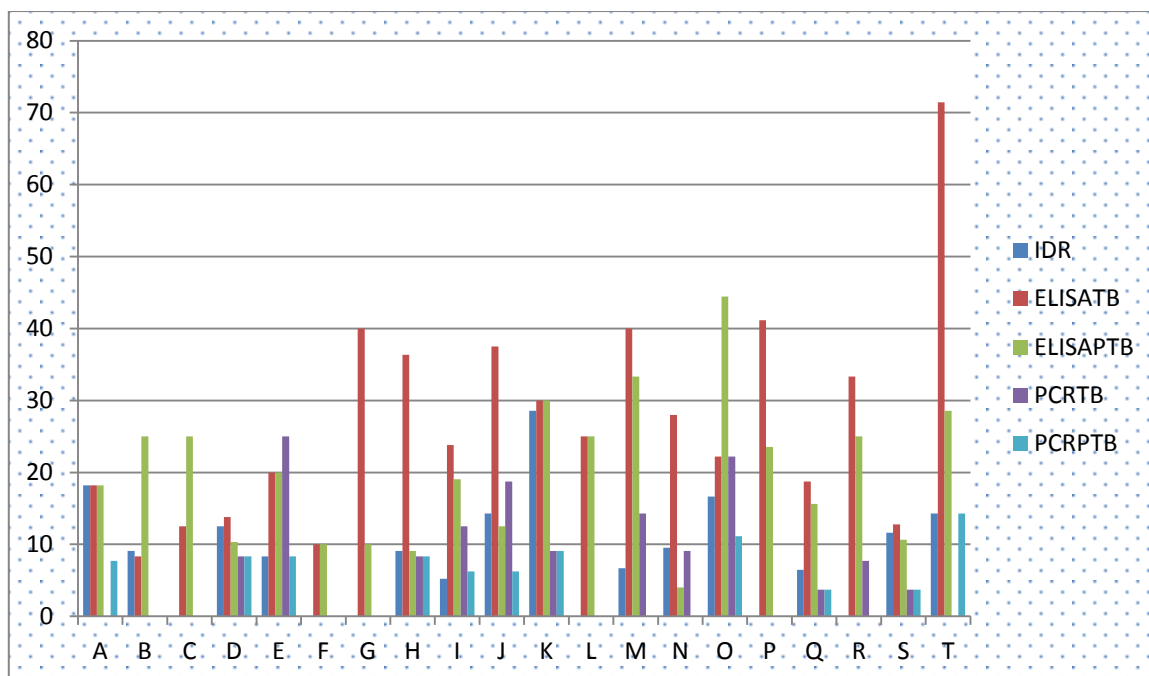


Gráfico IV.4. Porcentaje de la positividad de los grupos de animales a los que se aplicaron las diferentes técnicas diagnósticas.

5.1. Animales en los que se realizaron las diferentes técnicas diagnósticas, para tuberculosis y paratuberculosis.

En un total de 35 animales de diferentes grupos se llevaron a cabo las diferentes técnicas diagnósticas tanto para tuberculosis como para paratuberculosis. Dichos animales procedían de los 20 grupos (Tabla IV.25.).

Identif.	ELISA TB	PCR TB	IDR bovina	Loc. Anat.	ELISA PTB	PCR PTB
N5	POS.	POS.	NEG.	GLC	DUD.	NEG.
N8	NEG.	NEG.	NEG.	S/L	NEG.	NEG.
G3	POS.	NEG.	NEG.	S/L	NEG.	NEG.
I6	NEG.	POS.	NEG.	H/GLM	NEG.	NEG.
I7	DUD.	NEG.	NEG.	GLC/GLP/GLM	DUD.	NEG.
I8	NEG.	NEG.	NEG.	S/L	NEG.	NEG.
I9	DUD.	NEG.	NEG.	GLP	NEG.	NEG.
L2	NEG.	NEG.	NEG.	GLP/GLM	DUD.	NEG.
N12	NEG.	NEG.	NEG.	GLM	NEG.	NEG.
E3	DUD.	POS.	POS.	GLP	POS.	NEG.

Q11	DUD.	NEG.	POS.	S/L.	POS.	NEG.
I12	NEG.	NEG.	NEG.	GLC	NEG.	NEG.
M8	POS.	NEG.	POS.	GLC	POS.	NEG.
A4	DUD.	NEG.	NEG.	S/L	NEG.	NEG.
B5	NEG.	NEG.	NEG.	GLM	NEG.	NEG.
N15	POS.	POS.	POS.	GLC/GLM	POS.	NEG.
B7	NEG.	NEG.	NEG.	S/L	NEG.	NEG.
A5	NEG.	NEG.	NEG.	GLM	NEG.	NEG.
Q14	NEG.	NEG.	NEG.	S/L	NEG.	NEG.
D20	DUD.	NEG.	NEG.	GLM	NEG.	NEG.
C3	DUD.	NEG.	NEG.	GLC	POS.	NEG.
C4	DUD.	NEG.	NEG.	GLC	NEG.	NEG.
S39	DUD.	NEG.	NEG.	GLM	POS.	NEG.
D21	POS.	NEG.	NEG.	GLM	DUD.	NEG.
K5	POS.	POS.	POS.	S/L	POS.	NEG.
N18	DUD.	NEG.	NEG.	S/L	NEG.	NEG.
A10	POS.	NEG.	NEG.	GLC/	NEG.	NEG.
M9	POS.	POS.	NEG.	S/L	NEG.	NEG.
N20	POS.	NEG.	NEG.	GLM	DUD.	NEG.
R7	POS.	NEG.	NEG.	S/L	DUD.	NEG.
O6	POS.	POS.	NEG.	GLC	POS.	POS.
S46	POS.	POS.	NEG.	GLP	DUD.	NEG.
H10	POS.	POS.	POS.	S/L	POS.	POS.
N22	POS.	NEG.	NEG.	GLC	DUD.	NEG.
N24	POS.	NEG.	NEG.	GLM	NEG.	NEG.

Tabla. IV.25. Resultado de las diferentes técnicas diagnósticas realizada en 35 animales. IDR bovina: Intradermorreacción. Loc. Anat.: Localización anatómica de la lesión. POS: Positivo. NEG: Negativo. DUD: Dudoso. GLC: Ganglios linfáticos de la cabeza. GLP: Ganglios linfáticos del pulmón. P: Pulmón. H: Hígado. GLM: Ganglios linfáticos mesentéricos. S/L: Sin lesión.

Todos los animales, excepto cinco, fueron positivos al menos a una de las pruebas de diagnóstico empleadas.

Resultados

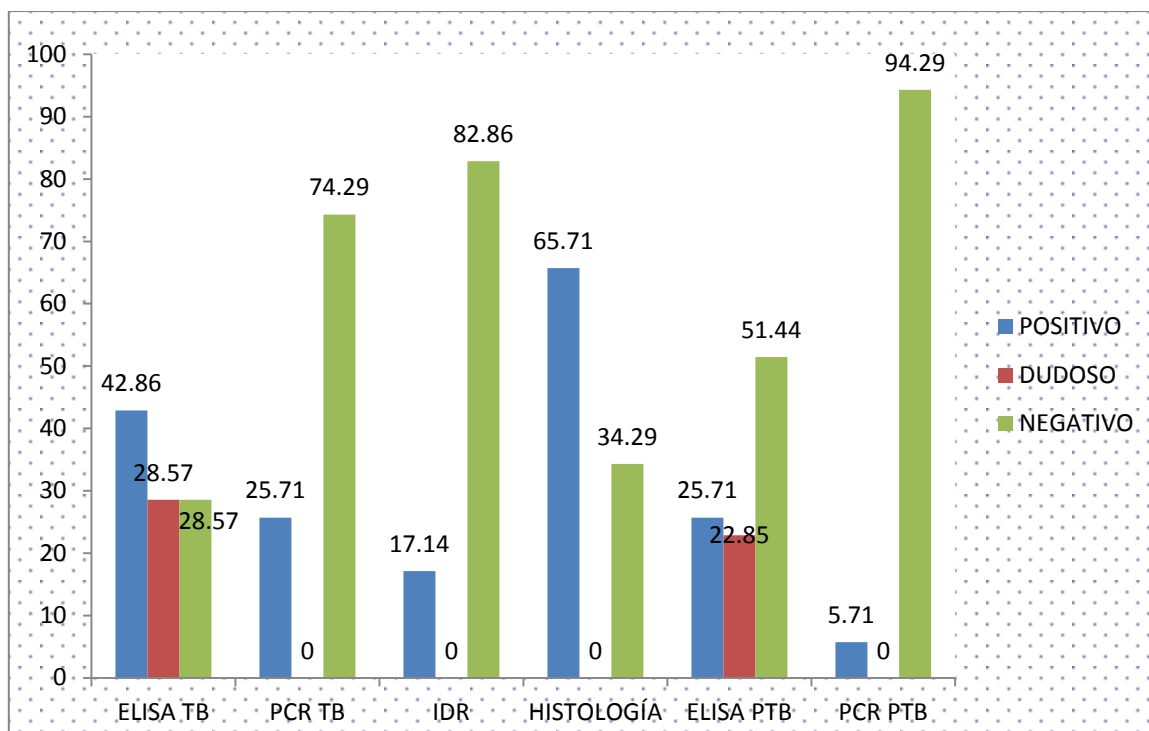


Gráfico VI.5. Resultado de las diferentes técnicas diagnósticas realizada en 35 animales, expresados como porcentaje de animales.

En la siguiente tabla se muestra una relación de todos los animales incluidos en el estudio, así como los resultados de todas las pruebas diagnósticas realizadas, incluyendo la localización anatómica de la lesión.

Identif.	Loc. de la lesión	IDR	ELISA TB	ELISA PTB	PCR TB	PCR PTB
S1	SD	SD	166	146	SD	SD
S8	SD	NEGATIVO	296	394	SD	SD
M1	GLC	NEGATIVO	424	338	SD	SD
S2	SD	NEGATIVO	573	474	SD	SD
S3	SD	NEGATIVO	714	518	SD	SD
S4	SD	NEGATIVO	378	292	SD	SD
S5	SD	NEGATIVO	719	267	SD	SD
P1	SD	NEGATIVO	345	277	SD	SD
P2	SD	NEGATIVO	481	264	SD	SD
J1	SD	NEGATIVO	377	368	SD	SD
C1	SD	NEGATIVO	418	470	SD	SD
F1	SD	NEGATIVO	376	302	SD	SD
B1	SD	NEGATIVO	291	263	SD	SD
B2	S/L	NEGATIVO	316	267	SD	SD
Q1	SD	NEGATIVO	644	485	SD	SD

N1	SD	NEGATIVO	349	467	SD	SD
S6	SD	NEGATIVO	286	229	SD	SD
N2	SD	POSITIVO	281	149	SD	SD
S7	SD	NEGATIVO	285	145	SD	SD
S8	SD	NEGATIVO	248	202	SD	SD
F2	SD	NEGATIVO	569	508	SD	SD
F3	SD	NEGATIVO	417	421	SD	SD
J2	SD	NEGATIVO	513	379	SD	SD
S9	SD	SD	325	281	SD	SD
S10	SD	SD	371	248	SD	SD
S11	SD	SD	403	219	SD	SD
Q2	SD	NEGATIVO	332	227	SD	SD
N3	P	NEGATIVO	375	199	SD	SD
I2	SD	NEGATIVO	837	819	SD	SD
P3	SD	SD	963	588	SD	SD
S12	SD	NEGATIVO	975	455	SD	SD
S13	SD	NEGATIVO	573	518	SD	SD
Q3	SD	SD	410	222	SD	SD
Q4	S/L	NEGATIVO	639	440	SD	SD
I3	GLP	NEGATIVO	647	544	SD	SD
D1	S/L	NEGATIVO	470	677	SD	SD
S14	GLP	NEGATIVO	602	217	SD	SD
S15	SD	NEGATIVO	592	406	SD	SD
S16	S/L	POSITIVO	498	369	SD	SD
S17	SD	POSITIVO	345	457	SD	SD
S18	GLP-P	NEGATIVO	618	310	SD	SD
S19	SD	NEGATIVO	554	252	SD	SD
Q5	GLC	NEGATIVO	739	363	SD	SD
S20	SD	NEGATIVO	607	737	SD	SD
D2	SD	NEGATIVO	521	329	SD	SD
M2	GLP	NEGATIVO	545	634	SD	SD
D3	SD	NEGATIVO	595	571	SD	SD
D4	SD	POSITIVO	461	403	SD	SD
D5	GLP	NEGATIVO	621	638	SD	SD
D6	S/L	NEGATIVO	633	251	SD	SD
D7	S/L	NEGATIVO	655	533	SD	SD
D8	SD	SD	481	322	SD	SD
Q6	SD	NEGATIVO	500	537	SD	SD
M3	S/L	NEGATIVO	726	663	SD	SD
D9	SD	NEGATIVO	440	470	SD	SD
D10	S/L	NEGATIVO	569	684	SD	SD
D11	S/L	NEGATIVO	656	347	SD	SD
D12	S/L	NEGATIVO	469	875	SD	SD
D13	GLC- GLP-P	NEGATIVO	667	585	SD	SD
C2	S/L	NEGATIVO	337	913	SD	SD

Resultados

D14	SD	POSITIVO	594	234	SD	SD
D15	S/L	NEGATIVO	209	685	SD	SD
I4	SD	NEGATIVO	407	178	SD	SD
D16	SD	NEGATIVO	518	451	SD	SD
I5	SD	NEGATIVO	252	252	SD	SD
D17	SD	NEGATIVO	385	385	SD	SD
D18	SD	NEGATIVO	510	510	SD	SD
D19	SD	NEGATIVO	634	661	SD	SD
S21	SD	NEGATIVO	474	572	NEGATIVO	NEGATIVO
S22	SD	NEGATIVO	765	556	NEGATIVO	NEGATIVO
S23	SD	NEGATIVO	453	398	NEGATIVO	NEGATIVO
S24	SD	NEGATIVO	630	849	NEGATIVO	NEGATIVO
S25	SD	POSITIVO	409	336	NEGATIVO	NEGATIVO
S26	SD	NEGATIVO	436	316	NEGATIVO	NEGATIVO
S27	SD	NEGATIVO	738	378	NEGATIVO	POSITIVO
E1	SD	NEGATIVO	388	261	NEGATIVO	NEGATIVO
N4	SD	NEGATIVO	677	617	NEGATIVO	NEGATIVO
N5	GLC	NEGATIVO	1033	657	POSITIVO	NEGATIVO
N6	SD	SD	394	486	NEGATIVO	NEGATIVO
N7	SD	SD	239	280	NEGATIVO	NEGATIVO
N8	S/L	NEGATIVO	278	344	NEGATIVO	NEGATIVO
S28	SD	NEGATIVO	238	154	NEGATIVO	NEGATIVO
S29	SD	NEGATIVO	143	194	NEGATIVO	NEGATIVO
S30	SD	POSITIVO	571	651	NEGATIVO	NEGATIVO
S31	SD	NEGATIVO	183	237	NEGATIVO	NEGATIVO
S32	SD	NEGATIVO	655	674	NEGATIVO	NEGATIVO
G1	SD	NEGATIVO	266	718	NEGATIVO	NEGATIVO
G2	SD	NEGATIVO	182	226	NEGATIVO	NEGATIVO
G3	S/L	NEGATIVO	823	413	NEGATIVO	NEGATIVO
K1	SD	POSITIVO	330	767	NEGATIVO	NEGATIVO
T1	SD	NEGATIVO	712	585	NEGATIVO	NEGATIVO
I6	S/L	NEGATIVO	322	455	POSITIVO	NEGATIVO
I7	GLC- GLP	NEGATIVO	622	844	NEGATIVO	NEGATIVO
I8	S/L	NEGATIVO	406	323	NEGATIVO	NEGATIVO
I9	GLP	NEGATIVO	764	462	NEGATIVO	NEGATIVO
H1	SD	SD	582	117	NEGATIVO	NEGATIVO
J3	SD	NEGATIVO	1002	628	NEGATIVO	NEGATIVO
J4	GLC- GLP	SD	683	263	NEGATIVO	NEGATIVO
I10	SD	NEGATIVO	419	234	NEGATIVO	NEGATIVO
S33	SD	NEGATIVO	583	411	NEGATIVO	NEGATIVO
S34	SD	NEGATIVO	511	606	NEGATIVO	NEGATIVO
S35	SD	NEGATIVO	568	538	NEGATIVO	NEGATIVO
E2	SD	NEGATIVO	532	318	NEGATIVO	NEGATIVO
L1	SD	NEGATIVO	163	95	NEGATIVO	NEGATIVO

L2	GLP	NEGATIVO	158	643	NEGATIVO	NEGATIVO
L3	SD	SD	864	1011	NEGATIVO	NEGATIVO
A1	SD	SD	433	546	NEGATIVO	NEGATIVO
A2	SD	SD	265	272	NEGATIVO	NEGATIVO
F4	SD	SD	701	484	NEGATIVO	NEGATIVO
O1	SD	SD	359	331	NEGATIVO	NEGATIVO
O2	SD	SD	405	782	NEGATIVO	NEGATIVO
O3	SD	POSITIVO	394	415	POSITIVO	NEGATIVO
N9	SD	NEGATIVO	158	136	NEGATIVO	NEGATIVO
N10	SD	NEGATIVO	472	188	NEGATIVO	NEGATIVO
N11	SD	NEGATIVO	288	206	NEGATIVO	NEGATIVO
N12	S/L	NEGATIVO	271	324	NEGATIVO	NEGATIVO
Q7	SD	NEGATIVO	568	869	NEGATIVO	NEGATIVO
Q8	SD	NEGATIVO	371	692	NEGATIVO	NEGATIVO
Q9	SD	NEGATIVO	234	880	NEGATIVO	NEGATIVO
S36	SD	NEGATIVO	440	314	NEGATIVO	NEGATIVO
J5	SD	NEGATIVO	665	403	NEGATIVO	NEGATIVO
J6	SD	NEGATIVO	484	369	NEGATIVO	NEGATIVO
J7	SD	NEGATIVO	332	281	NEGATIVO	NEGATIVO
E3	GLP	POSITIVO	620	1260	POSITIVO	NEGATIVO
E4	SD	NEGATIVO	304	195	NEGATIVO	NEGATIVO
E5	SD	NEGATIVO	482	480	NEGATIVO	NEGATIVO
B3	SD	NEGATIVO	656	1186	NEGATIVO	NEGATIVO
B4	SD	SD	616	605	NEGATIVO	NEGATIVO
N13	SD	NEGATIVO	477	432	NEGATIVO	NEGATIVO
N14	SD	SD	538	670	NEGATIVO	NEGATIVO
M4	SD	NEGATIVO	260	508	POSITIVO	NEGATIVO
M5	SD	NEGATIVO	798	886	NEGATIVO	NEGATIVO
Q10	SD	NEGATIVO	450	576	NEGATIVO	NEGATIVO
Q11	S/L	POSITIVO	618	975	NEGATIVO	NEGATIVO
Q12	SD	NEGATIVO	500	529	NEGATIVO	NEGATIVO
Q13	SD	NEGATIVO	600	656	NEGATIVO	NEGATIVO
I11	SD	NEGATIVO	442	579	NEGATIVO	NEGATIVO
I12	GLC	NEGATIVO	392	448	NEGATIVO	NEGATIVO
M6	SD	NEGATIVO	468	446	NEGATIVO	NEGATIVO
M7	SD	NEGATIVO	663	933	NEGATIVO	NEGATIVO
M8	GLC	POSITIVO	993	1495	NEGATIVO	NEGATIVO
K2	SD	NEGATIVO	651	609	NEGATIVO	NEGATIVO
K3	SD	POSITIVO	773	748	NEGATIVO	NEGATIVO
P4	SD	NEGATIVO	591	657	NEGATIVO	NEGATIVO
F5	SD	NEGATIVO	456	551	NEGATIVO	NEGATIVO
P5	SD	NEGATIVO	558	621	NEGATIVO	NEGATIVO
P6	SD	NEGATIVO	454	855	NEGATIVO	NEGATIVO
T2	SD	NEGATIVO	906	837	NEGATIVO	NEGATIVO
A3	SD	POSITIVO	972	927	NEGATIVO	NEGATIVO
A4	S/L	NEGATIVO	504	145	NEGATIVO	NEGATIVO

Resultados

B5	S/L	NEGATIVO	435	353	NEGATIVO	NEGATIVO
N15	GLC	POSITIVO	1108	1314	POSITIVO	NEGATIVO
B6	SD	NEGATIVO	408	175	NEGATIVO	NEGATIVO
B7	S/L	NEGATIVO	337	274	NEGATIVO	NEGATIVO
I13	SD	NEGATIVO	422	338	NEGATIVO	NEGATIVO
A5	S/L	NEGATIVO	394	449	NEGATIVO	NEGATIVO
A6	SD	NEGATIVO	507	610	NEGATIVO	NEGATIVO
S37	SD	NEGATIVO	854	795	NEGATIVO	NEGATIVO
N16	SD	NEGATIVO	354	206	NEGATIVO	NEGATIVO
Q14	S/L	NEGATIVO	336	237	NEGATIVO	NEGATIVO
D20	S/L	NEGATIVO	654	584	NEGATIVO	NEGATIVO
C3	GLC	NEGATIVO	558	939	NEGATIVO	NEGATIVO
C4	GLC	NEGATIVO	520	269	NEGATIVO	NEGATIVO
C5	SD	NEGATIVO	420	374	NEGATIVO	NEGATIVO
S38	SD	NEGATIVO	523	720	NEGATIVO	NEGATIVO
S39	S/L	NEGATIVO	741	1124	NEGATIVO	NEGATIVO
S40	SD	NEGATIVO	546	586	NEGATIVO	NEGATIVO
S41	SD	NEGATIVO	399	348	NEGATIVO	NEGATIVO
L4	SD	NEGATIVO	278	192	NEGATIVO	NEGATIVO
L5	SD	SD	56	391	NEGATIVO	NEGATIVO
H2	SD	NEGATIVO	543	387	NEGATIVO	NEGATIVO
H3	SD	NEGATIVO	538	480	NEGATIVO	NEGATIVO
B8	SD	SD	602	543	NEGATIVO	NEGATIVO
B9	SD	POSITIVO	807	934	NEGATIVO	NEGATIVO
B10	SD	NEGATIVO	343	314	NEGATIVO	NEGATIVO
Q15	SD	NEGATIVO	383	279	NEGATIVO	NEGATIVO
H4	SD	NEGATIVO	512	438	NEGATIVO	NEGATIVO
Q16	SD	NEGATIVO	840	446	NEGATIVO	NEGATIVO
Q17	SD	NEGATIVO	346	468	NEGATIVO	NEGATIVO
P7	SD	NEGATIVO	569	433	NEGATIVO	NEGATIVO
P8	SD	NEGATIVO	515	1189	NEGATIVO	NEGATIVO
P9	SD	NEGATIVO	614	339	NEGATIVO	NEGATIVO
N17	SD	SD	825	679	NEGATIVO	NEGATIVO
I14	SD	NEGATIVO	607	600	NEGATIVO	NEGATIVO
I15	SD	SD	632	370	NEGATIVO	NEGATIVO
R1	SD	SD	559	291	NEGATIVO	NEGATIVO
S42	SD	NEGATIVO	372	275	NEGATIVO	NEGATIVO
S43	SD	NEGATIVO	541	326	NEGATIVO	NEGATIVO
F6	SD	NEGATIVO	565	446	NEGATIVO	NEGATIVO
A7	SD	NEGATIVO	533	809	NEGATIVO	NEGATIVO
E6	SD	NEGATIVO	713	463	NEGATIVO	NEGATIVO
O4	S/L	SD	805	1009	NEGATIVO	NEGATIVO
Q18	SD	NEGATIVO	564	426	NEGATIVO	NEGATIVO
Q19	SD	NEGATIVO	560	457	NEGATIVO	NEGATIVO
Q20	SD	NEGATIVO	752	417	NEGATIVO	NEGATIVO
Q21	SD	POSITIVO	712	1060	NEGATIVO	NEGATIVO

Q22	SD	NEGATIVO	533	432	NEGATIVO	NEGATIVO
Q23	SD	NEGATIVO	824	547	NEGATIVO	NEGATIVO
Q24	SD	NEGATIVO	238	119	NEGATIVO	NEGATIVO
Q25	SD	NEGATIVO	740	349	POSITIVO	NEGATIVO
Q26	SD	NEGATIVO	891	508	NEGATIVO	NEGATIVO
H5	SD	NEGATIVO	804	458	NEGATIVO	NEGATIVO
H6	SD	NEGATIVO	697	292	NEGATIVO	NEGATIVO
D21	S/L	NEGATIVO	1067	806	NEGATIVO	NEGATIVO
D22	SD	NEGATIVO	824	428	NEGATIVO	NEGATIVO
J8	SD	NEGATIVO	791	510	NEGATIVO	NEGATIVO
J9	SD	NEGATIVO	650	501	NEGATIVO	NEGATIVO
J10	SD	NEGATIVO	479	418	NEGATIVO	NEGATIVO
K4	SD	NEGATIVO	401	267	NEGATIVO	NEGATIVO
P10	SD	NEGATIVO	754	546	NEGATIVO	NEGATIVO
P11	SD	NEGATIVO	779	503	NEGATIVO	NEGATIVO
K5	S/L	POSITIVO	883	957	POSITIVO	NEGATIVO
R2	SD	NEGATIVO	634	461	NEGATIVO	NEGATIVO
R3	SD	NEGATIVO	581	322	NEGATIVO	NEGATIVO
H7	SD	NEGATIVO	883	502	NEGATIVO	NEGATIVO
E7	SD	NEGATIVO	846	385	POSITIVO	NEGATIVO
O5	SD	NEGATIVO	755	614	NEGATIVO	NEGATIVO
N18	S/L	NEGATIVO	609	493	NEGATIVO	NEGATIVO
I16	SD	POSITIVO	947	1114	POSITIVO	POSITIVO
F7	SD	NEGATIVO	599	365	NEGATIVO	NEGATIVO
S44	SD	NEGATIVO	673	408	NEGATIVO	NEGATIVO
H8	SD	NEGATIVO	552	449	NEGATIVO	NEGATIVO
P12	SD	NEGATIVO	621	482	NEGATIVO	NEGATIVO
A8	SD	NEGATIVO	579	369	NEGATIVO	NEGATIVO
A9	SD	NEGATIVO	413	220	NEGATIVO	NEGATIVO
A10	GLC	NEGATIVO	1000	428	NEGATIVO	NEGATIVO
A11	SD	POSITIVO	674	266	NEGATIVO	NEGATIVO
J11	SD	SD	1089	794	POSITIVO	NEGATIVO
T3	SD	NEGATIVO	602	365	NEGATIVO	NEGATIVO
T4	SD	NEGATIVO	821	165	NEGATIVO	POSITIVO
M9	S/L	NEGATIVO	982	517	POSITIVO	NEGATIVO
M10	SD	NEGATIVO	840	236	NEGATIVO	NEGATIVO
N19	SD	POSITIVO	705	611	NEGATIVO	NEGATIVO
N20	S/L	NEGATIVO	1244	666	NEGATIVO	NEGATIVO
Q27	SD	NEGATIVO	684	287	NEGATIVO	NEGATIVO
Q28	SD	NEGATIVO	582	373	NEGATIVO	NEGATIVO
Q29	SD	NEGATIVO	481	881	NEGATIVO	POSITIVO
D23	SD	SD	242	392	NEGATIVO	NEGATIVO
F8	SD	NEGATIVO	581	1108	NEGATIVO	NEGATIVO
F9	SD	NEGATIVO	955	622	NEGATIVO	NEGATIVO
G4	SD	SD	779	1020	NEGATIVO	NEGATIVO
I17	SD	NEGATIVO	474	490	NEGATIVO	NEGATIVO

Resultados

L6	SD	NEGATIVO	508	541	NEGATIVO	NEGATIVO
L7	SD	NEGATIVO	801	876	NEGATIVO	NEGATIVO
G5	SD	SD	509	535	NEGATIVO	NEGATIVO
I18	SD	NEGATIVO	864	634	NEGATIVO	NEGATIVO
I19	SD	NEGATIVO	760	352	NEGATIVO	NEGATIVO
R4	SD	NEGATIVO	526	843	NEGATIVO	NEGATIVO
R5	SD	NEGATIVO	566	134	NEGATIVO	NEGATIVO
N21	SD	NEGATIVO	365	551	NEGATIVO	NEGATIVO
M11	SD	NEGATIVO	573	972	NEGATIVO	NEGATIVO
M12	SD	NEGATIVO	731	425	NEGATIVO	NEGATIVO
D24	SD	POSITIVO	668	738	NEGATIVO	NEGATIVO
D25	SD	SD	660	505	NEGATIVO	NEGATIVO
B11	SD	NEGATIVO	375	729	NEGATIVO	NEGATIVO
B12	SD	NEGATIVO	520	264	NEGATIVO	NEGATIVO
R6	SD	SD	746	1095	NEGATIVO	NEGATIVO
K6	SD	SD	711	1324	NEGATIVO	NEGATIVO
Q30	SD	NEGATIVO	866	1568	NEGATIVO	NEGATIVO
Q31	SD	NEGATIVO	500	380	NEGATIVO	NEGATIVO
I20	SD	NEGATIVO	672	791	NEGATIVO	NEGATIVO
I21	SD	SD	593	137	NEGATIVO	NEGATIVO
E8	SD	NEGATIVO	557	245	NEGATIVO	NEGATIVO
E9	SD	NEGATIVO	658	954	NEGATIVO	NEGATIVO
S45	SD	NEGATIVO	759	814	NEGATIVO	NEGATIVO
T5	SD	NEGATIVO	754	760	NEGATIVO	NEGATIVO
T6	SD	POSITIVO	775	643	NEGATIVO	NEGATIVO
T7	SD	NEGATIVO	798	585	NEGATIVO	NEGATIVO
R7	S/L	NEGATIVO	1050	691	NEGATIVO	NEGATIVO
R8	SD	NEGATIVO	722	815	NEGATIVO	NEGATIVO
P13	SD	NEGATIVO	750	957	NEGATIVO	NEGATIVO
K7	SD	SD	318	581	NEGATIVO	NEGATIVO
J12	SD	SD	642	885	NEGATIVO	NEGATIVO
D26	SD	SD	1343	1210	POSITIVO	POSITIVO
D27	SD	SD	798	443	NEGATIVO	NEGATIVO
M13	SD	NEGATIVO	932	1269	NEGATIVO	NEGATIVO
O6	GLC	NEGATIVO	910	1338	POSITIVO	NEGATIVO
O7	SD	NEGATIVO	746	792	NEGATIVO	NEGATIVO
R9	SD	SD	1052	721	POSITIVO	NEGATIVO
P14	SD	NEGATIVO	527	359	NEGATIVO	NEGATIVO
R10	SD	SD	504	310	NEGATIVO	NEGATIVO
R11	SD	SD	1045	542	NEGATIVO	NEGATIVO
E10	SD	NEGATIVO	794	492	NEGATIVO	NEGATIVO
S46	GLP	NEGATIVO	973	613	POSITIVO	NEGATIVO
S47	SD	NEGATIVO	1532	1703	NEGATIVO	NEGATIVO
J13	SD	POSITIVO	1080	679	POSITIVO	NEGATIVO
J14	SD	SD	951	554	NEGATIVO	NEGATIVO
H9	SD	NEGATIVO	756	425	NEGATIVO	NEGATIVO

H10	S/L	POSITIVO	1443	1209	POSITIVO	POSITIVO
M14	SD	NEGATIVO	836	648	NEGATIVO	NEGATIVO
N22	GLC	NEGATIVO	1940	723	NEGATIVO	NEGATIVO
G6	SD	NEGATIVO	866	460	NEGATIVO	NEGATIVO
G7	SD	NEGATIVO	688	552	NEGATIVO	NEGATIVO
K8	SD	SD	738	289	NEGATIVO	NEGATIVO
G8	SD	NEGATIVO	937	611	NEGATIVO	NEGATIVO
L8	SD	NEGATIVO	744	381	NEGATIVO	NEGATIVO
G9	SD	NEGATIVO	678	363	NEGATIVO	NEGATIVO
Q32	SD	SD	874	495	NEGATIVO	NEGATIVO
P15	SD	NEGATIVO	1081	729	NEGATIVO	NEGATIVO
P16	SD	NEGATIVO	777	566	NEGATIVO	NEGATIVO
D28	SD	NEGATIVO	696	364	NEGATIVO	NEGATIVO
M15	SD	NEGATIVO	700	425	NEGATIVO	NEGATIVO
D29	SD	NEGATIVO	626	412	NEGATIVO	NEGATIVO
K9	SD	NEGATIVO	807	679	NEGATIVO	POSITIVO
N23	SD	NEGATIVO	440	395	NEGATIVO	NEGATIVO
N24	S/L	NEGATIVO	975	562	NEGATIVO	NEGATIVO
N25	SD	NEGATIVO	843	620	NEGATIVO	NEGATIVO
P17	SD	NEGATIVO	825	909	NEGATIVO	NEGATIVO
R12	SD	NEGATIVO	787	464	NEGATIVO	NEGATIVO
J15	SD	NEGATIVO	839	388	NEGATIVO	NEGATIVO
C6	SD	NEGATIVO	680	326	NEGATIVO	NEGATIVO
C7	SD	SD	650	582	NEGATIVO	NEGATIVO
C8	S/L	SD	1063	668	NEGATIVO	NEGATIVO
F10	SD	NEGATIVO	179	107	NEGATIVO	NEGATIVO
O8	SD	NEGATIVO	174	111	NEGATIVO	NEGATIVO
O9	SD	NEGATIVO	136	156	NEGATIVO	NEGATIVO
J16	SD	NEGATIVO	107	179	NEGATIVO	NEGATIVO
K10	SD	SD	118	139	NEGATIVO	NEGATIVO
G10	SD	SD	158	110	NEGATIVO	NEGATIVO
H11	SD	NEGATIVO	105	103	NEGATIVO	NEGATIVO
D30	SD	NEGATIVO	SD	SD	NEGATIVO	NEGATIVO
D31	SD	NEGATIVO	SD	SD	NEGATIVO	NEGATIVO
H12	SD	NEGATIVO	SD	SD	NEGATIVO	NEGATIVO
Q33	SD	NEGATIVO	SD	SD	NEGATIVO	NEGATIVO
P18	SD	NEGATIVO	SD	SD	NEGATIVO	NEGATIVO
P19	SD	NEGATIVO	SD	SD	NEGATIVO	NEGATIVO
P20	SD	NEGATIVO	SD	SD	NEGATIVO	NEGATIVO
R13	SD	NEGATIVO	SD	SD	NEGATIVO	NEGATIVO
E11	SD	NEGATIVO	SD	SD	POSITIVO	POSITIVO
E12	SD	NEGATIVO	SD	SD	NEGATIVO	NEGATIVO
G11	SD	SD	SD	SD	NEGATIVO	NEGATIVO
G12	SD	SD	SD	SD	NEGATIVO	NEGATIVO
G13	SD	SD	SD	SD	NEGATIVO	NEGATIVO
A12	SD	NEGATIVO	SD	SD	NEGATIVO	NEGATIVO

Resultados

A13	SD	NEGATIVO	SD	SD	NEGATIVO	POSITIVO
B13	SD	NEGATIVO	SD	SD	NEGATIVO	NEGATIVO
F11	SD	NEGATIVO	SD	SD	NEGATIVO	NEGATIVO
M16	SD	SD	SD	SD	NEGATIVO	NEGATIVO
M17	SD	SD	SD	SD	NEGATIVO	NEGATIVO
K11	SD	NEGATIVO	SD	SD	NEGATIVO	NEGATIVO
J17	SD	NEGATIVO	SD	SD	NEGATIVO	NEGATIVO
J18	SD	POSITIVO	SD	SD	POSITIVO	POSITIVO
G14	SD	NEGATIVO	SD	SD	NEGATIVO	NEGATIVO

Tabla IV.26. Relación de todos los animales incluidos en el estudio, así como los resultados de todas las pruebas diagnósticas realizadas. Identif.: Identificación del animal. Loc. De la Lesión.: Localización anatómica de la lesión. IDR: prueba de intradermorreacción; P: Pulmón; GLC: Ganglio linfático de la cabeza (retrofaríngeos); GLP: Ganglio linfático del pulmón (mediastínicos); H: Hígado; GLM: Ganglio linfático mesentérico; S/L: Sin lesiones; SD: Sin datos (prueba no realizada).

V. DISCUSIÓN

“La mayor parte de los fracasos nos vienen por querer adelantar la hora de los éxitos”

Amado Nervo (1870-1919)

La tuberculosis y paratuberculosis son enfermedades crónicas de gran importancia en los rumiantes domésticos. La tuberculosis bovina es una de las enfermedades que más recursos económicos ha consumido debido las extensas campañas de control y erradicación que se han llevado a cabo en numerosos países, por sus implicaciones zoonóticas. En México sigue siendo una de las zoonosis de mayor prevalencia.

La paratuberculosis, por su impacto productivo en el ganado vacuno y posible relación con la enfermedad de Crohn es también uno de los procesos más importantes dentro de las infecciones lentas y de interés por su posible potencial zoonótico. En México la situación sobre la prevalencia de esta enfermedad en bovinos es desconocida, pero se ha comunicado que es una causa de pérdidas económicas en algunos estados [Miranda, 2005]. El trabajo presentado en esta tesis constituye la primera aportación sobre la incidencia de *Map* en bovinos sacrificados en matadero.

Manning y Collins (2001) mencionan que tanto la tuberculosis como la paratuberculosis son enfermedades que deben permanecer bajo vigilancia epidemiológica, ya que con la identificación de los animales infectados en cada explotación se puede evitar la diseminación de estos agentes. Los sistemas de vigilancia epidemiológica en mataderos poseen un valor indiscutible no sólo para detectar la presencia de tuberculosis bovina sino para mejorar las condiciones sanitarias de las explotaciones ganaderas y para una óptima comercialización de carnes y subproductos [Torres, 2010].

En el caso de la tuberculosis, la inspección *post mortem* es de gran importancia, al permitir la detección de un mayor porcentaje de animales positivos durante las campañas de saneamiento [García Castro, 2007], de forma que en países como EEUU se considera el método primario de detección de bovinos con tuberculosis [Whipple *et al.*, 1996].

Por ello, en este trabajo nos hemos planteado como principal objetivo estimar la efectividad de diferentes pruebas diagnósticas (ELISA, histopatología, PCR) de forma complementaria a la inspección *post mortem*, para el diagnóstico rápido de micobacteriosis (*M. bovis*, *Map* y *Maa*) en bovinos de matadero así como la valoración de las posibles reacciones cruzadas entre las mismas.

En nuestro estudio la prevalencia de tuberculosis observada en bovinos mayores de dos años fue del 8,99%, superior a la señalada en las Campañas de Saneamiento en nuestro país (0,5%) [SAGARPA, 2013]. Estos datos sugieren que la prevalencia de la tuberculosis en el estado de Nayarit es superior a la del resto del país; sin embargo, hay que tener en cuenta que en este estudio no se han estudiado todos los animales analizados en las campañas de erradicación de la tuberculosis, sino que fueron elegidos al azar en dos periodos de los años 2011 y 2012.

Discusión

Como ya se ha indicado, la valoración lesional *post mortem* tiene una gran importancia en la detección de animales infectados por *M. bovis*. García Castro (2007) cita una prevalencia del 3,1% de tuberculosis en un estudio de matadero, basándose en la detección de lesiones frente al 1% del resultado de las campañas de saneamiento, por lo que concluye que la inspección de matadero sería altamente eficaz en la detección de casos de tuberculosis negativos mediante la prueba de intradermorreacción en las Campañas de Saneamiento, siendo un complemento de las mismas. En nuestro estudio, si consideramos los animales donde se aplicaron ambas pruebas, encontramos que 30 (58,8%) de los 51 que fueron negativos a IDR presentaron lesiones que si bien no se puede aseverar que fueran debidas a la infección por *M. bovis*, sugieren una mayor sensibilidad del estudio lesional, con la técnica de muestreo elegida, para la detección de animales infectados.

Aunque en nuestro estudio solo se observaron lesiones macroscópicas en dos bovinos (ganglios linfáticos mediastínicos y mesentéricos), en un 56,47% de los estudiados mediante histopatología se observaron lesiones granulomatosas leves de carácter focal mayoritariamente. Respecto a su especificidad, por su morfología se podrían considerar como dudosas. Se ha sugerido que pudieran ser granulomas formados por lo que se han denominado “macrófagos basura”, agrupados para captar cuerpos extraños que pudieran haber llegado al nódulo linfático desde el intestino o las vías respiratorias [Huda y Jensen, 2003; González *et al.*, 2005]. Sin embargo, algunas lesiones similares se han observado en infecciones iniciales o latentes por *Map* [Pérez *et al.*, 1996; Moreno *et al.*, 2008] y *Maa*. [Chávez *et al.*, 2004]. Atendiendo a su extensión se clasificaron en tres tipos: 1A (51,42%), tipo 1B (37,14%) y el tipo 1C (25,71%), siendo todas ellas morfológicamente similares.

Cuando se estudió la presencia de micobacterias en dichas lesiones, los resultados obtenidos mediante la tinción de Ziehl-Neelsen en los ganglios linfáticos de 5 animales fueron negativos, coincidiendo con lo observado por otros autores en granulomas de estas características producidos por *Map* [Pérez *et al.*, 1996; Balseiro *et al.* 2003; González *et al.* 2005; Montero *et al.*, 2006] o *Maa*. [Chávez *et al.*, 2004]. En un trabajo realizado en un total de 6.972 bovinos menores de 1 año de edad sin clínica ni lesiones macroscópicas se pudieron observar lesiones en ganglios linfáticos semejantes a las descritas por nosotros en el 2,09%, todas ellas negativas mediante Ziehl-Neelsen siendo el 35% positivos en PCR a *Map*. [Moreno *et al.*, 2008], hecho que coincide parcialmente con nuestros resultados. Así mismo, Magnano *et al.* (2010) realizaron un trabajo donde compararon técnicas diagnósticas de tuberculosis porcina en dos establecimientos de cría confinada en Argentina, obteniendo resultados negativos en el 100% de las muestras mediante la tinción de Z-N, si bien los animales mostraban lesiones granulomatosas en ganglios linfáticos. En este trabajo, como en el nuestro, no se observó la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes.

Actualmente el diagnóstico etiológico de muchas enfermedades se ha enriquecido con el desarrollo de la técnica de la PCR. Para la instrumentación de esta prueba, se puede partir de cualquier muestra biológica, habiéndose demostrado una elevada sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de las micobacteriosis tanto en humanos como en bovinos [Cousins, *et al.*, 1992; Wards *et al.*, 1995; Miller *et al.*, 1999, 2000, 2002]. La aplicación de la PCR en tejidos incluidos en parafina con lesiones previamente valoradas se ha llevado ya a cabo en el diagnóstico de micobacteriosis [Jaimes *et al.*, 2008], habiendo demostrado su utilidad. Como mencionan Martínez-Vidal (2008), López-Garrido (2008) y Miller *et al.* (2002), a diferencia del cultivo bacteriológico, con la PCR se llegan a obtener resultados satisfactorios con pequeñas cantidades de bacilos presentes en la muestra, mientras que para obtener resultados en un cultivo es necesario un mayor número de bacilos y además éstos tienen que ser viables. Talbot *et al.*, (1997) y Chávez *et al.*, (2004), en México han llegado a tipificar diferentes cepas de una misma especie de micobacteria mediante técnicas de biología molecular. También Velarde *et al.* (2007) recomiendan el uso de técnicas moleculares, principalmente la PCR, y hacen referencia a que en comparación con las pruebas de tuberculina, cultivo e histopatológicas, la PCR demuestra mayor grado de confiabilidad.

Tomando como base lo señalado por Portilla (2007) cuando asegura que la PCR, como prueba complementaria a la histopatología y al aislamiento, permitiría establecer una metodología más rápida para el diagnóstico en animales infectados, en este estudio hemos llevado a cabo técnicas de PCR fundamentalmente frente al complejo *M. tuberculosis* y *Map* en muestras de tejido en las que también se llevó a cabo una valoración lesional, aunque como se ha explicado en el capítulo de material y métodos, con serias limitaciones debido al deficiente procesado de algunas muestras que impidió su examen microscópico.

En este sentido, debe tenerse en cuenta que el procesado de las muestras en cuanto a su fijación en formol e inclusión en parafina condiciona de una manera determinante la futura amplificación del ADN micobacteriano [Miller *et al.*, 2002], hecho a tener en cuenta en este estudio donde la fijación en formol duró aproximadamente una semana. Por otra parte, la existencia de un número reducido de micobacterias en las lesiones también influyen en una menor probabilidad de obtener un resultado positivo a PCR s [Ramírez *et al.*, 2006; Balseiro *et al.*, 2008].

Los resultados obtenidos en este estudio indican que un 23,07% de los bovinos con lesiones granulomatosas fue positivo a la PCR en secciones histológicas frente a *M. bovis* (complejo *M. tuberculosis*), porcentaje similar a los que no presentaron lesiones. Este hecho vendría a corroborar el carácter “dudoso” o no específico de las lesiones observadas en lo que respecta a su etiología micobacteriana. Nuestros resultados son inferiores al 93% de positividad observado por Miller *et al.* (2002) en casos con lesiones más evidentes y características de tuberculosis. Así mismo, Morales *et al.* (2005) obtuvieron resultados

Discusión

positivos en el 45,6% de las muestras sin lesiones microscópicas en el pulmón y nódulos linfáticos pulmonares y en el 60,6% de bovinos con lesiones histopatológicas sugestivas de tuberculosis. Al igual que en la PCR para el Complejo *M. tuberculosis*, la positividad a *Map* fue más baja e igual en animales con lesiones que sin lesiones histopatológicas. En el trabajo realizado por Moreno *et al.*, (2008) se detectó *Map* mediante la PCR en secciones histológicas en un 35% de casos con lesiones “focales-dudosas” similares a las observadas por nosotros, y en el 100% de las muestras de animales con lesiones multifocales y difusas. De acuerdo a estos resultados, no se puede afirmar que dichas lesiones sean debidas a una infección por *M. bovis* o *Map*, si bien tampoco puede descartarse por completo. Debe tenerse en cuenta que en otros estudios [Pérez *et al.*, 1996; González *et al.*, 2005] se ha podido incluso aislar *Map* mediante cultivo bacteriológico a partir de muestras de tejido que mostraban lesiones semejantes en ovinos y bovinos, lo que apoyaría su etiología micobacteriana.

Por otra parte, el hecho de que se hayan descrito también lesiones granulomatosas debidas a *Maa* similares a las encontradas por nosotros [Chávez *et al.*, 1994] motivó el llevar a cabo la prueba de PCR frente a esta micobacteria en algunas muestras de tejido que presentaban lesiones. De esta manera, en 15 muestras seleccionadas de 14 animales con lesiones microscópicas, 14 (13 animales) fueron positivas a PCR frente a *Maa*, mientras que solo dos lo fueron a Complejo *M. tuberculosis* (*M. bovis*) y todas negativas a *Map*, hecho que sugiere la participación de *Maa* en la génesis de dichas lesiones, así como la existencia de infecciones mixtas. Este hecho creemos que tiene gran relevancia y la existencia de bovinos infectados por *Maa* debería ser considerado en futuros estudios para valorar su posible implicación en las campañas de erradicación de la tuberculosis. Incluso debe considerarse que es posible que el número de infecciones mixtas sea más elevado que el encontrado en este estudio, ya que el número de muestras analizadas ha sido bajo y además se han utilizado protocolos diferentes de extracción, ya que mientras frente a *M. bovis* y *Map*, consistió en la congelación/descongelación descrito por Garrido (2001), en las 15 muestras seleccionadas se valoró la presencia de ADN de *Maa*, *Map* y Complejo *M. tuberculosis* empleando el kit comercial Speedtools Tissue DNA, además de emplear secciones histológicas con lesiones y no realizar “pool” de muestras como en el caso de las dos últimas (*Map* y *M. bovis*).

Con respecto a la distribución de las lesiones, en los ganglios linfáticos de la cabeza se identificaron en el 28,57% de las muestras, en los ganglios linfáticos mediastínicos en el 11,42% y en los mesentéricos en el 34,28%. García Castro (2007) observó un 14,6% de lesiones macroscópicas características de tuberculosis en los ganglios linfáticos retrofaríngeos similar a lo obtenido por Corner *et al.* (1990) (29,4%) en la misma localización y porcentaje muy inferior al 4,9% aportado por Cuezva Samaniego y de la Encina (1958). Si bien, estos autores como ya hemos mencionado, se basan principalmente en lesiones observadas macroscópicamente y claramente compatibles con tuberculosis.

El examen *post mortem* de ganglios linfáticos y pulmones en los bovinos en matadero, apoyado con estudios histológicos y bacteriológicos, se considera de gran importancia, para la identificación de animales infectados dentro de los programas de erradicación de la tuberculosis [Collins, 2006], debiendo tenerse en cuenta que las lesiones que pueden variar dependiendo del tiempo de infección, la susceptibilidad del huésped y la dosis infectiva [O'Reilly y Daborn, 1995; Pollock *et al.*, 2006]. Como se ha señalado, en nuestro estudio no se observaron lesiones características compatibles con tuberculosis, a excepción de 2 animales que tenían lesiones macroscópicas (ganglios linfáticos mediastínicos y mesentéricos) que se correspondían con focos inflamatorios piogranulomatosos en el estudio microscópico. En uno de ellos, se detectó ADN tanto de *M. bovis* como a *Maa*, mediante PCR, pudiendo estar estos agentes implicados en su génesis. Además, también se detectaron microscópicamente lesiones “focales-dudosas” en el mismo ganglio linfático, no pudiendo llevarse a cabo un diagnóstico etiológico certero de dichas lesiones.

Como ya se ha mencionado, en 36 (56,45%) animales se encontraron lesiones microscópicas, mientras que sólo 2 de ellos mostraron cambios visibles macroscópicamente, demostrando que la histopatología es un método diagnóstico eficaz para detectar y caracterizar lesiones en las micobacteriosis [Pérez *et al.*, 1996; Estrada-Chávez *et al.* 2004; Balseiro *et al.*, 2008].

Cuando se emplearon las técnicas de ELISA indirecto, en nuestro estudio el 9,68% de los animales fue positivo en ELISA frente a *Map* y el 18,12% en ELISA frente a *M. bovis*. Es de destacar que 15 animales fueron positivos a ambas pruebas, y de ellos, en tres se detectó *M. bovis* en los tejidos, y en otros tres tanto *M. bovis* como *Map*; en el resto, no se pudo poner en evidencia la existencia de infección micobacteriana. Esto, confirma la existencia de infecciones mixtas por diferentes especies de micobacterias en el mismo animal, tal y como ya se ha señalado en bovinos [Yokomiso *et al.*, 1983; González, 2003]. Por otra parte, tampoco se descarta que la positividad al ELISA indirecto, superior a la obtenida con otras pruebas como la IDR, pudiera estar asociada con infecciones por otras micobacterias aviares, ya que comparten antígenos y los empleados en estas técnicas no son completamente específicos [Van der Giessen *et al.*, 1994; Rastogi *et al.*, 2001]. El elevado grado de concordancia entre ambas pruebas diagnósticas encontrado indica que se debe tener un especial cuidado en la interpretación de estas técnicas para discriminar animales infectados por estas micobacterias, ya que su especificidad no sería demasiado elevada debido a la existencia de reacciones cruzadas, limitaciones de la técnica o los antígenos empleados.

Generalmente, la detección de anticuerpos séricos en el test ELISA se relaciona con animales que presentaron lesiones avanzadas o con una elevada presencia de bacilos en la muestra, tal y como han descrito otros autores, tanto en casos de tuberculosis como de

Discusión

paratuberculosis [Gutiérrez *et al.*, 1998; Pérez *et al.*, 1997; Balseiro *et al.*, 2008]. En nuestro estudio, en principio, no se observaron este tipo de lesiones sino solamente infiltrados granulomatosos focales por lo que, como ya se ha señalado, debería considerarse la posible existencia de reacciones cruzadas de los test serológicos frente a *Map* y *Maa*. De todas formas, tampoco puede descartarse del todo que no existieran animales con formas lesiones más difusas, clásicamente asociadas a respuestas serológicas, debido a las dificultades planteadas en el procesado de las muestras que impidieron su correcta valoración, tanto en relación con el número de animales examinados como con la calidad de las muestras estudiadas.

Igualmente, llama la atención la inexistencia de diferencias en el porcentaje de animales positivos en relación con su edad, ya que, siguiendo el modelo clásico de patogenia de las micobacteriosis, tanto en paratuberculosis como tuberculosis, el número de individuos con presencia de anticuerpos humorales se asocia a fases más avanzadas que aparecen con más frecuencia en animales mayores de 2 años [Ramírez *et al.*, 2011]. En este sentido, en un estudio llevado a cabo en dos explotaciones de vacuno lechero en España, el porcentaje de animales positivos a la misma técnica de ELISA indirecto aquí empleada se incrementaba significativamente con la edad [Mohamed Anciones *et al.*, 2013], en contradicción con lo encontrado en este estudio. Debe tenerse en cuenta que en el estudio referido se estudiaba toda la población de dos explotaciones con casos clínicos de paratuberculosis, mientras que en este trabajo son animales procedentes de diferentes granjas y localidades, sin conocer si existían casos de paratuberculosis o tuberculosis en ellas. Además, debe tenerse en cuenta el papel que pudiera jugar *Maa*, infección comprobada como presente en algunos de estos animales, en la positividad encontrada, teniendo en cuenta que las infecciones por este grupo de micobacterias raramente llegan a ocasionar cuadros clínicos graves [Chávez *et al.*, 1994] y por lo tanto es posible que no se produzca en ellas la transición hacia respuestas inmunológicas humorales en relación con la edad que se observa en tuberculosis o paratuberculosis.

Tomando como referencia la prueba de intradermorreacción, la prueba ELISA frente a *M. bovis* presentó una sensibilidad del 32% y una especificidad del 15,32% observándose una concordancia débil del 0,121, lo que sugiere que ambas técnicas deberían ser consideradas como complementarias y no sustitutivas unas de otras. Con la PCR como prueba de referencia, en el test ELISA frente a *M. bovis* se obtuvo una sensibilidad del 11,53% y una especificidad del 97,54%, y en el test ELISA de *Map* una sensibilidad y especificidad del 4% y 98,70% respectivamente. Según estos datos ambas pruebas de ELISA parecen mostrar una buena especificidad, si bien debería haberse contemplado también el papel de *Maa* en estas respuestas. Sería necesaria una buena prueba de referencia “*gold standard*” para evaluar estas técnicas, siendo quizás la combinación de varias como el cultivo, histopatología y PCR la más adecuada. Respecto a la baja sensibilidad de la técnica de ELISA (tb o ptb) con respecto a la PCR podría estar

relacionada con el tipo de infección observada, caracterizada por lesiones microscópicas focales normalmente no asociadas a respuestas serológicas evidentes, o presentar una etiología diferente.

Los valores del índice Kappa de concordancia entre la PCR con la prueba ELISA frente a *M. bovis* y la presencia de lesiones histopatológicas, fueron de $k=0,088$ y $k=-0,009$ respectivamente, mientras que para la PCR con la prueba ELISA frente a *Map* y la presencia de lesiones, los valores fueron de $k=0,067$ y $k=0,006$. En todos los casos se trata de índices de concordancia muy bajos y notablemente inferiores en comparación con los reportados por Estrada-Chávez *et al.* (2004) que obtuvieron unos valores de $k=0,44$ en relación a la prueba de la PCR y la presencia de lesiones histopatológicas compatibles con tuberculosis. Las dificultades en la valoración de lesiones en nuestro estudio y el papel que pueda jugar *Maa*, no contemplado en el trabajo reseñado, pudieran explicar estas diferencias.

En el análisis comparativo de pruebas diagnósticas para tuberculosis llevadas a cabo en este estudio, de las 275 muestras evaluadas, la prueba de IDR, permitió detectar un 2,93% de animales positivos, a diferencia de la prueba ELISA que detectó un 16,84%. [Estévez-Denaives *et al.*, 2007]. Además de considerar la procedencia múltiple de los animales, que dificultaría la aplicación del esquema patogénico de las micobacteriosis, debe considerarse que pudieran haber existido fallos en la realización de la prueba de IDR, tanto en su ejecución como en su interpretación, al considerarse incrementos de grosor cutáneos de 5 mm como positivos; posiblemente si se hubiera tomado como referencia un incremento de 4 mm, el número de animales positivos hubiera sido más elevado. Por otra parte, tampoco debe descartarse la existencia de reacciones cruzadas con otras micobacterias ya que, como se ha señalado [Paolicchi *et al.*, 2003], comparten antígenos comunes. Finalmente, a pesar de no haber encontrado evidencias lesionales de ello, tampoco puede descartarse que algunos de esos animales negativos a IDR fueran anérgicos a esta prueba, ya que aunque la IDR es considerada como un método eficaz para determinar el estado sanitario de bovinos infectados con *M. bovis* [O'Reilly y Daborn, 1995; Garro *et al.* 2011], el estado inmunitario de los animales interfiere notablemente en dicha respuesta al no detectar la infección en etapas iniciales o estadios anérgicos [O'Reilly y Daborn, 1995; Dante *et al.*, 2007].

Respecto a la presencia de la infección tuberculosa en los diferentes municipios, si bien mediante el ELISA se detectaron animales positivos en todos los, en el caso de la IDR, no se detectaron animales positivos en uno de ellos (grupo G). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que las diferencias no fueron estadísticamente significativas cuando se analizó la positividad a ambas pruebas según el municipio. Así mismo, se observó una escasa relación entre ambas pruebas.

Discusión

Los criterios diagnósticos utilizados en nuestro estudio, basados en la inspección *post-mortem*, histopatología, así como en las técnicas de ELISA y la PCR, han permitido confirmar mediante la presencia de infecciones debidas a *Map*, *M. bovis* y de *Maa* en bovinos sacrificados en matadero del estado de Nayarit. En la actualidad se desconoce la prevalencia de la infección por *Map* en México, y aún se tienen menos datos de la importancia que pudiera tener la infección por *Maa* en los bovinos del país. En cualquier caso, la positividad frente a micobacterias del grupo *M. avium* supone un impedimento para el comercio de ganado [Estévez-Denaives *et al.*, 2007] que, según nuestro estudio tiene una notable relevancia y debe ser objeto de futuros trabajos.

VIII.CONCLUSIONES

“La verdadera educación consiste en obtener lo mejor de uno mismo. ¿Qué otro libro se puede estudiar mejor que el de la humanidad?

Mahatma Gandhi (1869-1948)

1. Se confirmó la presencia de infección tuberculosa en animales negativos a la prueba de intradermorreacción simple, en el Estado de Nayarit, México, utilizando la técnica de la PCR y el test de ELISA. Así mismo, también se detectó la presencia de ADN de *Map* y *Maa* en muestras de tejido. Del primero no se tiene conocimiento de la prevalencia en Nayarit y del segundo no existen referencias conocidas de su presencia en ganado bovino en México, siendo la detección de ambas de gran importancia epidemiológica.
2. Este estudio es el primer reporte epidemiológico de la infección por *Map* en el estado de Nayarit, México. Es necesario que se realicen estudios en diferentes áreas de México para descartar o confirmar la presencia de *Map*, ya que no hay la suficiente información con respecto a bovinos.
3. Los resultados obtenidos por la PCR e histopatología indican que las técnicas cumplen con los requisitos necesarios para proporcionar un diagnóstico eficiente, en tiempo y costo, para ser consideradas como herramientas complementarias de la IDR en las Campañas de control de tuberculosis bovina y para evidenciar infecciones por otras micobacterias durante las mismas.
4. La prevalencia de la tuberculosis en animales sacrificados en matadero del estado de Nayarit osciló entre el 7,28% y el 18,12% de los individuos analizados, según la técnica empleada. Respecto a paratuberculosis, el porcentaje de positivos estaba entre el 4 y el 9,9% de los bovinos.
5. La constatación de la presencia de infecciones por micobacterias del complejo *M. tuberculosis* (*M. bovis*) y del complejo *M. avium* (*Maa* y *Map*) en bovinos de la misma región, incluso en el mismo animal, debería tenerse en consideración en el momento de planificar y realizar las campañas de saneamiento de la tuberculosis en México y en la valoración de los resultados.

IX. RESUMEN

“La educación es el pasaporte hacia el futuro, el mañana, pertenece a aquellos que se preparan para él, en el día de hoy”

Malcolm X (1925-1965)

La tuberculosis y la paratuberculosis son las dos enfermedades producidas por micobacterias de mayor importancia en el ganado bovino en todo el mundo. En México, frente a la primera se llevan a cabo campañas de control y erradicación desde hace varios años, mientras que respecto a la paratuberculosis, no existen estudios rigurosos que ofrezcan datos acerca de su prevalencia o importancia en la ganadería bovina de México. Teniendo en cuenta la importancia que la inspección *post mortem* tiene en el diagnóstico de esta enfermedades y especialmente en la confirmación de la infección tuberculosa en los animales positivos en las campañas de saneamiento, en este trabajo se ha llevado a cabo un estudio en animales sacrificados en matadero en el estado de Nayarit (México) tras haberse realizado en ellos la prueba de intradermorreacción simple (IDR) para el diagnóstico de tuberculosis, con el objetivo general de conocer la prevalencia de tuberculosis y paratuberculosis en bovinos sacrificados en matadero y de valorar la eficacia de diferentes técnicas diagnósticas para su detección. En concreto, se plantea evaluar la eficacia del diagnóstico *post mortem* mediante la evaluación histológica de muestras de tejido definidas, y comparar el comportamiento de diferentes técnicas de diagnóstico inmunológico (ELISA indirecto frente a tuberculosis o paratuberculosis, IDR), de detección de ADN micobacteriano (frente al complejo *M. bovis*, *M. avium paratuberculosis* (*Map*) o *M. avium avium* (*Maa*) y la detección de lesiones mediante técnicas histopatológicas.

Para ello se ha realizado un estudio anatomopatológico en 343 animales sacrificados en matadero, de los cuales 289 bovinos eran mayores de 2 años y 54 menores de 2 años de edad, procedentes de los 20 municipios del Estado de Nayarit, México. En todos ellos, se llevó a cabo la observación de todos los órganos, especialmente de pulmón y nódulos linfáticos relacionados, nódulos linfáticos de la cabeza, intestino y nódulos linfáticos mesentéricos.

En todos los casos (n=343) se tomaron muestras de ganglios linfáticos retrofaríngeos, mediastínicos y pulmón para la valoración de lesiones tuberculosas, y de válvula ileocecal y ganglios linfáticos mesentéricos para estudiar lesiones asociadas a la infección por *Map*. Debido a un mal procesado de las muestras, únicamente se pudo llevar a cabo la valoración lesional en 62 de estos animales. En 289 animales se había llevado a cabo la valoración de la respuesta inmune celular frente a tuberculosis mediante la prueba de IDR, empleando como antígeno PPD bovina. Esta técnica se realizó por personal capacitado por el Comité Estatal para el Fomento y Protección Pecuaria de Nayarit, S.C. En 320 bovinos se valoró la respuesta inmune humoral mediante una técnica de ELISA indirecto frente a tuberculosis y paratuberculosis, empleando como antígenos PPD bovina o el antígeno protoplasmático PPA-3 respectivamente. En 275 animales se realizaron pruebas moleculares (PCR) a partir de tejido embebido en parafina, para la identificación de la secuencia de inserción IS6110 específica de *M. bovis* y la secuencia de inserción IS900 específica de *Map*. En 14 animales, seleccionados por la presencia de lesiones, se realizó la PCR para la detección simultánea de *Maa*, *Map* y *M. bovis*.

Resumen

De los 289 animales a los que se les aplicó IDR (8,99%) se consideraron como positivos. Los animales reaccionantes aparecieron en 14 de los 20 municipios estudiados, oscilando la positividad entre el 5,26 y el 28,57%. En cuanto al ELISA frente a *M. bovis* y *Map* de las 320 muestras se confirmó el diagnóstico positivo en el 18,12% y el 9,99% respectivamente. Se encontraron animales reaccionantes en todos los municipios estudiados, pero únicamente en 8 y 6 respectivamente superaban el 25% de los reaccionantes en el ELISA de tuberculosis y paratuberculosis respectivamente, coincidiendo los valores elevados únicamente en un municipio. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de positividad entre animales menores y mayores de dos años. Las lesiones macroscópicas solo pudieron observarse en 2 de los 343 animales estudiados y consistieron en focos miliares de necrosis caseosa en nódulos linfáticos respiratorios y de la cabeza. En 35 (56,45%) de los 62 animales en los que se pudieron estudiar microscópicamente los tejidos, se encontraron lesiones granulomatosas, especialmente en los nódulos linfáticos.

Atendiendo a su extensión y características morfológicas, se consideraron en todos los casos como lesiones granulomatosas focales, que se clasificaron en tres categorías: 1A: escaso número de granulomas de pequeño tamaño cuyos macrófagos contenían abundante pigmento ceroides; 1B: granulomas de mayor tamaño con distribución multifocal; 1C: granulomas abundantes, que confluían y llegaban a ocupar amplias zonas de la región cortical. Estas lesiones fueron más abundantes en los ganglios linfáticos de la cabeza y mesentéricos. La prueba de PCR se llevó a cabo en 275 animales resultando positiva para la secuencia de inserción IS6110 en 20 (7,28%) y en 11 (4%) en la secuencia de inserción IS900 de *Map*. Respecto a *Maa*, 13 de las 14 muestras analizadas con lesiones granulomatosas fueron positivas. De ellas, solamente dos habían sido también positivas para *M. bovis*. Tomando como referencia la prueba de intradermorreacción, la prueba ELISA frente a *M. bovis* ofreció valores de sensibilidad y especificidad del 47,05% y 93,83% respectivamente, y un valor de kappa del 0,121, significando una concordancia escasa. Cuando se tomó como referencia la PCR, la sensibilidad y especificidad de la técnica IDR fue del 27,27% y 91,7% respectivamente, y de ELISA frente a tuberculosis de 24,07% y 97,47%. Respecto al ELISA de paratuberculosis, su sensibilidad fue del 13,33% y la especificidad del 98,19% respecto al PCR de *Map*. En todos los casos, la concordancia entre técnicas fue débil.

Según estos resultados, la prevalencia de la tuberculosis en animales sacrificados en matadero del estado de Nayarit osciló entre el 7,28% y el 18,12% de los individuos analizados, según la técnica empleada. Respecto a paratuberculosis, el porcentaje de positivos entre el 4 y el 9,9%, siendo el primer estudio epidemiológico de esta enfermedad llevado en Nayarit. En este trabajo, se ha demostrado la presencia de *Maa* asociada a lesiones granulomatosas en vacas de este estudio. Las técnicas de PCR e histopatología indican que ambos métodos cumplen con los requisitos necesarios para proporcionar un

diagnóstico eficiente, en tiempo y costo, para ser consideradas como herramientas complementarias de la IDR en las Campañas de control de tuberculosis bovina y para evidenciar infecciones por otras micobacterias durante las mismas. El hecho de que hayan aparecido animales con infecciones por distintas micobacterias debe tenerse en cuenta a la hora de interpretar los resultados de las campañas de saneamiento de tuberculosis.

X. SUMMARY

“Donde hay educación no hay distinción de clases”

Confucio (551 AC- 478)

Tuberculosis and paratuberculosis are two diseases produced by micobacteria of major importance in cattle worldwide. In México, control an eradication campaign was carried out on tuberculosis over the last few years, while with regard to paratuberculosis, no rigorous studies exist which offer data on the prevalence or importance in cattle in México. Taking into account the importance that post mortem inspection has on the diagnosis of these diseases and when confirming the tubercles infection in positive animals in the health campaign, a study into animals sacrificed at the state abattoir in the state of Nayarit (México) was carried out after performing skin test (IDR) on the animals with the main objective of knowing tuberculosis and paratuberculosis prevalence in cattle sacrificed at the abattoir and of assessing the effectiveness of different diagnostic techniques for their detection. It was specifically proposed to evaluate the efficiency of the *post mortem* diagnosis using the histological evaluation of defined tissue samples and to compare the behavior of different indirect diagnostical immunological techniques (ELISA to use against tuberculosis or paratuberculosis, IDR) for the detection of mycobacterial DNA (specially complex *M. bovis*, *M. avium paratuberculosis* (*Map*) or *M. avium* and the detection or lesions using histopatological techniques.

For this an anatomopathologic study was carried out on 343 animals sacrificed at the abattoir, 289 of which were more than 2 years old and 54 were less than 2 years old, all coming from municipalities in the organs, especially lung and related lymphatic nodules, lymphatic nodules of the head, intestine and mesenteric lymph nodes.

In all cases (n=343) samples were taken of retropharyngeal lymph nodes and lung to assess the tubercles lesions and the ileocecal valve and mesenteric lymph nodes to study the lesions related to the infection by *Map*. Due to bad sample processing only the lesion assessment of 62 of these animals could be carried out. The assessment of the immune cellular response, specially tuberculosis using the IDR test using bovine PPD as an antigen was carried out. This techniques was performed by capable persons in Comité Estatal para el Fomento y Protección Pecuaria de Nayarit, S.C. In 320 cattle the humoral immune response using the ELISA indirect techniques was assessed specially tuberculosis and paratuberculosis, using PPD bovine as antigens or protoplasmatic antigen PPA-3, respectively. Molecular tests (PCR) were performed on 275 animals from tissue inserted in paraffin in order to identify the insertion sequence IS6110, specific of *M. bovis* and insertion sequence IS900 specific of *Map*. In 14 animals, selected because of the presence of lesions, PCR for the simultaneous detection of *Maa*, *Map* and *M. bovis* was carried out.

IDR (8.99%), which were considered as positive was applied to 289 animals. The animals which reacted appeared in 14 of the 20 state municipalities, the positive animals varied between 5.26 and 28.57%. With regard to ELISA, specially *M. bovis* and *Map* of the 320 samples, a positive diagnosis of between 18.12% and 9.99% was confirmed. Animals which reacted were found in all the municipalities studied but only 8 and 6 respectively

Summary

exceeded 25% of those which reacted in ELISA of tuberculosis and paratuberculosis respectively, with only high values coinciding in one municipality. No significant statistical differences were observed in the percentage of positive animals younger or older than two years. The macroscopic lesions could only be observed in 2 of the 342 animals studied and they consisted of milliard focuses of caseous necrosis in respiratory lymphatic nodules and of the head. In 35 (56.45%) of the 62 animals, where the tissues could be microscopically studied, granulomatous lesions were found in the lymphatic nodules. Paying attention to their extension and morphological characteristics, they were, in all cases considered as granulomatous focal lesions which were classified into three categories: 1A: Scarce number of small-sized granulomas whose macrophage contain abundant ceroid pigments; 1B: large-sized granulomas with a multi-focal distribution; 1C: abundant granulomas which join together and occupy large areas in the cortical region. These lesions were more abundant in the lymphatic nodes of the head and mesenteric. The PCR tests was performed on 275 animals being positive for the IS6110 insertion sequence in 20 (7.28%) and in 11 (4%) in the IS900 insertion sequence of *Map*. With regard to *Maa*, 13 of the 14 samples analyzed with granulomatous lesions were positive, only two of the were also positive for *M. bovis*. Taking the skin tests as a reference, the ELISA tests especially *M. bovis* showed sensitivity and specificity values of 47.05% and 95.83% respectively, and a kappa value of 0.121, signifying a scarce concordance. When PCR was taken as a reference, sensitivity and specificity of the IDR technique was 27.27% and 91.7% respectively and of ELISA especially tuberculosis of 24.07% and 97.47%. With regard to ELISA of paratuberculosis, sensitivity was 13.33% and specificity 98.19% with regard to PCR of *Map*. Concordance between the techniques was weak in all cases.

According to the results, tuberculosis prevalence in the animals sacrificed at the abattoir in the State of Nayarit varied between 7.28% and 18.12% of the animals, depending on the techniques used. With regard to paratuberculosis, the percentage of the positive ones were between 4 and 9.9%, this being the first epidemiology study of this disease carried out in Nayarit. The presence of *Maa* associated to granulomatous lesions has been shown in this study. The PCR and histopathological techniques indicate that both methods comply with the requisites needed to give an efficient diagnosis, in time and cost, to be considered as complementary tools of IDR in cattle tuberculosis control campaign and to show infections by other micobacteria in the same campaigns. The fact that animals have appeared with infections by different micobacteria should be taken into account when interpreting the results of the health campaigns on tuberculosis.

XII. BIBLIOGRAFÍA

“Educación es lo que queda después de olvidar lo que se ha aprendido en la escuela”

Albert Einstein (1879-1955)

- Ábalos, P.** (2001). Actualidad en tuberculosis. En línea consultado: 20 de Marzo de 2011. www.tecnovet.uchile.cl/CDA/tecnovet_articulo_
- Ábalos, P.** y Retamal, P. (2004). Tuberculosis: ¿Una zoonosis re-emergente? *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 23 (2): 583-594.
- Abdala, A** y Tarabla, H. (2007). Tuberculosis Bovina ¿A qué nos enfrentamos? *Revista del Toráx.* 8: 13-15.
- Ácha, P.N.** y Szyfres, B. (2001). Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 3ª edición. Vol. I. *Bacteriosis y Micosis. Organización Panamericana de la Salud.*
- Acosta, B.;** Real, F.; León, L.; Deniz, S.; Ferrer, O.; Rosario, I. y Ramírez, A. (2000). ELISA for anti-MPB70: an option for the diagnosis of goat tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*. *Aust. Vet. J.* 78: 423-424.
- Acosta-Salinas, R.;** Estrada-Chávez, C. y Milián-Suazo, F. (2009). Tipificación de cepas de *Mycobacterium bovis*. Revisión. *Téc. Pecu. Méx.* 47: 389-412.
- Adúriz, J.J.;** Juste, R.A. y Saéz de Ócariz, C. (1994). An epidemiologic study of sheep paratuberculosis in the Basque Country of Spain: serology and productive data. En: Chiodini, R.J.; Collins, M.T. Bassey, E.O.E. *Proc 4th Int. Coll. PTBC. IAP.* Providence. EEUU. pp: 19-26.
- Adúriz, J.J.;** Juste, R.A. y Cortabarría, N. (1995). Lack of mycobactin dependence of micobacteria isolated on Middlebrook 7H11 from clinical cases of ovine paatuberculosis. *Vet. Microbiol.* 45: 211-217.
- Adúriz, G.;** Juste, R.A.; Garrido, J.M. y Geijo, M.V. (2000). Epidemiología y control de la paratuberculosis bovina. En: Juste editor. Paratuberculosis. Bovis, *Aula Veterinaria*, 93: 63-93. España.
- Alfaro, C.;** De Rojo, M.; Clavijo, A. y Valle, A. (2006). Caracterización de la Paratuberculosis bovina en ganado doble propósito de los llanos de Monagas, Venezuela. *Zootecnia Trop.* 24: 321-332.
- Allen, W.M.;** Berrett, S. y Patterson, D.S. (1974). A biochemical study of experimental Johné's disease I. plasma protein leakage into the intestine of sheep. *J. Comp. Pathol.* 84: 381-384.
- Aller, B.;** Fernández Diez, M. y Escudero Diez, A. (1973). Paratuberculosis ovina. *Supl. Cient. Bol. Inf. Consejo Gral. Col. Vet. España.* 196: 11-18.
- Amadori, M.;** Lyashchenko, K.P.; Gennaro, M.L.; Pollock, J.M. y Zerbini, I. (2002). Use of recombinant proteins in antibody tests for bovine tuberculosis. *Vet. Microbiol.* 85: 379-389.
- Ando, M.** y Dannenberg, A.M. (1972). Macrophage accumulation, division, maturation, and digestive and microbicidal capacities in tuberculous lesions. IV. Macrophage turnover, lysosomal enzymes, and division in healing lesions. *Lab. Invest.* 27: 466-472.
- Angus, K.W.** (1990). Intestinal lesions resembling paratuberculosis in a wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *J. Comp. Path.* 103: 101-105.
- Aranaz, A.;** De Juan, L.; Montero, N.; Sánchez, C.; Galka, M.; Delso, C.; Álvarez, J.; Romero, B.; Bezos, J.; Vela, A.I.; Briones, V.; Mateos, A. y Domínguez, L. (2004). Bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in wildlife in Spain. *J. Clin. Microbiol.* 42: 2602-2608.
- Araujo, Z.;** Acosta, M.; Escobar, H.; Baños, R.; Fernández de Larrea, C. y Rivas-Santiago, B. (2008). Respuesta inmunitaria en tuberculosis y el papel de los antígenos de secreción de *Mycobacterium tuberculosis* en la protección, patología y diagnóstico. Revisión. *Invest. Clin.* 49(3): 411-441.

Bibliografía

- Arcelles, P.M.**; Delgado, C.A.; Alzamora, P.C.; Manchego, S.A. y Gavidia, C.C. (2005). Prevalencia de tuberculosis bovina en el distrito de Végueta, Huaura. *Rev. Inv. Vet. Perú.* 16: 154-157.
- Arellano-Reynoso, B.**; Ramírez-Casillas, I.C.; Díaz-Aparicio, E.; Valero-Elionzo, G. y Santillán-Flores, M.A. (1999). Diagnóstico de tuberculosis en hatos de caprinos empleando la prueba intradérmica doble comparativa y cultivo bacteriológico. *Tec. Pecu. Méx.* 37: 55-58.
- Ayele, W.Y.**; Machackova, M. y Pávlík, I. (2001). The transmission and impact of paratuberculosis infection in domestic and wild ruminants. *Vet. Med. Czech.* 46: 205-224.
- Badiola, J.J.**; García de Jalón, J.A. y Cuervo, L. (1979). Paratuberculosis ovina. *An. Fac. Vet. Zaragoza.* XIV-XV: 299:308.
- Balseiro, A.M.** (2004). Paratuberculosis bovina: valoración de las reacciones cruzadas con la prueba de la tuberculina, evaluación de técnicas diagnósticas y prevalencia en Asturias. *Tesis Doctoral.* Universidad de León.
- Balseiro, A.**; Prieto, J.M.; Espí, A.; Pérez, V. y García-Marín, J.F. (2003). Presence of focal and multifocal paratuberculosis lesions in mesenteric lymph nodes and ileocaecal valve of cattle positive to the tuberculin skin test. *Vet. J.* 166: 210-212.
- Balseiro, A.**; García-Marín, J.F.; Solano, P.; Garrido, J.M. y Prieto, J.M. (2008). Histopathological classification of lesions observed in natural cases of paratuberculosis in free-ranging fallow deer (*Dama dama*). *J. Comp. Path.* 138: 180-188.
- Balseiro, A.**; González-Quirós, P.; Rodríguez, Ó.; Francisca Copano, M.; Merediz, I.; de Juan, L.; Chambers M.A.; Delahay, R.J.; Marreros, N.; Royo, L.J.; Bezos, J.; Prieto, J.M. y Gortázar, C. (2013). Spatial relationships between Eurasian badgers (*Meles meles*) and cattle infected with *Mycobacterium bovis* in Northern Spain. *Vet. J.* 197(3): 739-745.
- Band, H.**; Panchamoorthy, G.; Mclean, J.; Morita, C.T.; Ishikawa, S.; Modlin, R. y Brenner, M.B. (1991). Recognition of mycobacterial antigens by gd T cells. 33rd *Forum in Immunology.* 645-651.
- Bang, B.** (1906). Chronische psuedotuberkuloese darmentzuendung beim rinde. *Berl. Tieraerztl. Wschr.* 42: 759-763.
- Bannantine, J.P.** y Stabel, J.R. (2002). Killing of *Mycobacterium avium* subspecie *paratuberculosis* within macrophages. *BMC Microbiology.* 2: 2.
- Bannantine, J.P.**; Paustian, M.L.; Waters, W.R.; Stabel, J.R.; Palmer, M.V.; Lingling, L. y Kapur, V. (2008). Profiling bovine antibody responses to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection by using protein arrays. *Infect. Immun.* 76: 739-749.
- Barker, I.K.**; Dreumel, A.A. y Palmer, N. (1993). The alimentary system. In: Pathology of domestic animals. Jubb, K.V.F.; Kennedy, P.C.; Palmer, N. *Academic press.* 2: 247-252- *Londres, Reino Unido.*
- Barrón, H.**; Monteghirfo, M. y Rivera, N. (2006). Diagnóstico molecular de *Mycobacterium tuberculosis* en biopsias pleurales embebidas en parafina. *An. Fac. Med. Lima.* 67: 11-18.
- Bauerfeind, R.**; Benazzi, S.; Weiss, R.; Schliesser, T.; Willems, H. y Baljer, G. (1996). Molecular characterization of *Mycobacterium paratuberculosis* isolates from sheep, goats and cattle by hybridization with a AND probe to insertion element IS900. *J. Clin. Microbiol.* 34: 1617-1621.
- Baver, J.**; Thomesen, V.O.; Poulsen, S. y Andersen, A.B. (1997). False-positive results from cultures of *Mycobacterium tuberculosis* due to laboratory cross-contamination confirmed by restriction fragment length polymorphism. *Vet. Microbiol.* 35: 988-991.

- Beach-Nielsen, S.;** Jorgensen, J.B.; Ahrens, P. y Feld, N.C. (1992). Diagnostic accuracy of a *Mycobacterium phlei* absorbed serum enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of bovine paratuberculosis in dairy cows. *J. Clin. Microbiol.* 30: 613-618.
- Beach-Nielsen, S.;** Shulaw, W.P.; Frandsen, P.L.; Jorgensen, J.B.; Ahrens, P. y Feld, N.C. (1993). Use of a dot enzyme-linked immunosorbent assay on absorbed sera for the diagnosis of bovine paratuberculosis. *Res. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 12: 617-627.
- Beard, P.M.;** Daniels, M.J.; Henderson, D.; Pirie, A.; Rudge, K.; Buxton, D.; Rhid, S.; Greig, A.; Hutchings, M.R.; McKendrick, I.; Stevenson, K. y Sharp, J.M. (2001). Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland. *J. Clin. Microbiol.* 39: 1517-1521.
- Beer, J.** (1981) Enfermedades infecciosas de los animales domésticos. *Tomo II. p. 229-249. Ed. Acribia. España.*
- Belknap, E.B.;** Getzy, D.M.; Johnson, L.W.; Ellis, R.P.; Thompson, G.L. y Shulaw, W.P. (1994). *Mycobacterium paratuberculosis* infection in two llamas. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 204: 1805-1808.
- Bendixen, P.H.** (1978). Immunological reactions caused by infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. A review. *Nord. Vet. Med.* 30: 163-168.
- Bendixen, P.H.;** Bloch, B. y Berg-Jorgensen, J. (1981). Lack of intracellular degradation of *Mycobacterium paratuberculosis* by bovine macrophages infected *in vitro* and *in vivo*: light microscopic and electron microscopic observations. *Am. J. Vet. Res.* 42: 109-113.
- Bengis, R.G.;** Kriek, N.P.J.; Keet, D.F.; Raath, J.P.; De Vos, V. y Huchzermeyer, H. (1996). An outbreak of tuberculosis in a free-living African buffalo (*Syncerus Caffer SPARRMAN*) population in the Kruger National Park: a preliminary report. *Onderstepoort. J. Vet. Res.* 63: 15-18.
- Berger, S.;** Dominik, H.; Bannantine, J.P. y Griffin, J.F. (2006). Isolation of high-affinity-single-chain antibodies against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* surface proteins from sheep with Johne's disease. *Clin. Vacc. Immunol.* 13: 1022-1029.
- Bergey, D.H.;** Harrison, F.C.; Breed, R.S.; Hammer, B.W. y Huntoon, F.M. (1923). En: *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Ed. Williams and Wilkins, 1st ed. Baltimore, E.E.U.U.
- Bergmann, J.S.;** Keatin, W.E. y Woods, G.L. (2000). Clinical evaluation of the BDProbeTec ET system for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 38: 863-865.
- Bernardelli, A.;** Cicuta, M.E.; Nicola, A.; Roibón, W.R.; Boehringer, S.I.; Benítez, M.C.; Barceló, M.C.; Alonso, B.; Alonso, Z.; Schneider, M.; Zumárraga, M. y Estéves, M.J. (2002). Paratuberculosis ovina en Corrientes, Argentina. En línea consultado: 26 de enero 2011. [www. Une.edu.ar/Web/cyt/cyt/2002/04-Veterinarias/V-058.pdf](http://www.Une.edu.ar/Web/cyt/cyt/2002/04-Veterinarias/V-058.pdf)
- Bernabé, A.;** Gómez, M.A.; Navarro, J.A.; Gómez, S.; Sanchéz, J.; Sidrach, J. y Menchén, V. (1991). Pathological changes of spontaneous dual infection of tuberculosis and paratuberculosis in goats. *Small Rumin. Res.* 5: 377-390.
- Beyerbach, M.;** Rehm, T.; Kreienbrock, L. y Gerlach, G.F. (2001). Eradication of paratuberculosis in dairy herds: determination of the initial herd prevalence and modelling of prevalence development. *Dtsch.Tierarztl.Wochenschr.* 108: 291-6.
- Billman-Jacobe, Carrigan, M.;** Cockram, F.; Corne, L.A.; Gill, I.J.; Hill, J.F.; Jessep, T.; Milner, A.R. y Wood, P.R. (1992). A comparison of the interferon gamma test assay with the absorbed ELISA for the diagnosis of Johne's disease in cattle. *Aus. Vet. J.* 69: 25-28.

Bibliografía

- Blaha, T.** (1995). Epidemiología especial veterinaria. *Acribia*. 164-172. España.
- Blood, D.C.;** Radostits, O.M.; Arundel, J.H. y Gay, C.C. (1989). Paratuberculosis (John's disease). En: *Vet. med. Balliére and Tindall*. 722-729. Londres, Reino Unido.
- Boelaert, F.;** Walravens, K.; Biront, P. y Berkvens, D. (2008). Prevalence of paratuberculosis (Johne's disease) in the Belgian cattle population. *Vet. Microbiol.* 77: 269-281.
- Bölske, G.;** Englund, S.; Johansson, K.E. y Königsson, M.H. (2002). False positive *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* IS900 PCR and its diagnostic implications. *Proc. VII Int. Coll. PTBC*. 261-266. Bilbao, España.
- Bourne, F.J.;** Donnelly, C.; Cox, D.; Gettinby, G.; McInerney, J.; Morrison, I. y Woodroffe, R. (2007). Bovine TB: The Scientific evidence, a science base for a sustainable policy to control TB in cattle, an epidemiological investigation into bovine tuberculosis. Final report of the independent scientific group on cattle TB. *Department for environment, Food and rural affairs*.
- Bouvier, G.;** Burgisser, H. y Schneider. (1957). Observations sur les maladies du gibier, des oiseaux et des poisons faites en 1955 et 1956. *Schweiz Arch. Tierheilk. D.* 99: 461-477. Citado por: Morris, R.S., Pfeiffer, D.U. y Jackson, R. (1994). The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. *Vet. Microbiol.* 40:153-177.
- Brady, C.;** Grady, D.; O'Meara, F.; Egan, J. y Bassett, H. (2008). Relationships between clinical signs, pathological changes and tissue distribution of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in 21 cows from herds affected by Johne's disease. *Vet. Rec.* 162: 147-152.
- Brees, D.J.;** Reimer, S.B.; Cheville, N.F.; Florance, A. Y Thoen, C.O. (2000). Immunohistochemical detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in formalin-fixed, paraffin-embedded bovine tissue sections. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12: 60-63.
- Brodbeck, W.G. y** Anderson, J.M. (2009). Giant cell formation and function. *Curr. Opin. Hematol.* 16(1): 53-57.
- Brown, A.E.;** Holzer, T.J. y Andersen, B.R. (1987). Capacity of human neutrophils to kill *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Infect. Dis.* 156: 985-989.
- Brown, C.C.;** Barker, D.C. y Barker, I.K. (2007). The alimentary system paratuberculosis (Johne's disease). En: Jubb, K.V.F.; Kennedy, P.C.; Palmer, N. *Pathology of domestic animals*. 5th ed. Elsevier Saunders. Londres, Reino Unido. 2: pp. 222-225.
- Brown, W.H. y** Hernández de Anda, J. (1998). Tuberculosis in adult beef cattle of Mexican origin shipped direct-to-slaughter into Texas. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 212: 557-559.
- Brumbaugh, G.W.;** Edwards, J.F.; Roussel, A.J. Jr. y Thomson, T.D. (2000). Effect of monensin sodium on histological lesions of naturally occurring bovine tuberculosis. *J. Comp. Pathol.* 123: 22-28.
- Buddle, B.M.;** Aldwel, F.F.; Pfeffer, A.; De Lisle, G.W. y Corner, L.A. (1994). Experimental *Mycobacterium bovis* infection of cattle- effect of dose of *Mycobacterium bovis* and pregnancy on immune responses and distributions of lesions. *N. Z. Vet. J.* 42: 167-172.
- Buddle, B.M.;** de Lisle, G.W.; Pfeffer, A. y Aldwel, F.F. (1995). Immunological response and protection against *Mycobacterium bovis* in calves vaccinated with a low dose of BCG. *Vaccine*. 13: 1123- 30.
- Buddle, B.M.;** Pollock, J.M.; Skinner, M.A. y Wedlock, N. (2003). Development of vaccines to control bovine tuberculosis in cattle and relationship to vaccine development for other intracellular pathogens. *Int. J. Parasitol.* 33: 555-566.

- Buergelt, C.D.**; Hall, C.; Mc Entee, K. y Duncan, J.R. (1978). Pathological evaluation of paratuberculosis in naturally infected cattle. *Vet Path.* 39: 591-595.
- Buergelt, C.D.** y Williams, J.E. (2004). Nested PCR on blood and milk for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* DNA in clinical and subclinical bovine paratuberculosis. *Aust. Vet. J.* 82(8): 497-503.
- Buergelt, C.D.** y Ginn, P.E. (2000). The histopathologic diagnosis of subclinical Johne's disease in North American bison (*Bison bison*). *Vet. Microbiol.* 77: 325-331.
- Bulaga, L.L.** y Collins, M.T. (1999). U.S. voluntary Johne's disease herd status program for cattle. *Proc. VI Int. Coll. PTBC.* 39-47.
- Bull, T.J.**; Hermon-Taylor, J.; Pávlík, I.; El-Zaatari, F. y Tizard, M. (2000). Characterization of IS900 oci in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and development of multiplex PCR typing. *Microbiology.* 146: 2185-2197.
- Burrells, C.**; Inglis, N.F.; Davies, R.C. y Sharp, J.M. (1995). Detection of specific T cell reactivity in sheep infected with *Mycobacterium avium* subspecies *silvaticum* and *paratuberculosis* using two defined mycobacterial antigens. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 45: 311-320.
- Burrells, C.**; Clarke, C.J.; Colston, A.; Kay, J.M.; Porter, J.; Little, D. y Sharp, J.M. (1998). A study of responses of sheep clinically-affected with paratuberculosis (Johne's disease). The relationship of blood, mesenteric lymph node and intestinal lymphocyte responses to gross and microscopic pathology. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 66: 343-358.
- Caffrey, J.P.** (1994). Status of bovine tuberculosis eradication programs in Europe. *Vet. Microbiol.* 40: 1-4.
- Calderón, J.** y Gongóra, O.A. (2008). Similitudes clinicopatológicas entre paratuberculosis y enfermedad de Crohn. ¿Posible vínculo zoonótico?. *Rev. MVZ Córdoba.* 13: 1226-1239.
- Carrigan, M.J.** y Seaman, J.T. (1990). The pathology of Johne's diseases in sheep. *Aust. Vet. J.* 67: 47-50.
- Castillo, M.O.**; Martínez, B.J.; Solano, T.D.; Velásquez, Z.A.; De la Cruz, H.N.; Campuzano, G.J.; Acosta, M.F.; Snydellar, H.A.; Almazán, G.C.C. y Ramos, V.J. (2010). Estandarización de la técnica de inmunohistoquímica para el diagnóstico de tuberculosis bovina en Tamaulipas. En línea consultado: el 13 de Mayo del 2010. <http://www.cotacyt.gob.mx/congreso/memoria/fscommand/agropecuaria/ana.pdf>
- Centers for Diseases Control and Prevention.** (2005). Human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* infections, New York City, 2001-2004. *MMWR.* 54: 605-608.
- Challans, J.A.**; Stevenson, K.; Reid, H.W. y Sharp, J.M. (1994). A rapid method for the extraction and detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from clinical specimens. *Vet. Rec.* 134: 95-96.
- Chaussé, P.** (1913). Des méthodes á employer pour réaliser la tuberculose expérimentale par inhalation. *Bull. Soc. Med. Vet.* 31: 267-274. Citado por: O'Reilly, L.M. y Daborn, C.J. (1995). The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tubercle Lung Dis.* 76: 1-46.
- Chávez, G.** (2005). Control de la paratuberculosis en ovinos y caprinos. En línea consultado: 12 de mayo 2011. www.conasamexico.org/mesa4Introduccion.
- Chávez, G.G.**; Trigo, T.F.J.; Svastova, P. e Ivo, P. (2004). Identificación del polimorfismo genético de aislamientos de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* de caprinos del centro de México. *Vet. Méx.* 35(1).

Bibliografía

- Chedore, P.** y Jamieson, F.B. (1999). Routine use of Gen-Probe MTD2 amplification test for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens in a large public health mycobacteriology laboratory. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 35: 185-191.
- Chevillat, N.F.;** Hostetter, J.; Thomsen, B.V.; Simutis, F.; Vanloubbeeck, Y. y Steadham, E. (2001). Intracellular trafficking of *Mycobacterium avium* ss. *paratuberculosis* in macrophages. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 108: 236-243.
- Chiodini, R.J.** y Van Kruiningen, H.J. (1983). Eastern white-tailed deer as a reservoir of ruminant paratuberculosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 182: 168-169.
- Chiodini, R.J.;** Van Kruiningen, H.J. y Merkal, R.S. (1984). Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): The current status and future prospects. *Cornell Vet.* 74: 218-262.
- Chiodini, R.J.** y Van Kruiningen, H.J. (1985). Characterization of *Mycobacterium paratuberculosis* of bovine, caprine, and ovine origin by gas-liquid chromatographic analysis of fatty acids in whole cell extracts. *Am. J. Vet. Res.* 46: 1980-1989.
- Chiodini, R.J.** y Van Kruiningen, H.J. (1986). The prevalence of paratuberculosis in culled New England cattle. *Cornell. Vet.* 76: 91-104.
- Chiodini, R.J.** (1989). Crohn's disease and the mycobacterioses: a review and comparison of two disease entities. *J. Clin. Microbiol.* 2: 90-117.
- Cicuta, M.E.;** Boehringer, S.I.; Roibón, W.R.; Benítez, M.C. y Barceló, M.C. (2003) Validez de la prueba tuberculínica para el diagnóstico de paratuberculosis ovina. Universidad Nacional del Nordeste. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas.* Resumen V-016.
- Clarke, C.J.** (1994). Host responses to *Mycobacterium paratuberculosis*/*M. avium* infection. *Proc. IV Int. Ass. PTBC.* 345-354.
- Clarke, C.J.** (1997). The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *J. Comp. Path.* 116: 217-261.
- Clarke, C.J.** y Little, D. (1996). The pathology of ovine paratuberculosis: gross and histological changes in the intestine and other tissues. *J. Comp. Pathol.* 114: 419-437.
- Clarke, C.J.;** Patterson, I.A.; Armstrong, K.E. y Low, J.C. (1996). Comparison of the absorbed ELISA and agar gel immunodiffusion test with clinicopathological findings in ovine clinical paratuberculosis. *Vet. Rec.* 139: 618-621.
- Clifton-Hadley, R.S.** y Wilesmith, J.W. (1991). Tuberculosis in deer: a review. *Vet. Rec.* 129: 5-12.
- Cocito, C.;** Gilot, P.; Coene, M.; Kesel, M.; Pouspart, P. y Vannuffel, P. (1994). Paratuberculosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 7: 328-344.
- Coetsier, C.;** Havaux, X.; Mattelard, F.; Sadatte, S.; Cormont, F.; Buerquelt, K.; Limbourg, B.; Latinne, D.; Bazin, H.; Deneff, J.F. y Cocito, C. (1998). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in infected tissues by new species-specific immunohistological procedures. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5: 446-451.
- Coetsier, C.;** Vannuffel, P.; Blondeel, N.; Deneff, J.F.; Cocito, C. y Gala, J.L. (2000). Duplex PCR for differential identification of *Mycobacterium bovis*, *M. avium* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis* in formalin-fixed paraffin-embedded tissues from cattle. *J. Clin. Microbiol.* 38: 3048-3054.

- Coetsier, C.;** Vannuffel, P.; Blondeel, N.; Deneff, J.F.; Cocito, C. y Gala, J.L. (2001). Duplex PCR for differential identification of *Mycobacterium bovis*, *M. avium* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis* in formalin-fixed paraffin-embedded tissues from cattle. *J. Clin. Microbiol.* 32: 2048-2054.
- Colgrove, G.S.;** Thoen, C.O.; Blackburn, B.O. y Murphy, C.D. (1989). Paratuberculosis in cattle: a comparison of three serologic tests with results of fecal culture. *Vet. Microbiol.* 19: 183-187.
- Collins, J.D.** (2006). Tuberculosis in cattle: strategic planning for the future. *Vet. Microbiol.* 112: 369-381.
- Collins, M.T.** (1996) Diagnosis of paratuberculosis. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 12: 357-371.
- Collins, M.T.** (2004). Update on paratuberculosis: control and zoonótica potential. *Irish. Vet. J.* 57: 49-52.
- Collins, D.M.;** Gabric, D.M. y De Lisle, G.W. (1990). Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 28: 1591-1596.
- Collins, D. M.;** Stephens, D.M. y de Lisle, G.W. (1993a). Comparison of polymerase chain reaction test and faecal culture for detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine faeces. *Vet. Microbiol.* 36: 289-299.
- Collins, D.M.;** Angulo, A.; Buerguelt, C.D.; Hennager, S.G.; Hietala, S.K.; Jacobson, R.H.; Whipple, D.L. y Whitlock, R.H. (1993b). Reproducibility of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for bovine paratuberculosis among eight laboratories. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5: 52-55.
- Collins, D. M.;** de Lisle, G.W.; Collins, J.D. y Costello, E. (1994). DNA restriction fragment typing of *Mycobacterium bovis* isolates from cattle and badgers in Ireland. *Vet. Rec.* 134: 681-682.
- Collins, D. M.;** de Zoete, M. y Cavaignac, S.M. (2002). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains from cattle and sheep can be distinguished by a PCR test based on a novel DNA sequence difference. *J. Clin. Microbiol.* 40: 4760-4762.
- Condron, R.J.;** Schroen, C.J.; Black, C.A.; Ridge, S.E. y Hope, A.F. (1994). Histological confirmation of subclinical infection with *M. paratuberculosis* in cattle. En: Chiodini, R.J.; Collins, M.T. y Bassey, E.O.E. (Eds). *Proc. 4th Int. Coll. PTCB. IAP.* Providence. EEUU. pp. 37-40.
- Contreras, J.A.** (2000). Enfermedades de los bovinos. 2^{da} Edición. Editorial Bogue. Barquisimeto. 560- 583.
- Cooke, M.M., Jackson, R. y Coleman, J.D. (1993). Tuberculosis in a free-living brown hare (*Lepus europeaus occidentalis*). *New Zeal. Vet. J.* 41: 144-146.
- Corner, L.A.** (1994). Bovine tuberculosis: pathology and bacteriology. In Australian standard diagnostic techniques for animal diseases (L.A. Corner & T. J. Bagust, edit.). CSIRO for the standing committee on agriculture and resource, management, east melbourne, 8 págs.
- Corner, L.A. y Pearson, C.W.** (1978). Pathogenicity for cattle of atypical micobacteria isolated from feral pigs and cattle and the correlation of lesions with tuberculin sensitivity. *Aust. Vet. J.* 54: 280-286.
- Corner, L.A.;** Melville, L.; McCubbin, K.; Small, K.J.; McCormick, B.S.; Wood, P.R. y Rothel, J.S. (1990). Efficiency of inspection procedures for the detection of tuberculosis lesions in cattle. *Australian Veterinary J.* 67: 389-392.
- Corner, L.A.;** Wood, P.R. y Rothel, J.S. (1991). Reply to the correspondence: Efficiency of inspection procedures for the detection of tuberculous lesions in cattle. *Austr. Vet. J.* 68: 218-219.
- Coromoto, A.;** Morela, R.C. y Alberto, V. (2006). Caracterización de la paratuberculosis bovina en ganado doble propósito de los llanos de Monagas, Venezuela. *Zoo. Trop.* 24: 321-332.

Bibliografía

Corpa, J.M. (1999). Aspectos inmunopatológico de la paratuberculosis de los pequeños rumiantes. Respuesta inmune asociada a la vacunación. *Tesis doctoral. Universidad de León.*

Corpa, J.M.; Kalis, C.H.; García Marín, J.F. y Pérez, V. (1998a). Diagnóstico de la paratuberculosis en el ganado vacuno. *Med. Vet.* 618-624.

Corpa, J.M.; Kalis, C.H.; García Marín, J.F. y Pérez, V. (1998b). Evolución de la respuesta inmune frente a paratuberculosis en ganado ovino y caprino según la edad de vacunación. *Producción ovina y caprina.* 23: 283-286.

Corpa, J.M.; Garrido, J.; García Marín, J.F. y Pérez, V. (2000). Classification of lesions observed in natural cases of paratuberculosis in goats. *J. Comp. Path.* 122: 255-265.

Cosivi, O.; Grange, J.M.; Daborn, C.J.; Raviglione, M.C.; Fujikura, T.; Cousins, D.; Robinson, R.A.; Huchzermeyer, H.F.; de Kantor, I. y Meslin, F.X. (1998). Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerg. Infect. Dis.* 4: 59-70.

Costello, E.; Doherty, M.L.; Monaghan, M.L.; Quigley, F.C. y O'Reilly, P.F. (1998). A study of cattle-to-cattle transmission of *Mycobacterium bovis* infection. *Vet. J.* 155: 245-250.

Cousins, D.V. (2001). *Mycobacterium Bovis* infection and control in domestic livestock. *Rev. Sci. Tech. Epiz.* 20: 71-85

Cousins, D.V.; Wilton, S.; Francis, B. y Gow, B. (1992). Use of polymerase chain reaction for rapid diagnosis of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 30 (1): 255-258.

Cousins, D.V.; Williams, S.N.; Reuter, R.; Forshaw, D.; Chadwick, B.; Coughran, D.; Collins, P. y Gales, N. (1993). Tuberculosis in wild seals and characterization of the bacillus. *Aust. Vet. J.* 70: 92-97.

Cousins, D.V.; Whittington, R.; Marsh, I.; Masters, A.; Evans, R.J. y Kluver, P. (1999). Mycobacteria distinct from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from the faeces of ruminants posses IS900-like sequences detectable IS900 polymerase chain reaction: implications for diagnosis. *Mol. Cell. Probes.* 13: 431-442.

Cuezva Samaniego, J. (1966). Erradicación de la tuberculosis bovina. Ed. Avigan, Valencia.

Cuezva Samaniego, J. y De la Encina, J. (1958). Campaña de erradicación de tuberculosis bovina en Vizcaya. Estudio de las lesiones encontradas en las reses sacrificadas. *Veterinaria.* 7: 613-621.

Daffe, M. y Draper, P. (1998). The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv. Microb. Physiol.* 39: 131-203.

Dahme, E. y Weiss, E. (1988). Tuberculosis. En: Anatomía Patológica Especial Veterinaria. Ed. Acribia. Zaragoza.

Daniels, M.J.; Ball, N.; Hutchings, M. y Greig, A. (2001). The grazing response of cattle to pasture contaminated with rabbit faeces and the implications for the transmission of paratuberculosis. *Vet. J.* 161: 306-313.

Daniels, M.J.; Henderson, D.; Greig, A.; Stevenson, K.; Sharp, J.M. y Hutchings, M.R. (2003a). The potential role of wild rabbits *Oryctolagus cuniculus* in the epidemiology of paratuberculosis in domestic ruminants. *Epidemiol. Infect.* 130: 553-559.

Daniels, M.J.; Hutchings, M.R.; Beard, P.M.; Henderson, D.; Greig, A.; Stevenson, K. y Sharp, J.M. (2003b). Does non-ruminant wildlife pose a risk of paratuberculosis to domestic livestock and vice versa in Scotland? *J. Wildl. Dis.* 39: 10-15.

- Daniels, M.J.**; Hutchings, M.R. y Greig, A. (2003c). The risk of disease transmission to livestock posed by contamination of farm stored feed by wildlife excreta. *Epidemiol. Infect.* 130: 561-568.
- Delgado, F.**; Etchechoury, D.; Gioffré, A.; Paolicchi, F.; Blanco Viera, F.; Mundo, S. y Romano, M.I. (2009). Comparison between two in situ methods for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* detection in tissue samples from infected cattle. *Vet. Microbiol.* 134: 383-387.
- Delgado, L.**; Marín, J.F.; Muñoz, M.; Benavides, J.; Juste, R.A.; García-Pariente, C.; Fuertes, M.; González, J.; Ferreras, M.C. y Pérez, V. (2013). Pathological in Young and adult sheep following experimental infection with 2 different doses of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet. Pathol.* 50(5): 857-866.
- de Lisle, G.W.**; Welch, P.J.; Havill, P.F.; Julian, A.F.; Poole, W.S.; Corrin, K.C. y Gladden, N.R. (1983). Experimental tuberculosis in red deer (*Cervus elaphus*). *N. Z. Vet. J.* 31(12): 213-216.
- de Lisle, G.W. y Milestones, B.A. (1989). The economic impact of Johne's disease in New Zeland. En:hne's disease current trends in research and management. Milner, A.R. y Wood, P.R. (Eds.) CSIRO: 41-45. Melbourne, Australia.
- de Lisle, G.W.**; Yates, G.F. y Collins, D.M. (1993). Paratuberculosis in farmed deer: case reports and DNA characterization of isolates of *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5: 567-571.
- de Lisle, G.W.**; Mackintosh, C.G. y Bengis, R.G. (2001). *Mycobacterium bovis* in free-living and captive wildlife, including farmed deer. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 20: 86-111.
- Delahay, R.J.**; de Leeuw, A.N.; Barlow, A.M.; Clifton-Hadley, R.S. y Cheeseman, C.L. (2002). The status of *Mycobacterium bovis* infection in UK mammals: a review. *Vet. J.* 164: 90-105.
- Dey, B.P.** y Parham, G.L. (1993). Incidence and economics of tuberculosis in swine slaughtered from 1976 to 1988. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 203: 516-519.
- Díaz, O.F.**; Masso, F.; Paez, A.; Varela, E.; Suarez, F. y Montaña, L.F. (1999). Secretion of IFN- γ by bovine peripheral blood mononuclear cells stimulated with *Mycobacterium bovis* protein fractions obtained by isoelectric- focusing. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 67: 203-212.
- Djonne, B.**; Jensen, MR.; Grant, I.R. y Holstad, G. (2003). Detection by immunomagnetic PCR of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk from dairy goats in Norway. *Vet. Microbiol.* 92: 135-143.
- Dohmann, K.**; Strommenger, B.; Stevenson, K.; De Juan, L.; Stratmann, J.; Kapur, V.; Bull, T. J. y Gerlach, G.F. (2003). Characterization of genetic difference between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* type I and type II isolates. *J. Clin. Microbiol.* 41: 5215-5223.
- Dolz, G.**; Araya, L.N.; Suárez, J. y Jiménez, C. (1999). Prevalence of antibodies to bovine paratuberculosis detected by a LAM-ELISA in Costa Rica. *Vet. Rec.* 144: 322-323.
- Doyle, T.M.** (1954). Isolation of Johne's bacilli from the udders of clinically infected cows. *Br. Vet. J.* 110: 215-218.
- Doyle, T.M.** y Spears, H.N. (1951). A johne's disease survey. *Vet. Rec.* 20: 355-363.
- Draper, P.** (1982). The anatomy of micobacteria. In: The biology of micobacteria. Vol. 1. Ratledge, C., Stanford, J.L., Eds., Academic press, London, pp. 9-52. Citado por: Pritchard, D.G. (1988). A century of bovine tuberculosis 1888-1988: Conquest and controversy. *J. Comp. Path.* 99: 357-398.
- Dungworth, D.I.** (1993). The respiratory system. En: Pathology of domestic animals. Jubb, K.V.F.; Kennedy, P.C. y Palmer, N. (Ed.) Academic press. 4th ed. 2: 493-504. Londres, Reino Unido.

Bibliografía

Dunkin, G.W. (1934). Johne's disease. Its economic significance and early detection. *Vet. Rec.* 14: 1551-1559.

Eamens, G.J.; Whittington, R.J.; Marsh, I.B.; Turner, M.J.; Sanders, V.; Kemsley, P.D. y Rayward, D. (2000). Comparative sensitivity of various fecal culture methods and ELISA in dairy cattle herds with endemic Johne's disease. *Vet. Microbiol.* 77: 357-367.

Edwards, D. y Kirkpatrick, C.H. (1986). The immunology of mycobacterial diseases. *Am. Rev. Respir. Dis.* 134: 1062-1071.

Englund, S. (2003). IS900/ERIC-PCR as a tool to distinguish *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from closely related micobacteria. *Vet. Microbiol.* 96: 277-287.

Eppleston, J. y Whittington, R.J. (2001). Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from the semen of rams with clinical Johne's disease. *Aust. Vet. J.* 79: 776-777.

Erume, J.; Spengser, J. y Rosengarte, R. (2000). Rapid detection of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* from cattle and zoo animals by nested PCR. *African Health Sci. JCM.* 1: 83-89.

Escobar, A.L.; Coimbra, C.E.; Camacho, L.A. y Santos, R.V. (2004). Tuberculin reactivity and tuberculosis epidemiology in the Pakaanóva (Wari) Indians of Rondonia, south-western Brazilian Amazon. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* 8(1): 45-51.

Escobar, J.I.; Mejía, W. y González, J.C. (2003). Búsqueda activa de sintomáticos respiratorios para tuberculosis en poblaciones de alto riesgo. *Rev. Fac. Nac. Sal. Pub.* 21: 9-20.

Estévez-Denaives, I.; Hernández, R.; Trujillo, A.M. y Chávez, G. (2007). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in goat and sheep flocks in México. *Small. Rum. Res.* 72: 209-213.

Estrada-Chávez, C.; Mancilla, R.; Arriaga, D.C.; Pérez, G.R. y Díaz, O.F. (2001). Determinación de anticuerpos anti-PPD en hatos lecheros con distintas prevalencias de tuberculosis bovina en México. *Vet. Mex.* 32: 207-211.

Estrada-Chávez, C.; Díaz, F.; Arriaga, C.; Villegas-Sepúlveda, M.; Pérez, R. y González, D. (2004). Concordancia de la PCR y métodos rutinarios para el diagnóstico de tuberculosis bovina. *Vet. Méx.* 35: 225-236.

European Commission. Health and Consumer Protection Directorate-General. (2003). Report on trends and sources of zoonotic agents in the European Union and Norway. http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/salmonella/zoonoses_reps_2003_en.htm

Fawcett, A.R.; Goddard, P.J.; McKelvey, W.A.; Buxton, D.; Reid, H.W.; Greig, A. y McDonald, A.J. (1995). Johne's disease in a herd of farmed red deer. *Vet. Rec.* 18: 165-169.

Feldman, W.H. y Fitch, C.P. (1936). Histologic features of the intradermic reaction to tuberculin in cattle. *Arch. Pathol.* 22: 495-509.

Feola, R.P.; Collins, M.T. y Czuprynsky, C.J. (1999). Hormonal modulation of fagocitosis and intracellular growth of *Mycobacterium avium* ss. *paratuberculosis* in bovine peripheral blood monocytes. *Microb. Pathogen.* 26: 1-11.

Ferreira, R.; Fonseca, L.S. y Lilenbaum, W. (2002). Agar gel immunodiffusion test (AGID) evaluation for detection of bovine paratuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Lett. Appl. Microbiol.* 35: 173-175.

Ferreras, P. (1915). Sobre la enfermedad de Johne. *Rev. Vet. Esp.* 9: 277-283.

- Fifis, T.;** Costopoulos, C.; Corner, L.A.A. y Wood, P.R. (1992). Serological reactivity to *Mycobacterium bovis* protein antigens in cattle. *Vet. Microbiol.* 30: 343-354.
- Fisher, O.A.;** Matlova, L.; Dvorska, L.; Svastova, P.; Bartl, J.; Melicharek, I.; Weston, R.T. y Pávlik, I. (2001). Diptera as vectors of mycobacterial infections in cattle and pigs. *Med. Vet. Entomol.* 15: 208-211.
- Fisher, O.A.;** Matlova, L.; Bartl, J.; Dvorska, L.; Svastova, P.; Du Maine, R.; Melicharek, I.; Bartos, M. y Pávlik, I. (2003a). Earthworms (*Oligochaeta Lumbricidae*) and micobacteria. *Vet. Microbiol.* 91: 325-338.
- Fisher, O.A.;** Matlova, L.; Dvorska, L.; Svastova, P. y Pávlik, I. (2003b). Nymphs of the Oriental cockroach (*Blatta orientalis*) as passive vectors of causal agents of avian tuberculosis and paratuberculosis. *Med. Vet. Entomol.* 17: 145-150.
- Fisher, O.A.;** Matlova, L.; Dvorska, L.; Svastova, P.; Bartl, J.; Weston, R.T. y Pávlik, I. (2004). Blowflies *Calliphora vicina* and *Lucilia sericata* as passive vectors of *Mycobacterium avium* subsp. *avium*, *M. paratuberculosis* and *M. a. hominissuis*. *Med. Vet. Entomol.* 18: 116-122.
- Florou, M.;** Leontides, L.; Kostoulas, P.; Billinis, C.; Sofia, M.; Kyriazakis, L. y Lykotrafitis, F. (2008). Isolation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from non-ruminant wildlife living in the sheds and the pastures of Greek sheep and goats. *Epidemiol. Infect.* 136: 644-652.
- Fodstad, F.H. y** Gunnarsson, E. (1979). Postmortem examination in the diagnosis of Johne's disease in goats. *Acta Vet. Scand.* 20: 157-167.
- Forshell, K.P.** (2001). Description of paratuberculosis. International Dairy Federation, Brussels, Belgium. FIL/IDF Bull 364, 9-12.
- Forthingham, R.;** Strickland, P.L.; Bretzel, G.; Ramaswamy, S.; Musser, J.M. y Williams, D.L. (1999). Phenotypic and genotypic characterization of *Mycobacterium africanum* isolates from West Africa. *J. Clin. Microbiol.* 37: 1921-1926.
- Francis, J.** (1947). Bovine tuberculosis including a contrast with human tuberculosis. Staples Press Ltd, London.
- Fujimora, Y. y** Owen, R.L. (1996). Mcells as portals of infection: clinical and pathophysiological aspects. *Infect. Agents Dis.* 5: 144-156.
- Gallagher, J. y** Clifton-Hadley, R.S. (2000). Tuberculosis in badgers: a review of the disease and its significance for other animals. *Res. Vet. Sci.* 69(3): 203-217.
- Gamboa, F.;** Fernández, G.; Padilla, E.; Manterola, J.M.; Lonca, J.; Cardona, P.J.; Matas, L. y Ausina, V. (1998). Comparative evaluation of initial and new version of the Gen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory and non-respiratory specimens. *J. Clin. Microbiol.* 36: 684-689.
- Garbaccio, S.** (2006). Diagnóstico *in vivo* e *in vitro* de la Tuberculosis Bovina. Temas de Zoonosis III. *Asoc. Argen. Zoo.* 25: 222-226.
- García Castro, .M.C.** (2007). La inspección del matadero en el diagnóstico de la tuberculosis y cisticercosis bovina. *Tesis doctoral. Universidad de León, España.*
- García Bocanegra, I.;** Barranco, I.; Rodríguez Gómez, I.M.; Pérez, B.; Gómez Laguna, J.; Rodríguez, S.; Ruiz Villamayor, E. y Perea, A. (2010). Tuberculosis in Alpacas (*Lama Pacas*) caused by *Mycobacterium bovis*. *J. Clin. Microbiol.* 48: 1960-1964.

Bibliografía

García Marín, J.F. (1991). Formas lesionales de presentación de la tuberculosis caprina en rebaños altamente infectados. *Itea EXTRA*: 641-643.

García Marín, J.F. (1996). Control de la tuberculosis bovina. *Tuberculosis bovina. OVIS*. 46: 79-91.

García Marín, J.F.; Benazzi, S.; Pérez, V. y Badiola, J.J. (1992a). Study of entrance of *M. paratuberculosis* in the lamb's intestinal mucosa, using immunohistochemical methods for antigens detection. *Proc. III Int. Coll. PTBC*. 371-377. Orlando, E.E.U.U.

García Marín, J.F.; Chávez, G.; Adúriz, J.J.; Pérez, V.; Juste, R.A. y Badiola, J.J. (1992b). Prevalence of paratuberculosis in infected goat flocks and comparison of different methods of diagnosis. *Proc. III Int. Coll. PTBC*. 157-163. Orlando, E.E.U.U.

García Marín, J.F.; Pérez, V. y Badiola, J.J. (1992c). Prevalence and type of paratuberculosis lesions in sheep and their relation with the diagnosis by AGID test. En: Chiodini, R.J. y Kreeger, J.M. (Eds.). *Proc 3rd Int. Coll. PTBC. IAP. Providence*. EEUU. 172-180.

García Marín, J.F.; Pérez, V.; García de Jalón, J.A.; De las Heras, M.; Barberan, M.; Fernández de Luco, D. y Badiola, J.J. (1994). Diagnóstico de casos clínicos de paratuberculosis ovina y caprina. *Med. Vet.* 11: 491-502.

García Marín, J.F.; Tellechea, J.; Corpa, J.M.; Gutiérrez, M. y Pérez, V. (1999). Relationship between ovine paratuberculosis lesions and cellular and humoral immune responses in diagnostic tests. *Proc. VI Int. Coll. PTBC*. 593-598. Melbourne, Australia.

García Marín, J.F.; Pérez, V. y González, J. (2000). La interacción bovino-bacteria y los mecanismos de enfermedad. En: Paratuberculosis. *BOVIS*. 93: 29-38.

Garrido, J.M. (2001). Puesta a punto de las técnicas de PCR en heces y de ELISA para el diagnóstico de la paratuberculosis. Estudio de prevalencia en ganado bovino. *Tesis Doctoral*. Universidad de Zaragoza.

Garrido, J.M.; Cortabarría, N.; Adúriz, G. y Juste, R.A. (1998). Utilización de la PCR como técnica de diagnóstico de paratuberculosis a partir de heces. *Producción Ovina y Caprina*. 23: 291-294.

Garrido, J.M.; Aduriz, G.; Juste, R.A. y Geijo, M.V. (2000). Los métodos de diagnóstico de la paratuberculosis en el ganado vacuno. En: Juste Editor. Paratuberculosis. *BOVIS*. 93: 49-61.

Garro, C.; Morris, W.; Delgado, F. y Garbaccio, S. (2011). Tuberculosis bovina en terneros. *Vet. Arg.* 28(276): 1-10.

Gasteiner, J.; Awad-Masalmeh, M. y Baumgartner, W. (2000). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle in Austria, diagnosis with culture, PCR and ELISA. *Vet. Microbiol.* 77: 339-349.

Gerlach, G.F. (2002). Paratuberculosis: the pathogen and routes of infection. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 109: 504-506.

Gilardoni y Mundo, S.L. (2008). Paratuberculosis bovina. Ciencia y técnica. *Infvet*. 13: 11-14.

Gill, J.W. y Jackson, R. (1993). Tuberculosis in a rabbit: a case revisited. *New. Zeal. Vet. J.* 41: 147.

Gilmour, N.J. (1976). The pathogenesis, diagnosis and control of Johne's disease. *Vet. Rec.* 99: 433-434.

Gilmour, N.J.; Nisbet, D.L. y Brotherston, J.C. (1965). Experimental oral infection of calves with *Mycobacterium johnei*. *J. Comp. Pathol.* 75: 281-286.

- Gilmour, N.J.** y Brotherston, J.G. (1966). Further studies on immunity to *Mycobacterium johnei* in sheep. Relationship between hypersensitivity and host response to infection. *J. Comp. Pathol.* 76: 341-349.
- Gilmour, N.J.L.;** Angus, K.W. y Mitchell, B. (1978). Intestinal infection and host response to oral administration of *Mycobacterium johnei* in sheep. *Vet. Microbiol.* 2: 223-235.
- González, J.** (2003). Caracterización lesional y evaluación de técnicas diagnósticas de la paratuberculosis bovina. Tesis doctoral. Universidad de León, España.
- González, J.;** Geijo, M.V.; García-Pariente, C.; Corpa, J.M.; Reyes, L.E.; Ferreras, M.C.; Juste, R.A.; García Marín, J.F. y Pérez, V. (2005). Histopathological classification of lesions associated with natural paratuberculosis infection in cattle. *J. Comp. Pathol.* 33: 184-196.
- Goodfellow, M.** y Wayne, L.G. (1982). Taxonomy and nomenclature. En: Ratledge, C. y Stanford, J. T. editors. *The Biology of the Mycobacteria. Physiology, Identification and Classification.* 471-521. Londres. Gran Bretaña.
- Goodger, W.J.;** Collins, M.T.; Norlund, K.V.; Eiselle, C.; Pelletier, J.; Thomas, C.B. y Sockett, D.C. (1996). Epidemiologic study of on-farm management practices associated with prevalence of *Mycobacterium paratuberculosis* infections in dairy cattle. *J. Am. Vet. Assoc.* 208: 1877-1881.
- Gortázar, C.;** Torres, M.J.; Vicente, J.; Acevedo, P.; Reglero, M.; de la Fuente, J.; Negro, J.J. y Aznar-Martín, J. (2008). Bovine tuberculosis in Donana Biosphere Reserve: the role of wild ungulates as disease reservoirs in the last Iberian lynx strongholds. *PLoS. ONE.* 3: e2776.
- Gracey, J.F.** (1989). Veterinary role in public health. *Vet. Rec.* 124(10): 257.
- Grange, J.M.** (2001). *Mycobacterium bovis* infection in human beings. *Tuberculosis.* 81: 71-77.
- Grange, J.M.;** Yates, M.D. y Boughton, E. (1990). The avian tubercle bacillus and its relatives. *J. Appl. Microbiol.* 68: 411-431.
- Green, E.P.;** Tizard, M.L.V.; Moss, M.T.; Thomposn, J.; Winterbourne, D.J.; McFadden, J.J. y Hermon-Taylor, J. (1989). Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crhon's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Nucleic Acids Res.* 17: 9063-9073.
- Greig, A.;** Stevenson, K.; Henderson, D.; Pérez, V.; Hughes, V.; Pavlik, I.; Hines, M.E.; McKendrick, I. y Sharp, J.M. (1999). Epidemiological study of paratuberculosis in wild rabbits in Scotland. *J. Clin. Microbiol.* 37: 1746-1751.
- Griffin, J.F.T.** y Buchan, G.S. (1993). Vaccination against tuberculosis: is BCG more sinned against than sinner? *Immunol. Cell. Biol.* 71: 431-442.
- Griffiths, A.T.;** Rioux, K. y Jeroen, B. (2008). Sequence polymorphisms in a surface PPE protein distinguish type I, II and III of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 46: 1207-1212.
- Gruenendaal, H.;** Nielen, M. y Hesselink, J.W. (2003). Development of the Dutch Johne's disease control program supported by a simulation model. *Prev. Vet. Med.*, 60: 69-90.
- Guanziroli, S.;** Maria, C. y Maria, E. (2005). Tuberculinización en búfalos. *Comunicaciones científicas y tecnológicas.* <http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/com2005/4-Veterinaria/V-009.pdf>.
- Guilbride, P.D.L.;** Rollinsin, D.H.L.; McAnulty, E.G.; Alley, J.G. y Wells, E.A. (1963). Tuberculosis in the free living African (Cape) buffalo (*Syncerus caffer caffer*. *Sparman*). *J. Comp. Path.* 73: 337-348.

Bibliografía

Gutiérrez-Cancela, M.M. (1996). Contribución al conocimiento anatomopatológico y diagnóstico de la tuberculosis caprina y bovina por *Mycobacterium bovis*. Tesis doctoral. Universidad de León.

Gutiérrez-Cancela, M.M. y García Marín, J.F. (1993). Comparison of Ziehl-Neelsen staining and immunohistochemistry for the detection of *Mycobacterium bovis* in bovine and caprine tuberculosis lesions. *J. Comp. Path.* 109: 361-370.

Gutiérrez, M.; Tellechea, J. y García Marín, J.F. (1998). Evaluation of celular serological diagnostic tests for the detection of *Mycobacterium bovis* infectes goats. *Vet. Microbiol.* 62(4): 281-290.

Gwozdz, J.M.; Thompson, K.G.; Manktelow, B.W.; Murray, A. y West, D.M. (2000a). Vaccination against paratuberculosis of lambs already infected experimentally with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Aust. Vet. J.* 78: 560-566.

Gwozdz, J.M.; Thompson, K.G.; Murray, A.; Reichel, M.P.; Manktelow, B.W. y West, D.M. (2000b). Comparison of three serological tests and an interferon-gamma assay for the diagnosis of paratuberculosis in experimentally infected sheep. *Aust. Vet. J.* 78: 779-783.

Haagsma, J. (1993). Bacteriology of mycobacteria, in particular the *M. tuberculosis/bovis* complex. En: Micobacteriosis de los animales domésticos: Tuberculosis, Paratuberculosis. Curso de post-grado de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza.

Hagan, W.A. (1936). Vacunation against Johne's disease. *Cornell Vet.* 25: 344-353.

Haines, D.M.; Cooke, E.M. y Clark, E.G. (1987). Avidin-biotin-peroxidase complex immunohistochemistry to detect immunoglobulin in formalin fixed skin biopsies in canine autoimmune skin disease. *Can. J. Vet. Res.* 51: 104-109.

Haines, D.M. y Chelack, B.J. (1991). Technical considerations for developing enzyme immunohistochemical staining procedures on formalin-fixed paraffin-embedded tissues for diagnostic pathology. *J. Vet. Diagn. Invest.* 3: 1293-1298.

Haines, D.M. y Clarke, E.G. (1991). Enzyme immunohistochemical staining of formalin-fixed tissues for diagnosis in veterinary pathology. *Can. Vet. J.* 32: 295-302.

Hamilton, H.L.; Cooley, A.J.; Adams, J.L. y Czuprynski, C.J. (1991). *Mycobacterium paratuberculosis* monoassociated nude as a paratuberculosis model. *Vet. Pathol.* 28: 146-155.

Hanna, J.; Neill, S.D. y O'Brien, J. J. (1989). Use of PPD and phosphatide antigens in an ELISA to detect the serological response in experimental bovine tuberculosis. *Res. Vet. Sci.* 47: 43-47.

Hansen, D. y Rossitier, C. (1999). Descripción clínica y epidemiológica de la enfermedad de John's en el ganado bovino. *AMEBE, Boletín informativo.* 22: 29-32.

Hardin, L.E. y Thorne, J.G. (1996). Comparison of milk with serum ELISA for the detection of paratuberculosis in dairy cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 209: 120-122.

Harding, H.P. (1957). Experimental infection with *Mycobacterium johnei*. II. The histopathology of infection in experimental goats. *J. Comp. Pathol.* 67: 37-52.

Haregewoin, A.; Soman, G.; Hom, R.C. y Finberg, R.W. (1989). Human gamma-delta +T cells respond to mycobacterial heat-shock protein. *Nature.* 340: 309-312.

Harris, N.B. y Barletta, R.G. (2001). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. *Clin. Microbiol. Reviews.* 14: 489-512.

- Hein, W.R.** y Tomasovic, A.A. (1981). An abattoir survey of tuberculosis in feral buffaloes. *Aust. Vet. J.* 57: 543-547.
- Hein, W.R.** y Mackay, C.R. (1991). Prominence of gamma delta T cells in the ruminant immune system. *Immunol. Today.* 12: 30-34.
- Hermon, T.J.;** Bull, T.; Sheridan, J. Cheng, J.; Stellakis, M. y Sumar, M. (2000). Causation of Crohn's disease by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J. Can. Gastroent.* 14: 521-539.
- Hermoso de Mendoza, J.;** Parra, A.; Tato, A.; Alonso, J.M.; Rey, J.M.; Pena, J.; García-Sánchez, A.; Larrasa, J.; Teixido, J.; Manzano, G.; Cerrato, R.; Pereira, G.; Fernández-Llario, P. y Hermoso de Mendoza, M. (2006). Ovine tuberculosis in wild boar (*Sus scrofa*), red deer (*Cervus elaphus*) and cattle (*Bos taurus*) in a Mediterranean ecosystem (1992-2004). *Prev. Vet. Med.* 74(2-3): 239-247.
- Hernandéz, P.;** Jeyanathan, M.; Mengistu, G.; Aguilar, D.; Orozco, H.; Harboe, M.; Rook, G.A. y Bjune, G. (2000). Persistence of DNA from *Mycobacterium tuberculosis* in superficially normal lung tissue during latent infection. *Lancet.* 356: 2133.
- Hernández de Anda, J.;** Rentería, T.; López, G. y Montaña, M. (1997). An abattoir monitoring system for diagnosis of tuberculosis in cattle in Baja California, México. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 211 (6): 709-711.
- Hines, S.A.;** Buerguelt, C.D.; Wilson, J.H. y Bliss, E.I. (1987). Disseminated *Mycobacterium paratuberculosis* infection in a cow. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 190: 681-683.
- Hope, J.;** Thom, M.; McCormick, P. y Howard, C. (2003). Interaction of antigen of bovine dendritic cells by lipopeptides. *Vet. Immunol. Immunop.* 9: 21-31.
- Hostetter, J.M.;** Steadham, E.M.; Haynes, J.S.; Bailey, T.B. y Cheville, N.F. (2002). Cytokine effects on maturation of the phagosomes containing *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in J774 cells. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 34: 127-134.
- Huchzermeyer, H.;** Brückner, G.; Van Heerden, A.; Kleeberg, H.H.; Van Rensburg, I.B.J.; Koen, P. y Loveday, R.K. (1994). *Tuberculosis. Infectious diseases of livestock.* Coetzer, J.A.W.; Thompson, G.R. y Tustin, R.C. (Eds.) Oxford university press. 2: 1425-1443. Oxford, Reino, Unido.
- Huda, A.** y Jensen, H.E. (2003). Comparison of histopathology, cultivation of tissues and rectal contents, and interferon-gamma and serum antibody responses for the diagnosis of bovine paratuberculosis. *J. Comp. Pathol.* 129: 259-267.
- Hughes, M.S.;** Skuce, R.A.; Beck, L.A. y Neill, S.D. (1993). Identification of mycobacteria from animals by restriction enzyme analysis and direct DNA cycle sequencing of polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA gene sequences. *J. Clin. Microbiol.* 31: 3216-3222.
- Hutchinson, L.J.** (1996). Economic impact of paratuberculosis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 12 (2): 373-381.
- Hutyra, F.** y Marek, J. (1930). Enteritis paratuberculosa de los bóvidos. *Patología y terapéutica especiales de los animales domésticos.* Ed. Revista veterinaria de España. 1º ed., pp. 613-620. Barcelona, España.
- Ilukevich Anerik, A.** (1974). Estudio experimental sobre el diagnóstico de la tuberculosis bovina mediante pruebas de cultivo e inoculación animal. *Ciencias Veterinarias. Maracaibo.* 4: 137-200.
- Job, L.;** Arcangeli, G.; Mutinelli, F. (1996). Utilizzo delle metodiche immunoistochimica e del test gamma-interferon nella diagnosi precoce della paratuberculosis bovina. *Vet. Ital.* 32: 23-26.

Bibliografía

Jaimes, N.G.; Santillán, M.A.; Hernández, O.A.; Córdova, D.; Guzmán, C.C.; Arellano, B.; Díaz, E.; Tenorio, V.R. y Cuellar, A. (2008). Detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis by nested-PCR of ovine fecal samples. *Vet. Méx.* 39 (4): 377-386.

Janis, E.M.; Kaufmann, S.H.E.; Schwartz, R.H. y Pardoll, D.M. (1989). Activation of gd cells in the primary immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*. 244: 713-716.

Jensen, K.A. (1953). Bovine tuberculosis in man and cattle. *En: WHO/FAO Advances in the control of Zoonosis Geneva*. Pp. 35. Citado por: Ilukevich Anerik, A. (1974). Estudio experimental sobre el diagnóstico de la tuberculosis bovina mediante pruebas de cultivo e inoculación animal. *Ciencias Veterinarias. Maracaibo*. 4: 137-200.

Johne, H.A. y Frothingham, L. (1895). Ein eigenthümlicher fall von tuberkulose beim rind. *Dtsch. Ztschr. Tiermend. Path.* 21: 438-454.

Johnson, H.W.; Larson, A.B.; Henley, R.R. y Groth, A.H. (1949). The relationship of the allergens of *Mycobacterium paratuberculosis*, *Mycobacterium tuberculosis* var. *avium*, *bovis* and *hominis* and *Mycobacterium phlei*. *J. Vet. Res.* 10: 138-141.

Johnson-Yfearulundu, Y.; Kaneene, J.B.; Sprecher, D.J; Gardiner, J.C. y Lloyd, J.W. (2000). The effect of subclinical *Mycobacterium paratuberculosis* infection on days open in Michigan, USA, dairy cows. *Prev. Vet. Med.* 46: 171-181.

Jones, D.G. y Kay, J.M. (1996). Serum biochemistry an the diagnosis of Johne´s disease (paratuberculosis) in sheep. *Vet. Rec.* 139: 498-499.

Jorge, M.C.; Traversa, M.J.; Schettino, D.M.; Fresneda, K. y Mendivil, I.M. (2005). Epidemiología e importancia económica de la paratuberculosis bovina. Consultado: <http://johnes.net/general/control.html>.

Jorgensen, J.B. (1969). Paratuberculosis in pigs. Experimental infection by oral administration of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Acta. Vet. Scand.* 10: 275-287.

Jorgensen, J.B. (1972). Studies on the occurrence of paratuberculosis in cattle in Denmark. *Nord. Vet. Med.* 24: 297-308.

Jorgensen, J.B. y Jensen, P.T. (1978). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies to *Mycobacterium paratuberculosis* in cattle. *Acta. Vet. Scand.* 19: 310-312.

Jubb, K.V.F.; Kennedy, P.C. y Palmer, N. (1985). Micobacterial enteritis. *En: Jubb, K.V.F.; Kennedy, P.C. y Palmer, N. editores. Pathology of Domestic Animals.* 155-159. London.

Julian, R.J. (1975). A short review and some observations on Johne´s disease with recommendations for control. *Can. Vet. J.* 16: 33-43.

Juste, R.A. (1997). Johne´s disease: a review of current knowledge. *En: Allworth editor. Proc. 4º Int. Congr. Sheep Vet.*, pp. 140-150. ASVS, Armidale, NSW, Australia.

Juste, R.A.; Cuervo, L.A.; Gelabert, J.L.; Sáez de Ocariz, C.; Marco, J.C. y Camon, J. (1983). Paratuberculosis bovina en Vizcaya. *Hyg. Pec.* 5: 57-67.

Juste, R. A. y Adúriz, J.J. (1990a). Diagnóstico. *Paratuberculosis ovina. OVIS.* 7: 49-62.

Juste, R.A. y Adúriz, J.J. (1990b). Aspectos epidemiológicos. *Paratuberculosis ovina. OVIS.* 7: 65-75.

Juste, R.A. y Sáez de Ocariz, C. (1990). Control. *En: Juste editor. Paratuberculosis. OVIS.*, 77-85. Madrid.

- Juste, R.A.;** Marco, J.C.; Sáez de Ocariz, C. y Adúriz, J.J. (1991). Comparison of different media for the isolation of small ruminant strains of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 28: 385-390.
- Juste, R.A.;** Garrido, J.M. y Adúriz, G. (2000). Paratuberculosis: El agente causal de la paratuberculosis y su situación taxonómica. *Paratuberculosis. BOVIS.* 93: 13-28.
- Juste, R.A.;** Garrido, J.M.; Geijo, M.; Elquezabal, N.; Aduriz, G.; Atzaerandio, R. y Sevilla, I. (2005). Comparison of blood polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle and sheep. *J. Vet. Diagn. Invest.* 17: 354-359.
- Kabelitz, D.;** Bender, A.; Ssouldermaier, S.; Schoel, B. y Kaufmann, S.H.E. (1990). A large fraction of human peripheral blood gamma-delta +T cells is activated by *M. tuberculosis* but not by its 65-KD heat shock proteins. *J. Exp. Med.* 171: 667-679.
- Kalis, C.H.;** Hesselink, J.W.; Russchen, E.W.; Barkema, H.W.; Collins, M.T. y Visser, I.J. (1999). Factors influencing the isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from bovine fecal samples. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11: 345-351.
- Kalis, C.H.;** Hesselink, J.W.; Barkema, H.W. y Collins, M.T. (2000). Culture of strategically pooled bovine fecal samples as a method to screen herds for paratuberculosis. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12(6): 547-551.
- Kalis, C.H.;** Hesselink, J.W.; Barkema, H.W. y Collins, M.T. (2001). Use of long-term vaccination with a killed vaccine to prevent faecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy herds. *Am. J. Vet. Res.* 62: 270-274.
- Kalis, C.H.;** Barkema, H.W.; Hesselink, J.W.; Van Maanen, C. y Collins, M.T. (2002). Evaluation of two absorbed enzyme-linked immunosorbent assays and a complement fixation test as replacements for fecal culture in the detection of cows shedding *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J. Vet. Diagn. Invest.* 14: 219-224.
- Kalis, C.H.;** Collins, M.T.; Hesselink, J.W. y Barkema, H.W. (2003). Specificity of two tests for the early diagnosis of bovine paratuberculosis based on cell-mediated immunity: the Johnin skin test and the gamma interferon assay. *Vet. Microbiol.* 97: 73-86.
- Kantor, I.N de.;** Odeón, A.C.; Steffan, P.E.; Auza, M.J.; Madrid, C.R. y Marchevsky, N. (1984). Sensivity of the cervical and the caudal fold tuberculin tests with *Mycobacterium bovis* in infected cattle of Argentina. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.* 3: 137-150.
- Kaufmann, S.H.E.** (1995). Immunity to intracellular microbial pathogens. *Immunol. Today.* 16: 338-342.
- Kaur, P.;** Folia, G.; Singh, S.V.; Patil, P.K. y Sandhu, K.S. (2010). Molecular detection and typing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from milk samples of dairy animals. *Trop. Anim. Health Prod.* 42: 1031-1035.
- Kell, D.B. y Young, M.** (200). Bacterial dormancy and culturability: The role of autocrine growth factors. *Vet. Microbiol.* 3: 228-243.
- Kennedy, D.J. y Benedictus, G.** (2001). Control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in agricultural species. *Rev. Sci. Tech.* 20: 151-179.
- Khare, S.;** Ficht, T.A.; Santos, R.L.; Romano, J.; Ficht, A.R.; Zhang, S.; Grant, I.R.; Libal, M.; Hunter, D. y Adams, L.G. (2004). Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine milk and feces by a combination of immunomagnetic bead separation-conventional PCR and real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 42 (3): 1075-81.

Bibliografía

Kheirandish, R.; Khodakaram Tafti, A. y Hosseini, A. (2008). The comparative evaluation of immunohistochemical and acid fast staining with histopathological changes in naturally occurring paratuberculosis in sheep. *Comp. Clin. Pathol.* 17: 111-116.

Kimberling, C.V. (1988). Paratuberculosis. *Lea y Febiger editors. Jensen & Swifts disease of sheep.* 235-238. Filadelfia, USA.

Koets, A.P.; Adugna, G.; Janss, L.L.; Van Weering, H.J.; Kalis, C.H.; Wentink, G.H.; Rutten, V.P. y Schukken, Y.H. (2000a). Genetic variation of susceptibility to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 83: 2702-2708.

Koets, A.P.; Rutten, V.P.; Bakker, D.; Van Der Hage, M.H. y Van Eden, W. (2000b). Lewis rats are not susceptible to oral infection with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 77: 487-495.

Köhler, H.; Gyra, H.; Zimmer, K.; Dräger, K.G.; Burkert, B.; Lemser, B.; Hausleithner, D.; Cubler, K.; Klawonn, W. y Hess, R.G. (2001). Immune reactions in cattle after immunization with a *Mycobacterium paratuberculosis* vaccine and implications for the diagnosis of *M. paratuberculosis* and *M. bovis* infections. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public. Health.* 48: 185-195.

Koniha, L.D.; Himes, E.M. y Thoen, C.O. (1980). Bovine tuberculosis. *En: Handbook Series in Zoonoses.* Steele, J.H.; Stoenner, H. y Kaplan, W. eds. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

Kramsky, J.A.; Miller, D.S.; Hope, A. y Collins, M.T. (2000). Modification of bovine ELISA to detect camelid antibodies to *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 77: 333-337.

Kreeger, J.M. (1991). Ruminant paratuberculosis a century of progress and frustration. *J. Vet. Diagn. Invest.* 3: 373-383.

Kremer, K.; Van Sooligen, D.; Van Embden, J.; Hughes, S.; Inwald, J. y Hewinson, G. (1998). *Mycobacterium microti*: more widespread than previously thought. *J. Clin. Microbiol.* 36: 2793-4.

Kruze, J.; Salgado, M. y Collins, M.T. (2007). Paratuberculosis en rebaños caprinos chilenos. *Arch. Med. Vet.* 39: 147-152.

Kubabara, S. (1975a). Purification and properties of tuberculin active protein from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* 250: 2556.

Kubabara, S. (1975b). Aminoacid sequence of tuberculin active protein from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biol. Chem.* 250: 2563.

Kuehnel, M.P.; Goethe, R.; Habermann, A.; Mueller, E.; Rohde, M.; Griffiths, G. y Valentine-Weigand, P. (2001). Characterization of the intracellular survival of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: phagosomal pH and fusogenicity in J774 macrophages compared with other micobacteria. *Cell. Microbiol.* 3: 551-566.

Kurade, N.P.; Tripathi, B.N.; Rajukumar, K. y Parihar, N.S. (2004). Sequential development of histologic lesions and their relationship with bacterial isolation, fecal shedding, and immune responses during progressive stages of experimental infection of lambs with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Pathol.* 41: 378-387.

Lagadic, M.; Le Menec, M.; Argente, G.; Lecoz, N.; Massart, M.T.; Moisan, J. y Quiniou, M.A. (1983). Techniques de cultures de *Mycobacterium paratuberculosis*: Leur utilisation en routine dans un laboratoire de diagnostic. *Rec. Med. Vet.* 159: 801-807.

Larsen, A.B.; Baisden, L.A.; Merkal, R.S. y Morris, M.J. (1957). Methods of injecting tuberculin in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 18: 546-549.

- Larsen, A.B.** (1964). Recent developments in paratuberculosis (Johne's disease) research. *Proc. Annu. Meet. U.S. Anim. Health Assoc.* 68: 342-347.
- Larsen, A.B.; Merkal, R.S.; Kopecky, K.E. y Boothe, A.D.** (1969). Hipersensitivity and serologic responses in cattle vaccinated with disrupted *Mycobacterium paratuberculosis* cells and subsequently infected with *Mycobacterium bovis*. *Am. J. Vet. Res.* 30: 2167-2172.
- Larsen, A.B.; Moon, H.W. y Merkal, R.S.** (1971). Susceptibility of swine to *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.* 32: 589-595.
- Larsen, A.B.; Moon, H.W. y Merkal, R.S.** (1972). Susceptibility of horse to *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.* 33: 2185-2189.
- Larsen, A.B.; Merkal, R.S. y Moon, H.W.** (1974). Evaluation of a paratuberculosis vaccine given to calves before infection. *Am. J. Vet. Res.* 35: 367-369.
- Larsen, A.B.; Merkal, R.S. y Cutlip, R.C.** (1975). Age of cattle as related to resistance to infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.* 36: 255-257.
- Larsen, A.B.; Moyle, A.I. y Himes, E.M.** (1978). Experimental vaccination of cattle against paratuberculosis (Johne's disease) with killed bacterial vaccines: a controlled field study. *Am. J. Vet. Res.* 39: 65-69.
- Larsen, A.B.; Stalheim, O.H.V.; Hughes, D.E.; Appell, L.H.; Richards, W.D. y Himes, E.M.** (1981). *Mycobacterium paratuberculosis* in the semen and genital organs of a semen-donor bull. *JAVMA.* 179: 169-171.
- Lawrence, W.E.** (1956). Congenital infection with *Mycobacterium johnei* in cattle. *Vet. Rec.* 68: 312-314.
- Leid, J.G.; Hunter, D. y Speer, C.A.** (2002). Early diagnosis of Johne's disease in the American bison by monoclonal antibodies directed against antigen 85. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 969: 66-72.
- Levy-Frebault, V.V. y Portaels, F.** (1992). Proposed minimal standards for the *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium species*. *Int. Syst. Bacteriol.* 42: 315-323.
- Liyang, L.; Brandon, L.; Plattner, M. y Hostetter, M.** (2008). Live *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and a killed-bacterium vaccine induce distinct subcutaneous granulomas, with unique cellular and cytokine profiles. *Clin. Vacc. Immunol.* 15: 783-793.
- López, G.; Hernández de Anda, J. y Sierra, E.** (1997). Diagnóstico *postmortem* en decomisos sugestivos a tuberculosis en ganado bovino sacrificado en rastros en Baja California. *Vet. Méx.* 28 (3): 235-239.
- López, L.M.; Díaz, F.; Valecillo A.J.; Esquivel, H. y Gutiérrez, J.A.** (2006). Tuberculosis humana y bovina en Latinoamérica: De estudios sobre virulencia hacia herramientas para su control. *Rev. Latinoa. Microbiol.* 48: 173-178.
- López-Garrido, L.A.** (2008). Diagnóstico molecular de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* en ganado bovino de la zona centro del Estado de Veracruz. *Tesis de Licenciatura. FMVZ. Universidad Veracruzana.*
- Losinger, W.C.** (2005). Economic impact of reduce milk production associates with Johne's disease on dairy operations in the USA. *J. Dairy Res.* 72: 425-432.
- Lugton, I.** (1999). Mucosa-associated lymphoid tissues as sites for uptake, carriage and excretion of tubercle bacilli and other pathogenic micobacteria. *Immunol. Cell. Biol.* 77: 364-372.
- Luke, D.** (1958). Tuberculosis in the horse, pig, sheep and goat. *Vet. Rec.* 70: 528-536.

Bibliografía

- Lyashchenko, K.;** Manca, C.; Colangeli, R.; Heijbel, A.; Williams, A. y Gennaro, M. (1998). Use of *Mycobacterium tuberculosis* complex-specific antigen cocktails for a skin test specific for tuberculosis. *Infect. Immun.* 66: 3606-10.
- Lyle, P.A.S. y Merkal, R.S.** (1983). Comparison of ELISA and gel diffusion precipitin test for paratuberculosis in cattle, sheep and goats. *Proc. I. Int. Coll. PTBC.* 109-112. Ames, E.E.U.U.
- Maartens, G. y Wilkinson, R.J.** (2007). Tuberculosis. *Lancet.* 370: 2030-2043.
- Mackintosh, C.G.;** Haigh, J.C. y Griffin, F. (2002). Bacterial diseases of farmed deer and bison. *Rev. Sci. Tech.* 21: 249-263.
- Magnano, G.G.;** Schenider, M.O.; Urbani, C.E.; Ambrogi, A.; Zapata, L. y Jorge, M.C. (2010). Comparación de técnicas diagnósticas de tuberculosis porcina en dos establecimientos de cría confinada en Argentina. *Infvet.* 12: 25-31.
- Manning, E.J.B. y Collins, M.T.** (2001). Infecciones micobacterianas en animales domésticos y salvajes. *Rev. Cient. y Téc. de la Oficina Internacional de Epizootias.* 20.
- Mantilla, J.B.** (2007). Estudio histopatológico de ganglios linfáticos de bovinos positivos a la prueba de tuberculina, procesados en laboratorios de SENASA, Lima, procedentes de las Regiones de Piura, Lambayeque, La Libertad y Lima (1997-2003).
- Marco, I.;** Ruiz, M.; Juste, R.; Garrido, J.M. y Lavin, S. (2002). Paratuberculosis in free-rearing fallow deer in Spain. *J. Wildl. Dis.* 38: 629-632.
- Marco, J.C. y Adúriz, J.J.** (1990). Sobre *Mycobacterium paratuberculosis*. En: Juste, R. A. *OVIS.* Paratuberculosis. 9-23. Madrid.
- Mariano, M. y Spector, W.G.** (1973). The formation and properties of macrophage polykaryons (inflammatory giant cells). *J. Path.* 113: 1-19.
- Martínez-Vidal, C.A.** (2008). Diagnóstico molecular de *Mycobacterium bovis* en ganado bovino de la zona centro del Estado de Veracruz. *Tesis de Licenciatura. FMVZ, Universidad Veracruzana.*
- Mason, O.;** Marsh, I. y Whittington, R.J. (2001). Comparison of immunomagnetic bead separation-polymerase chain reaction and faecal culture for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in sheep faeces. *Aust. Vet. J.* 79: 497-500.
- McDonald, W.L.;** Ridge, S.E; Hope, A.F. y Condrón, R.J. (1999). Evaluation of diagnostic test for Johne's disease in young cattle. *J. Aust. Vet.* 77: 113-119.
- McPherron, T.A.;** Coglianesi, C.L.; Jaster, E.H.; Urbance, J.W.; Mock, R.E.; Oetzer, G.R. y Parre, M. (1983). Observations on the economic impact of Johne's disease (Paratuberculosis) on cattle herds in Illinois. *Proc. I Int. Coll. PTBC.* 55: 246-251.
- Merck Veterinary Manual.** (2008). Introducción de la paratuberculosis. En línea consultado: 18 de febrero del 2011. <http://www.merckvetmanual.com/mvm/index.jsp?cfile=htm/bc/55900.Htm&word=paratuberculosis>.
- Menchen Ozaita, V.** (1995). Estudio inmunocitoquímico de la tuberculosis y paratuberculosis caprina. Tesis doctoral. Universidad de Murcia.
- Merkal, R.S.** (1973). Laboratory diagnosis of bovine paratuberculosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 163: 1100-1102.

- Merkal, R.S.** (1984). Paratuberculosis: advances in cultural, serologic, and vaccination methods. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 184: 939-943.
- Merkal, R.S.; Larsen, A.B.; Velicer, L.F. y Thurston, J.R.** (1965). Serologic and allergenic effects of 3 *Mycobacterium paratuberculosis* antigens. *Am. J. Vet. Res.* 26: 1267-1270.
- Merkal, R.S.; Larsen, A.B. y Booth, G.D.** (1975). Analysis of the effects of inapparent bovine paratuberculosis. *Am. J. Vet. Res.* 31: 837-838.
- Merkal, R.S.; Whipple, D.L.; Sacks, J.M. y Synder, G.R.** (1987). Prevalence of *Mycobacterium paratuberculosis* in ileocecal lymph nodes of cattle culles in the United States. *JAVMA.* 190: 676-680.
- Michel, A.L.** (2002). Implications of tuberculosis in African wildlife and livestock. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 969: 251-255.
- Michel, A.L.; Bengis, R.G.; Keet, D.F.; Hofmeyr, M.; Klerk, L.M.; Cross, P.C.; Jolles, A.E.; Cooper, D.; Whyte, I.J; Buss, P. y Godfroid, J.** (2006). Wildlife tuberculosis in South African conservation areas: implications and challenges. *Vet. Microbiol.* 112: 91-100.
- Michel, A.L.; Müller, B. y Van Helden, P.D.** (2010). *Mycobacterium bovis* at the animal –human interface: A problem, or not?. *Veterinary Microbiology.* 140: 371-381.
- Milian Suazo, F.; Salman, M.D.; Ramírez, C.; Payeur, J.B.; Rhyan, J.C. y Santillán, M.** (2000). Identification of tuberculosis in cattle slaughtered in México. *American Journal of Veterinary Research.* 61: 86-89.
- Milian Suazo, F.; García, C.L.; Romero, T.C.; Cantó, A.G.J.; Gutierrez, R.J.A.; Gallegos, S.S.; Mercado, P.M.; Mejía, E.F.F.; Peña, C.A.L.; Estrada, C.C. y Pizano, M.O.** (2012). Diversidad genética y distribución regional de cepas de *Mycobacterium bovis* del gando en México. *Rev. Mex. Cienc. Pecu.* 3(4): 459-471.
- Millar, D.; Ford, J.; Sanderson, J.; Withey, S.; Tizard, M.; Doran, T. y Hermon-Taylor, J.** (1996). IS900 PCR to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in retail supplies of whole pasteurized cows milk in England and Wales. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3446-3452.
- Miller, J.M.; Jenny, A.L.; Rhyan, J.; Saari, D. y Suarez, D.** (1997). Detection of *Mycobacterium bovis* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of cattle and elk by PCR amplification of an IS6110 sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms. *J. Vet. Diagn. Invest.* 9: 244-249.
- Miller, J.M.; Jenny, A.L. y Payeur, J.B.** (1999). Polymerase chain reaction of *Mycobacterium avium* organisms in formalin-fixed tissues from culture-negative ruminants. *Vet. Microbiol.* 87: 15-23.
- Miller, J.M.; Collins, M.T.; Smith, B.B.; Anderson, P.R.; Kramsky, J.; Wilder, G. y Hope, A.** (2000). Specificity of four serologic assays for *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in llamas and alpacas: a single herd study. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12: 345-353.
- Miller, J.M.; Jenny, A.L. y Payeur, J.B.** (2002). Polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and *Mycobacterium avium* organisms in formalin-fixed tissues from culture-negative ruminants. *Vet. Microbiol.* 87: 15-23.
- Milner, A.R; Mack, W.N. y Coates, K.J.** (1989). A modified ELISA for the detection of goats infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Austr. Vet.* 66: 305-307.
- Miltgen, J.M.; Morillon, M.; Koeck, J.L.; Varnerot, A.; Briant, J.F. y Nguyen, G.** (2002). Two cases of pulmonary tuberculosis are caused by *Mycobacterium* subsp. *cannetti*. *Emerg. Infect. Dis.* 8: 1350-1352.

Bibliografía

- Miranda**, B.M.V. (2005). Evaluación del impacto económico de la paratuberculosis en ganado lechero (sistema intensivo) del complejo agropecuario industrial, Tizayuca, Hidalgo, México. Tesis de Maestría FMVZ UNAM.
- Mirsky**, M.L.; Morton, D.; Piehl, J.W. y Gelberg, H. (1992). *Mycobacterium bovis* infection in a captive herd of sika deer. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 200: 1540-1542.
- Momotami**, E. y Yoshino, T. (1985). Caseous granulomas in bovine paratuberculosis. *Inp. J. Vet. Sci.* 47: 487-491.
- Mohamed Anciones**, Y.; Fernández, M. y Pérez, V. (2013). Estudio de la prevalencia de la aratuberculosis bovina en dos rebaños lecheros mediante métodos inmunológicos. Libro de Resúmenes del XVIII. *Congreso de ANEMBE, Lleida, España, Abril de 2013*. Pp. 179-181.
- Momotami**, E.; Whipple, D.L.; Thiermann, A.B. y Cheville, N.F. (1988). Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches in calves. *Vet. Pathol.* 25: 623-627.
- Monaghan**, M.L.; Doherty, M.L.; Collins, J.D.; Kazda, J.F. y Quinn, P.J. (1994). The tuberculin test. *Vet. Microbiol.* 40: 111-124.
- Morales**, A.; Martínez, I.; Carlos, A.; Álvarez, G.; Álvarez, M y Maldonado, J. (2005). Comparación de histopatología, cultivo y PCR en el diagnóstico de tuberculosis bovina. *Rev. Cient. FCV-LUZ.* 15(2): 103-108.
- Morales**, A.; Peñuelas, K.; Álvares, G.; Martínez, J.; Mendoza, G y Milián Suazo, F. (2008). Correlación entre PCR en exudado nasal y la reacción de tuberculina para la detección de organismo del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en bovino. *Rev. Cient. FCV-LUZ.* 18(1): 17-21.
- Morán**, M.C.; Aceves, D.; Peña, P.M.; Gallegos, M.P.; Flores, S.E.; Montoya, H.; Figueroa, L.E.; Villa, L. y Sánchez, J. (2000). Detección de *Mycobacterium tuberculosis* mediante la reacción en cadena de la polimerasa en una población seleccionada del noroccidente de México. *Pan. Am. J. Public. Health.* 7 (6): 389-394.
- Moreno**, B.; Adúriz, G.; Garrido, J.; Sevilla, I. y Juste, R. (2007). Disseminated *Mycobacterium avium* subsp. *avium* infection in a pet Korean squirrel (*Sciurus Vulgaris Koreae*). *Vet. Pathol.* 44: 123-125.
- Moreno**, O.; Ferreras, M.C; García-Pariente, C.; Fuertes, M.; Reyes, L.E.; González, J.; Muñoz, M.; Pérez, V. y García Marín, J.F. (2008). Diagnóstico de paratuberculosis en terneros sacrificados en matadero. *Boletín ANEMBE.* 76:9-11.
- Morris**, A.; Reller, L. y Devlin, B. (1994). Clinical usefulness of detecting growth of *Mycobacterium tuberculosis* in positive Bactec phials using PCR. *Am. J. Med.Sci.* 307(2): 119-127.
- Morris**, R.S. y Pfeiffer, D.U. (1995). Directions and issues in bovine tuberculosis epidemiology and control in New Zealand. *N. Z. Vet. J.* 43: 256-265.
- Morrison**, W.I.; Bourne, F.J.; Cox, D.R.; Donnelly, C.A.; Gettinby, G.; McInerney, J.P. y Woodroffe, R. (2000). Pathogenesis and diagnosis of infections with *Mycobacterium bovis* in cattle. *The Veterinary Record.* 146: 236-242.
- Moussú**, G. y Mantoux, C. (1908). *Compt. Rend. Acad. d. sc.* 147: 502-504. Citado por: Feldman, W.H. Y Fitch, C.P. (1936). Histologic features of the intradermic reaction to tuberculin in cattle. *Arch. Pathol.* 22: 495-509.

Mouriño, M.; Oracau, A.; Jané, R.; Escribano, M.; Caylá, J.A.; Solé, N.; del Baño, L.; Quintero, S.; Ferrer, M.D.; Mangues, J.; Guerrero, R.A. y Martín, V. (2011). Concordancia de las pruebas de tuberculina e interferón gamma en población reclusa. *Rev. Esp. Sanid. Penit.* 13: 15-20.

Muirhead, R.H.; Gallagher, J. y Burn, K.J. (1974). Tuberculosis in wild badgers in Gloucestershire: epidemiology. *Veterinary Record.* 95: 552-555.

Mura, M.; Bull, J.; Evans, H.; Boumedine, S.; McMinn, L.; Rhodes, G.; Pickup, R. y Taylor. (2006). Replication and Long-term persistence of bovine and human strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* within *Acanthamoeba polyphaga*. *applied and environmental microbiology.* 72: 854-859.

Muskens, J.; Bakker, D.; De Boer, J. y Keulen, L. (2000). Paratuberculosis infection in sheep of farms with paratuberculosis infected cattle in the Netherlands. *Proc. VI Int. Coll. PTBC.* 213: Melbourne, Australia.

Muskens, J.; Mars, M.H.; Elbers, A.R.; Van Maanen, K. y Bakker, D. (2003). The results of using faecal culture as confirmation test of paratuberculosis-seropositive dairy cattle. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health.* 50: 231-234.

Nain, S.P.S.; Chandiramani, N.K.; Kulshreshtha, R.C. y Chugh, S.K. (1985). Studies on tuberculine and johnin reactors- a preliminary report. *Indian. J. Vet.* 62: 643-646.

Naranjo, V.; Gortazar, C.; Vicente, J. y de la Fuente, J. (2008). Evidence of the role of European wild boar as a reservoir of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Vet. Microbiol.* 127: 1-9.

Nebbia, P.; Robino, P.; Ferroglio, E.; Rossi, L.; Meneguz, G. y Rosati, S. (2000). Paratuberculosis in red deer (*Cervus elaphus hippelaphus*) in the western Alps. *Vet. Res. Commun.* 24: 435-443.

Neil, S.D. y Pollock, M. (2000). Testing for bovine tuberculosis: more than skin test. *Vet. J.* 160: 3-5.

Nieberle, K. (1931). *Ergeb. Allg. Path. Anat.* 25: 631. Citado por: Jensen, R. y Mackey, D.R. (1979). Diseases of feedlot cattle. 3rd. ed. Lea & Febiger, Philadelphia.

Nieberle, K. y Cohrs, P. (1966). Tuberculosis. En: Textbook of the special pathological anatomy of domestic animals. Londres, Reino Unido.

Nielsen, S.S.; Kolmos, B. y Christoffersen, A.B. (2004). Comparison of contamination and growth of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* on two different media. *J. Appl. Microbiol.* 96: 149-153.

Nordlund, K.V.; Goodger, W.J.; Pelletier, J. y Collins, M.T. (1996). Associations between subclinical paratuberculosis and milk production, milk components, and somatic cell counts in dairy herds. *J. Am. Vet. Med. Asoc.* 208: 1872-1876.

NORMA Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-1993, Para la prevención y control de la tuberculosis en la atención primaria a la salud.

NORMA Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995, Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina.

NORMA Oficial Mexicana NOM-194-SSA2-2004, Productos y servicios. Especificaciones sanitarias en los establecimientos dedicados al sacrificio y faenado de animales para abasto, almacenamiento, transporte y expendio. Especificaciones sanitarias de producto.

Office International des Epizooties. (2009). Bovine tuberculosis. *Manual of diagnostic tests and vaccine for terrestrial animals.* 1-16.

Oliveira, P.R.; Reis, D.O.; Coelho, H.E.; Lúcio, W.F. y Barbosa, F.C. (1986). Prevalencia da tuberculose em caracas e vísceras de bovinos abatidos em Uberlândia. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* 38 (6): 965-971.

Bibliografía

- Oliveira, P.R. de Ribeiro, S.C. DE A.; García, C.A. y Reis, D. de O. (1999).** *Bioscience Journal*. 15: 39-48.
- Olsen, I.; Tryland, M.; Wiker, H.G. y Reitan, L.G. (2001).** Elevated antibody responses in patients with Chron's disease against a 14-kDa secreted protein purified from *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*. *Scand. J. Immunol.* 53: 198-203.
- Olsen, I.; Sigurdardóttir, G. y Djonne, B. (2002).** Paratuberculosis with special reference to cattle. A review. *Vet. Q.* 24: 12-28.
- O'Reilly, L.M. (1969).** Tuberculosis eradication- some problems of the post attestation era. *Irish Vet. J.* 23: 140-148.
- O'Reilly, L.M (1993a).** The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man. En: "Mycobacteriosis de los animales domésticos: Tuberculosis, Paratuberculosis" Curso de post-grado de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza.
- O'Reilly, L.M. (1993b).** Specificity and sensitivity of tuberculin tests: a review. En: Micobacteriosis de los animales domésticos: Tuberculosis, Paratuberculosis. Curso de post-grado de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza.
- O'Reilly, L.M. y Daborn, C.J. (1995).** The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tubercle and Lung Disease*. 6: 1-46.
- Outteridge, P.M. y Lepper, A.W.D. (1973).** The detection of tuberculin-sensitive lymphocytes from bovine blood by uptake of radio-labelled nucleosides. *Res. Vet. Sci.* 14: 296-305.
- Ott, S.L.; Wells, S.J. y Wagner, B.A. (1999).** Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. *Prev. Vet. Med.* 40: 179-192.
- Ozbek, A.; Michel, F.C.; Strother, M.; Motiwala, A.S.; Byrum, B.R.; Shulaw, W.P.; Thornton, C.G. y Sreevatsan, S. (2003).** Evaluation of two recovery methods for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by PCR: direct-dilution-centrifugation and C (18)- carboxypropylbetaine processing. *FEMS Microbiol. Lett.* 229: 145-151.
- Pak, S.L.; Kim, D. y Salman, M. (2003).** Estimation of paratuberculosis prevalence in dairy cattle in a province of Korea using an enzyme-linked immunosorbent assay: application of Bayesian approach. *J. Vet. Sci.* 4: 51-56.
- Paling, R.W. Waghela, S.; Macowan, K..J. y Heath, B.R. (1988).** The occurrence of infectious diseases in mixed farming of domesticated wild herbivores and livestock in Kenia. II. Bacterial diseases. *J. Wildl. Dis.* 24: 308-316.
- Pallaske, G. (1962).** Die Tuberkulose deer lunge. En: "Handbuch der speziellen Pathologischen Anatomie der Haustiere" (E. Joest, ed.). pp. 238-276. Verlag Paul Parey, Berlin.
- Palmer, M.V. (2007).** Tuberculosis: a reemerging disease at the interface of domestic animals and wildlife. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 315: 195-215.
- Paolicchi, F.A.; Zumarraga, M.J.; Gioffre, A.; Zamorano, P.; Morsella, C. Verna, A. y Cataldi, A. (2003).** Application of different methods for the diagnosis of paratuberculosis in a dairy cattle herd in Argentina. *J. Vet. Med.* 50: 20-26.
- Parish, T. y Stoker, D.G. (1998).** Methods in molecular biology. *Micobacteria protocols. New Jersey*. Pp. 358-371.

- Parra, A.;** García, A.; Inglis, N.F.; Tato, A.; Alonso, J.M.; Hermoso de Mendoza, M.; Hermoso de Mendoza, J. y Larrasa, J. (2006). An epidemiological evaluation of *Mycobacterium bovis* infections in wild game animals of the Spanish Mediterranean ecosystem. *Res. Vet. Sci.* 80: 140-146.
- Pavlík, I.;** Veselý, T.; Bartl, J.; Horvathova, A.; Martlová, L.; Vrbas, V.; Valent, L.; Miskovic, P. y Hirko, M. (1999). Reability of diagnosis methods (clinical examination, faecal culture, skin and serological test) for paratuberculosis of cattle and sheep during the 1988-1998 eradication an control programme. *Proc. VI Int. Coll. PTBC.* 371-383. Melbourne, Australia.
- Pavlík, I.;** Rozsypalová, Z.; Veselý, T.; Bartl, J.; Martlová, L.; Vrbas, V.; Valent, L.; Rajský, D.; Mracko, I.; Hirko, M. y Miskovic, P. (2000). Control of paratuberculosis in five cattle farms by serological test and faecal culture during the period 1990-1999. *Vet. Med.-Czech.* 45: 61-70.
- Payeur, B.;** Jarnagin, L.; Marquardt, G.; Sharper, A. y Martin, M. (1993). Manual of laboratory methods in veterinary. Micobacteriology for the isolation and identification of Mycobacteria. *Aes, Iowa. Departament of Agriculture, animal and plant health inspection service. Veterinary services.*
- Payne, J.M. y Rankin, J.D.** (1961a). A comparison of the pathogenesis of experimental Johne's disease in calves and cows. *Res. Vet. Sci.* 2: 175-179.
- Payne, J.M. y Rankin, J.D.** (1961b). The pathogenesis of experimental Johne's disease in calves. *Res. Vet. Sci.* 2: 167-174.
- Pearson, J.K.L. y McClland, T.G.** (1955). Uterine infection and congenital Johne's disease in cattle. *Vet. Rec.* 67: 615-616.
- Pérez-Arellano, J.L.;** Sánchez, O.; Hernández- Cabrera, M. y Moreno- Maroto, A.A. (2005). Situación actual y perspectivas clínicas de la tuberculosis. Problemas terapéuticos. *Enf. Emerg.* 1: 6-11.
- Pérez-Guerrero, L.;** Milián-Suazo, F.; Arriaga-Díaz, C.; Romero-Torres, C. y Escartín-Chávez, M. (2008). Epidemiología molecular de las tuberculosis bovina y humana en una zona endémica de Querétaro, México. *Salud Pub. Méx.* 50: 286-291.
- Pérez, V.;** García Marín, J.F.; Peris, B.; Badiola, J.J. y Juste, R.A. (1990). Detección de *M. paratuberculosis* en secciones de tejido mediante la técnica de Avidina-Biotina-Peroxidasa. Estudio comparativo con la técnica de Ziehl-Neelsen. *Informes técnicos de Departamento de Agricultura y Pesca del Gobierno del País Vasco,* nº 34: 30-34.
- Pérez, V.;** Bolea, R.; Chávez, G.; Cortabarría, N.; Juste, R.A.; Badiola, J.J. y García Marín, J.F. (1994a). Efficiency of PCR and culture in the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in tissue samples of sheep. En: Chiodini, R.J.; Collins, M.T; Bassey, E.O.E. (Eds.). *Proc 4th Int. Coll. PTBC. IAP.* Providence. EEUU. 97-100.
- Pérez, V.;** Chávez, G.; Gutiérrez, M.; Tellechea, J.; Badiola, J.J. y García Marín, J.F. (1994b). Evaluation of the AGID and γ -interferon test in lambs infected with *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. En: Chiodini, R.J.; Collins, M.T; Bassey, E.O.E. (Eds.). *Proc 4th Int. Coll. PTBC. IAP.* Providence. EEUU: 91-95.
- Pérez, V.;** García Marín, J.F. y Badiola, J.J. (1996). Description and classification of different types of lesion associated with natural paratuberculosis infection in sheep. *J. Comp. Path.* 114: 107-122.
- Pérez, V.;** Tellechea, J.; Badiola, J.J.; Gutiérrez, M. y García Marín, J.F. (1997). Relation between serologic response and pathologic findings in sheep with naturally acquired paratuberculosis. *Am. J. Vet. Res.* 58: 799-803.

Bibliografía

Pérez, V.; Tellechea, J.; Corpa, J.M.; Gutiérrez, M. y García Marín, J.F. (1999). Relations between pathologic findings and cellular immune responses in sheep with naturally acquired paratuberculosis. *Am. J. Vet. Res.* 60: 123-127.

Pérez, V.; Corpa, J.M. y García Marín, J.F. (2000). El cuadro clínico y lesional de la paratuberculosis bovina. *Paratuberculosis BOVIS*. 93: 39-47.

Pérez, V.; Moreno, O.; Muñoz, M.; García-Pariente, C.; Benavides, J.; Delgado, L.; González, J.; Mencía, L.; Fuertes, M.; García-Marín, J.F. y Ferreras, M.C. (2009). Diagnosis of paratuberculosis in slaughtered calves in the northwest of Castilla y León (Spain) by pathological methods. 10th International colloquium on paratuberculosis. Minneapolis, Minnesota, EEUU.

Peris, B. (1992). Contribución al conocimiento de los aspectos inmunopatológicos de la paratuberculosis ovina mediante el estudio de la respuesta humoral y celular local. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.

Persing, D.H. (1993). In vitro nucleic acid amplification. En: *Diagnostic molecular microbiology: principles and applications*. Am. Soc. Microbiol. 51-87. Washington D.C.

Pfeiffer, D.U. y Morris, R.S. (1991). A longitudinal study of bovine tuberculosis in possums and cattle. En: "Symposium on Tuberculosis" (Publication No. 132). Veterinary Continuing Education, Palmerton North N.Z. pp 17-39. Citado por: Morris, R.S., Pfeiffer, D.U. y Jackson, R. (1994). The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. *Vet. Microbiol.* 40: 153-177.

Pillai, S.R.; Jayarao, B.M.; Gummo, J.D.; Hue, E.C.; Tiwari, D.; Stabel, J.R. y Whitlock, R.H. (2001). Identification and sub-typing of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* by randomly amplified polymorphic DNA. *Vet. Microbiol.* 79: 275-284.

Plante, Y.; Remenda, B.W.; Chelack, B.J. y Haines, D.M. (1996). Detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in formalin-fixed paraffin-embedded tissues by the polymerase chain reaction. *Can. J. Vet. Res.* 60: 115-120.

Pollock, J.M.; Rodgers, J.D.; Welsh, M.D. y McNair, J. (2006). Pathogenesis of bovine tuberculosis: the role of experimental models of infection. *Vet. Microbiol.* 120: 141-150.

Potel, K. (1974). La inflamación. En: Tratado de anatomía patológica general veterinaria. *Acribia*. 221-272. Zaragoza, España.

Poumián, A.M. (2000). La tuberculosis bovina como zoonosis. Boletines del sistema nacional de vigilancia epidemiológica, SSA.

Portilla, M.M.E. (2007). Uso de la secuencia de inserción RvD1 para la identificación de *M. bovis*. Tesis de Maestría. FMVZ. Universidad Veracruzana.

Pradenas, M.; Kruze, J. y Schaik, G. (2008). Sensibilidad del cultivo de pool fecal para detectar infección por *Mycobacterium avium* sub. *paratuberculosis* en rebaños bovinos de leche y su relación con la prueba de ELISA. *Arch. Med. Vet.* 40, 31-37.

Prat, A.C.; Domínguez, B.J. y Auxina, R.B. (consult.2010). *Mycobacterium bovis*. En línea consultada: abril del 2010. http://www.seimc.org/control/revi_micobac/pdf/Mbovis.

Pritchard, D.G. (1988). A century of Bovine Tuberculosis 1888-1988: Conquest and Controversy. *J. Comp. Pathol.* 99: 357-398.

Radostits, O.M.; Blood, D.C. y Gay, C.C. (1994). Veterinary Medicine, 3^a ed. Baillière Tindall. London.

- Raizman, E.A.;** Wells, S.J.; Godden, M.; Fetrow, J.; Friendshuh, K. y Oakes, J. (2004). Characterization of Minnesota dairy herds participating in a John's disease control program and evaluation of the program risk assessment tool. En línea consultado: el 13 de septiembre del 2011. www.elsevier.com/locate/prevetmet.
- Raizman, E.A.;** Fetrow, J.P. y Wells, S.J. (2009). Loss of income from cows shedding *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* prior to calving compared with cows not shedding the organism on two Minnesota dairy farms. *J. Dairy Sci.* 92: 4929-4936.
- Ramírez, C.I.;** Santillán, F.M.; Arellano, R.B.; Morales, A.F. y Tenorio, G.V. (2006). Detección de secuencias de *Mycobacterium bovis* a partir de ADN de moco nasal de caprinos inoculados experimentalmente. *Vet. Méx.* 2: 191-196.
- Ramírez, N.V.;** Rodríguez, B. y Fernández, J. (2011). Diagnóstico clínico e histopatológico de paratuberculosis bovina en un hato lechero en Colombia. *Rev. MVZ Córdoba.* 16(3): 2742-2753.
- Rankin, J.D.** (1961). The experimental infection of cattle with *Mycobacterium johnei*. *J. Comp. Path.* 71: 6-15.
- Rastogi, N.;** Legrand, E. y Sola, C. (2001). The micobacteria : an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Rev. Sci. Tech.* 20: 21-54.
- Rayja, B.S. y Singh, C.M.** (1961). Studies on the pathology of John's disease in sheep. III. Pathologic changes in sheep with naturally occurring infections. *Am. J. Vet. Res.* 22: 189-203.
- Rebhun, W.C.** (1995). Infectious diseases of the gastrointestinal tract. *En: Diseases of dairy cattle.* Ed. Williams Wilkins. 1: 208-213. Baltimore, Maryland, E.E.U.U.
- Reddacliff, L.A.;** Vadali, A. y Whittington, R.J. (2003). The effect of decontamination protocols on the numbers of sheep strain *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from tissues and faeces. *Vet. Microbiol.* 95: 271-282.
- Reddy, K.P.;** Sriraman, P.K.; Gopal Naidu, N.R. y Rama Rao, P. (1984). Pathology of John's disease in sheep. *Indian Vet. J.* 61: 159-164.
- Reichel, M.P.;** Kittelberger, R.; Penrose, M.E.; Meynell, R.M.; Cousins, D.; Ellis, T.; Mutharia, L.M.; Sugden, E.A.; Johns, A.H. y de Lisle, G.F. (1999). Comparison of serological test and faecal culture for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle and analysis of the antigens involved. *Vet. Microbiol.* 66: 135-150.
- Renwick, A.R.;** White, P.C. y Bengis, R.G. (2007). Bovine tuberculosis in southern African wildlife: a multi-species host-pathogen system. *Epidemiol. Infect.* 135(4): 529-540.
- Retamal, P. y Abalos, P.** (2004). Comparación del ensayo interferón gamma bovino con técnicas tradicionales para el diagnóstico de infección con *Mycobacterium bovis* en la región metropolitana de Chile. *Rev. Col. Cienc. Pec.* 17: 223-230.
- Reynolds, J.D. y Morris, B.** (1983). The evolution and involution of Peyer's patches in fetal and postnatal sheep. *Eur. J. Immunol.* 13: 627-635.
- Riccetti, R.V.;** Vasconcellos, S.A.; Ito, F.H. y Cortes, J.A. (1989). Investigacao epidemiológica sobre as zoonoses de mayor constatacao em matadouros. II Bovinos. *Rev. Fac. Med. Vet. Zoot. Uni. Sao Paulo.* 25: 61-68.
- Richards, W.D.** (1990). A new, inexpensive tests for detecting paratuberculosas in dairy herds. *Ptbc. Newslett.* 2: 7-8.

Bibliografía

- Ridge, S.E.** (1993). Cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples by using elements of the Roche MB Check system. *J. Clin. Microbiol.* 31: 400-405.
- Ridge, S.E.;** Morgan, I.R.; Sockett, D.C.; Collins, M.T.; Condrón, R.J.; Skilbeck, N.W. y Webber, J.J. (1991). Comparison of the Johne's absorbed EIA and the complement-fixation test for the diagnosis of Johne's disease in cattle. *Aust. Vet. J.* 68: 253-257.
- Ridley, D.S.** (1983). The histopathological spectrum of the mycobacterioses. En "The biology of the micobacteria. Immunological and environmental aspects". C. Ratledge y J. Stanford eds. 2: 129-171. Academic Press Inc., London.
- Ritchie, J.N.** (1959). Eradication of bovine tuberculosis. *Infectious diseases of animals.* 2: 713-739. Citado por: Pritchard, D.G. (1998). A century of bovine tuberculosis 1888-1988: Conquest and controversy. *J. Comp. Patho.* 99: 357-398.
- Rivera, S.;** Jiménez, J.F. y Deward, J. (2009). Valoración de las pruebas diagnósticas para tuberculosis bovina en un rebaño ubicado en zona de alta incidencia del estado de Zulia, Venezuela. *Rev. Cient.* 19: 566-575.
- Rivera, S. y** Giménez, J.F. (2010). La tuberculosis bovina en Venezuela: patogénesis, epidemiología, respuesta inmunitaria y nuevas alternativas para el diagnóstico. *Rev. Vet.* 11: 1695-7504.
- Robinson, M.;** O'Brien, R.; Mackintosh, C. y Griffin, J.F. (2008). Differential immune responses of red Deer (*cervus elaphus*) following experimental challenge with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Clin. Vaccine Immunol.* 15: 963-969.
- Roca Soler, R.** (1935). Paratuberculosis en una vaca. *Rev. Hig. San. Pecu.* 25: 839.
- Roitt, I.M.;** Brostoff, J. y Male, D.K. (1991). Inmunología 2ª ed. Salvat Editores, Barcelona.
- Rothel, J.S.;** Jones, S.L.; Corner, L.A.; Cox, J.C. y Wood, P.R. (1990) A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon-gamma and its use for the detection of tuberculosis in cattle. *J. Aust. Vet.* 67: 134-137.
- Ryan, T.G.;** Livingston, P.G.; Ramsey, D.S.; de Lysle, G.V.; Nugent, G.; Collins, D.M. y Buddle, B.M. (2006). Advances in understanding disease epidemiology and implications for control and eradication of tuberculosis in livestock: the experience from New Zealand. *Vet. Microbiol.* 112: 211-219.
- SAGARPA.** (2013). Situación actual de tuberculosis bovina (TBB) en la República Mexicana. <http://www.sagarpa.gob.mx.ganaderia>,
- Sánchez, V.A.;** Arráiz, R.N.; Becerra, R.L.; Faria, N.; Montero, U.M.; Oviedo, B.A.; Zambrano, N.S.A.; Boscán, O.J.; Molero, S.G. y Pino, R.D. (2009). Infección por *Mycobacterium avium* sub. *paratuberculosis* en un rebaño Criollo Limonero. *Rev. Cient.* 21: 555-565.
- Sanna, E.;** Woodall, C.J.; Watt, N.J.; Clarke, C.J.; Pittau, M.; Leoni, A. y Nieddu, A.M. (2000). In situ-PCR for the detection of *Mycobacterium paratuberculosis* DNA in paraffin-embedded tissues. *Eur. J. Histochem.* 44: 179-184.
- Sanson, R.L.** (1988). Tuberculosis in goats. *Surveillance* 15: 7-8.
- Santillán, F.M.A.** (2008). Detección de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*, por medio de PCR-anidada a partir de muestras de heces de ovinos. *Vet. Méx.* 39 (4).
- Santos, N.;** Correia-Neves, M.; Ghebremichael, S.; Kallenius, G.; Svenson, S.B. y Almeida, V. (2009). Epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection in wild boar (*Sus scrofa*) from Portugal. *J. Wildl. Dis.* 45: 1048-1061.

- Saxegaard, F.** (1990). Experimental infection of calves with an apparently specific goat-pathogenic strain of *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Comp. Path.* 102: 149-156.
- Schulaw, W.P;** Bech-Nielsen, S.; Rings, D.M.; Getzy, D.M. y Woodruff, T.S. (1993). Serodiagnosis of paratuberculosis in sheep by use of agar gel immunodiffusion. *Am. J. Vet. Res.* 54: 542-550.
- Schulz, L.C.** y Trautwein, G. (1985). Formas especiales de inflamación. En: Kitt, T., Schulz, L.C. Tratado de anatomía patológica general. Ed. Labor.
- Scott, P.R.;** Clarke, C.J. y King, T.J. (1995). Serum protein concentrations in clinical cases of ovine paratuberculosis (Johne's disease). *Vet. Rec.* 137: 173.
- Scott, H.M.;** Fosgate, G.T.; Libal, M.C.; Snedd, L.W.; Erol, E.; Angulo, A.B. y Jordan, E.R. (2007). Field testing of an enhanced direct-fecal polymerase chain reaction procedure, bacterial culture of feces, and a serum enzyme-linked immunosorbent assay for detecting *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* infection in adult dairy cattle. *Am. J. Vet. Res.* 68: 236-245.
- Seaman, J.T.;** Gardner, L.A. Dent, C.H. (1981). Johne's disease in sheep. *Aust. Vet. J.* 57: 102-103.
- Seitz, S.E.;** Heider, L.E.; Heuston, W.D.; Bech-Nielsen, S.; Rings, D.M. y Spangler, L. (1989). Bovine fetal infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 194: 1423-1426.
- Semret, M.;** Alexander, D.C.; Turenne, C.Y.; De Hass, p.; Overduin, P.; Van Sooligen, P.; Cousins, D. y Behr, M. A. (2005). Genomic polymorphisms for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* diagnostics. *J. Clin. Med.* 43(8): 3704-3712.
- Sergeant, E.S.;** Marshall, D.J.; Eamens, G.J.; Kearns, C. y Whittington, R.J. (2003). Evaluation of an absorbed ELISA and an agar-gel immune-diffusion test for ovine paratuberculosis in sheep in Australia. *Prev. Vet. Med.* 61: 235-248.
- Sevilla, A.I.** (2007). Caracterización molecular detección y resistencia de *Mycobacterium avium* sub. *paratuberculosis*. *Tesis de Doctorado*. Universidad del país Vasco.
- Sherman, D.M.** (1985). Current concepts in Johne's disease. *Med. Vet. Small. Anim. Clin.* 80: 77-84.
- Sherman, D.M.;** Markham, R.J.F. y Bates, F. (1984). Agar gel immunodiffusion test for diagnosis of clinical paratuberculosis in cattle. *JAVMA.* 185: 179-182.
- Sherman, D.M.;** Gay, J.M.; Bouley, D.S. y Nelson, G.H. (1990). Comparison of the complement-fixation and agar gel immunodiffusions tests for diagnosis of subclinical bovine paratuberculosis. *Am. J. Vet. Res.* 51: 461-465.
- Shinnick, T.M.** y Good, R.C. (1994). Mycobacterial taxonomy. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 13: 884-901.
- Shirakawa, T.;** Enomoto, T.; Shimazu, S. y Hopkin, J. (1997). The inverse association between tuberculin response and atopic disorder. *Science.* 275: 77-79.
- Sigurdardóttir, Ó.G.;** Press, C.M. y Evensen, O. (2001). Uptake of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* through the distal small intestinal mucosa in goats. An ultrastructural study. *Vet. Pathol.* 38: 184-189.
- Simpson, C.F.** (1966). Electron microscopy of arteriosclerosis in cows with Johne's disease. *Am. J. Vet. Res.* 27: 1197-1204.

Bibliografía

- Singh, S.V.** y Singh, N. (2000). Effect of climate on Johne's disease incidence in goat herds. *Ind. J. Anim. Sci.* 70: 492-493.
- Singh, P.K.;** Singh, S.V.; Kumar, H.; Sohal, J.S. Y Singh, A.V. (2010). Diagnostic application of IS900 PCR using blood as a source sample for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in early and subclinical cases of caprine paratuberculosis. *Vet. Med. Int.* 2010: 748621.
- Skerman, V.B.D.;** McGowan, V. y Sneath, P.H.A. (1980). Approved lists of bacterial names. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30: 225-420.
- Slana, I.;** Paolicchi, F.; Janstova, B.; Navratilova, P. y Pávlík, I. (2008). Detection methods for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk and milk products: a review. *Vet. Med.* 53: 283-306.
- Smith, I.** (2003). *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin. Microbiol. Rev.* 16: 463-96.
- Smith, N.H.;** Gordon, S.V.; de la Rúa-Domenech, R.; Clifton-Hadley, R.S. y Hewinson, R.G. (2006). Bottlenecks and broomsticks: the molecular evolution of *Mycobacterium bovis*. *Nat. Rev.; Microbiol.* 4: 670-681.
- Smyth, R.H.** y Christie, G.J. (1950). Some observations on Johne's disease with a further note on the examination of faecal samples. *Vet. Rec.* 62: 429-450.
- Snider, T.G.;** Olcott, B.M.; Kreeger, J.M.; Himes, M.E.; Turnquist, S.E.; Vance, T.L. y Farrar, R.G. (1992). The immunopathogenesis of ruminants paratuberculosis. *Proc. III Int. Coll. PTBC.* 317-325. Orlando, E.E.U.U.
- Sobrino, R.;** Martín-Hernando, M.P.; Vicente, J.; Aurtenetxe, O.; Garrido, J.M. y Gortázar, C. (2008). Bovine tuberculosis in a badger (*Meles meles*) in Spain. *Vet. Rec.* 163(5): 159-160.
- Sockett, D.C.;** Conrard, T.A.; Thomas, C.B. y Collins, M.T. (1992). Evaluation of four serological tests for bovine paratuberculosis. *J. Clin. Microb.* 30: 1134-1139.
- Solmaz, H.;** İlhan, Z.; Akzakal, A.; Gülhan, T. y Ekín, I.H. (2009). Detection of tuberculosis by tuberculin test ad polymerase chain reaction in Van, Turkey. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 33: 229-233.
- Soto, J.P.;** Krunze, J. y Leyva, S. (2002). Comparación de tres métodos diagnósticos de paratuberculosis bovina en rebaños lecheros infectados. *Arch. Med. Vet.* 34 (2): 265-273.
- Sotohy, A.S.** y Awad-Masalmeh, M. (1999). Epidemiological studies on Johne's disease in cattle using the cultura and PCR technique. *Assiut Vet. Med. J.* 41: 101-112.
- Stabel, J.R.** (1996). Production of gamma-interferon by peripheral blood mononuclear cells: an important diagnostic tool for detection of subclinical paratuberculosis. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8: 345-350.
- Stabel, J.R.** (1998). Johne's Disease: A hidden threat. *J. Dairy Sci.*, 81: 283-288.
- Stabel, J.R.** (2000). Transitions in immune responses to *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 77: 465-473.
- Stabel, J.R.** (2006). Host responses to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a complex arsenal. *Anim. Health Res. Rev.* 7: 60-70.
- Stabel, J.R.** y Whitlock, R.H. (2001). An evaluation of a modified interferon-gamma assay for the detection of paratuberculosis in dairy herds. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 79: 69-81.
- Stabel, J.R.;** Goff, J.P. y Kimura, K. (2003). Effects of supplemental energy on metabolic and immune measurements in periparturient dairy cows with Johne's disease. *J. Dairy Sci.* 86: 3527-3533.

- Stabel, J.R.;** Kimura, K. y Robbe-Austerman, S. (2007). Augmentation of secreted and intracellular gamma interferon following johnin purified protein derivative sensitization of cow naturally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19: 43-51.
- Stackebrandt, E.;** Rainey, F.A. y Ward-Rainey, N.L. (1997). Proposal for a new hierarchic classification system. *actinobacteria. classis. Nov. Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 479-491.
- Stamp, J.T. y** Watt, J.A. (1954). Johne´s disease in sheep. *J. Comp. Path.* 64: 26-39.
- Stanford, J.L.** (1983). Immunologically important constituents of micobacteria. Antigens. En: The biology of the micobacteria. Immunological and environmental aspects. Ratledge, C.; Stanford, J.L. (Eds.). Academic press. 3: 85-127. Londres, Reino Unido.
- Stanley, C.;** Richard, J.; Smith, J.; Glenn, M.; Barer, M.; McGowan, E. y Rees, E. (2007). Development of a new , combined rapid method using phage and PCR for detection and identification of viable *Mycobacterium paratuberculosis* bacteria within 48 hours. *App. Env. Microbiol.* 73: 151-1857.
- Stehman, S.M.** (1996). Paratuberculosis in small ruminants, deer, and South American camelids. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 12: 441-455.
- Stevenson, K.;** Alvarez, J.; Bakker, D.; Biet, F.; De Juan, L.; Denham, S.; Dimarelli, Z.; Dohmann, K.; Gerlach, G.F.; Heron, L.; Kopečna, M.; May, L.; Pavlik, L.; Sharp, J.M.; Thibault, V.C.; Willemsen, P.; Zadocks, R. N. y Greig, A. (2009). Occurrence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* across host species and European countries with evidence for transmission between wildlife and domestic ruminants. *BMC. Microbiol.* 9: 212.
- Storset, A.K.;** Hasvold, H.J.; Valheim, M.; Brun-Hansen, H.; Berntsen, G.; Whist, S.K.; Djonne, B.; Press, C.M.; Holstad, G. y Larsen, H.J. (2001). Subclinical paratuberculosis in goats following experimental infection. An immunological and microbiological study. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 80: 271-287.
- Streeter, R.N.;** Hoffsis, G.F.; Bech-Nielsen, S.; Shulaw, W.P. y Rings, D.M. (1995). Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows. *Am. J. Vet. Res.* 56: 1322-1324.
- Strommenger, B.;** Stevenson, K. y Gerlach, G.F. (2001). Isolation and diagnostic of ISMav2, a novel insertion sequence-like element from *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 196: 31-37.
- Stuart, P.** (1965). Vaccination against Johne´s disease in cattle exposed to experimental infection. *Br. Vet. J.* 121: 289-318.
- Sugden, E.A.;** Corner, A.H.; Samagh, B.S.; Brooks, B.W.; Turcotte, C.; Nielsen, K.H.; Stewart, R.B. y Duncan, J.R. (1989). Serodiagnosis of ovine paratuberculosis, using lipoarabinomannan in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J.Vet. Res.* 50: 850-854.
- Surujballi, O.;** Lutze-Wallace, C.; Turcotte, C.; Savic, M.; Stevenson, D.; Romanowska, A.; Monagle, W.; Berlie-Surujballi, G. y Tangorra, E. (2009). Sensitive diagnosis of bovine tuberculosis in a farmed cervid herd with use of an MPB70 protein fluorescence polarization assay. *The Canadian Journal of Veterinarian Research.* 73: 161-164.
- Sweeney, R.W.** (1996). Transmission of paratuberculosis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 12: 305-312.
- Sweeney, R.W.;** Whitlock, R.H. y Rosenberger, A.E. (1992). *Mycobacterium paratuberculosis* isolated from fetuses of infected cows not manifesting signs of the disease. *Am. J.Vet. Res.* 53: 477-480.

Bibliografía

- Sweeney, R.W.;** Whitlock, R.H.; Buckley, C.L.; Spencer, P.A.; Rosenberger, A.E. y Hutchinson, L.J. (1995). Diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle, using enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. *Am. J. Vet. Res.* 55: 905.
- Talbot, E.A.; Williams, D.L. y Frothingham, R. (1997). PCR identification of *M. bovis* BCG. *J. Clin. Méx.* 35: 566-569.
- Taylor, A.W.** (1951). Varieties of *Mycobacterium johnei* isolated from sheep. *J. Path. Bact.* 63: 333-336.
- Tejedor, M.** (2002). Estudio epidemiológico de la paratuberculosis ovina en la provincia de Segovia. En línea consultado: 27 de junio del 2011. www.ucm.es/BUCM/tesis/19911996/D/AD2002201.pdf.
- Temple, R.M.;** Muscoplat, C.C.; Thoen, C.O.; Himes, E.M. y Johnson, D.W. (1979). Observations on diagnosis tests for paratuberculosis in a deer herd. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 175: 914-915.
- Tessema, M.Z.;** Koets, A.P.; Rutten, V.P. Y Gruys, E. (2001). How does *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* resist intracellular degradation? *Vet. Q.* 23: 153-162.
- Thoen, C.O.;** Jarnagin, J.L. y Richards, W.D. (1975). Isolation and identification of micobacteria from porcine tissue: a three-year summary. *Am. J. Vet. Res.* 36: 1383-1386.
- Thoen, C.O.;** Hall, M.R.; Tannis, A.; Petersburg, S. y Harrington, R. (1983). Detection of mycobacterial antibodies in sera of cattle experimentally exposed to *Mycobacterium bovis* by one of a modified enzyme linked immunosorbent assay. *Proc. XXVI Ann. Assn. Vet. Lab. Diag.* 25-28.
- Thoen, C.O.;** Temple, R.M.S, y Johnson, L.W. (1988). An evaluation of certain diagnostic tests for detecting some immune responses in llamas exposed to *Mycobacterium bovis*. *Proceedings of the 92nd Annual Meeting of the United States Animal Health Association, Little Rock, Arkansas.* 525-533.
- Thomas, G.W.** (1983). Paratuberculosis in a large goat herd. *Vet. Rec.* 113: 464-466.
- Thorel, M.F.** (1984). La paratuberculose caprine. Mise au point et synthese. En: INRA editor. Les maladies de la chavre, 28, pp. 519-527. Maison Alfort, France.
- Thorel, M.F.;** Krichevsky, M. y Levy-Frebault, V.V. (1990). Numerical taxonomy of micobactina-dependent micobacteria, emended description of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. *nov.* and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40: 254-260.
- Thorel, M.F. y** Moutou, F. (1994). Tuberculose et animaux sauvages. *Point Vét.* 26: 27-34.
- Thorensen, O.F.;** Falk, K. y Evenson, O. (1994). Comparison of immunohistochemistry, acid-fast staining, and cultivation for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in goats. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6: 195-199.
- Thrusfield, M.;** Ortega, C.; De Blas, L.; Noordhuizen, J.P. y Frankena, K. (2001). WIN ESPISCOPE 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. *Vet. Rec.* 148: 567-572.
- Tiwari, A.;** John, A.; Leeuwen, V.; Shawn, L.; McKenna, G.; Keefe, G. y Barkema, H. (2006). Johne's disease in Canada part I: clinical symptoms, pathophysiology, diagnosis and prevalence in dairy herds. *J. Can Vet.* 47: 874-882.
- Tizard, I.** (2002). Inmunología veterinaria. 6ª ed. p 371-379. Ed. Mc Graw-Hill Interamericana. España.
- Tolson, J.W. y** Jervois, K.Y.M. (1990). A study to determine the monitoring requirements for the Brucellosis and Tuberculosis Campaign in Australia after 1992. Citado por: Corner, L.A., Wood, P.R., Rothel, J.S. (1991). Reply to the correspondence: Efficiency of inspection procedures for the detection of tuberculous lesions in cattle. *Australian Veterinary Journal.* 68 (6): 218-219.

- Torres, P.** y Kantor, I.N. (1996). Taller: Bases para un sistema de información y vigilancia epidemiológica de la tuberculosis bovina en la República Argentina. *Informe final SENASA, INPPAZ/OPS/OMS*. 3-8.
- Torres, P.** (2010). Vigilancia epidemiológica: importancia de la detección en faena de la tuberculosis bovina. *SENASA*. 1-7.
- Tripathi, B.N.**; Periasamy, S.; Paliwal, O.P. y Singh, N. (2006). Comparison of IS900 tissue PCR, bacterial culture, johnin and serological test for diagnosis of naturally occurring paratuberculosis in goats. *Vet. Microbiol.* 116: 129-137.
- Tweddle, N.E.** y Livingstone, P. (1994). Bovine tuberculosis control and eradication programs in Australia and New Zealand. *Vet. Microbiol.* 40:23-39.
- Twort, F.W.** e Ingram, G.L.Y. (1911). A method for isolating and cultivating the *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis*, Johnne, and some experiments on the preparation of a diagnostic vaccine for pseudotuberculous enteritis of bovines. *Roy. Soc. Proc. B*. 84: 517-542.
- Underwood, S.C.** y Carfagnini, J.C. (2005). Comparación de dos criterios para la interpretación de la prueba tuberculínica cervical comparativa en caprinos. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 25: 199-205.
- Valentin-Weingand, P.** y Goethe, R. (1999). Pathogenesis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in ruminants: still more questions than answers. *Microbes and Infect.* 1: 1121-1127.
- Valheim, M.**; Storset, A.K.; Aleksandersen, M.; Brun-Hansen, H. y Press, C.M. (2002). Lesions in subclinical paratuberculosis of goats are associated with persistent gut-associated lymphoid tissue. *J. Comp. Pathol.* 127: 194-202.
- Vallee, H.** y Rinjard, P. (1926). Etudes sur l'éntérite paratuberculeuse des bovidés. *Rev. Gen. Med. Vet.* 34: 1-9.
- Van der Giessen, J.W.**; Haring, R.M. y Van der Zeijst, B.A. (1994). Comparison of the 23S ribosomal RNA genes and the spacer region between the 16S and 23S rRNA genes of the closely related *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium oarotuberculosis* and the fast-growing *Mycobacterium phlei*. *Microbiology.* 14: 1103-1108.
- Vanechoutte, M.**; de Beenhouwer, H.; Claey's, G.; Verschraegen, G.; de Rouck, A.; Paepe, N.; Elaichouni, A. y Portaels, F. (1993). Identification of *Mycobacterium* species by using amplified ribosomal DNA restriction analysis. *J. Clin. Microbiol.* 31: 2061-2065.
- Vanham, G.**; Toossi, Z.; Hirsch, C.S.; Wallis, R.S.; Schwander, S.K.; Rich, E.A. y Ellner, J.J. (1997). Examining a paradox in the pathogenesis of human pulmonary tuberculosis: immune activation and suppression/energy. *Tubercle Lung. Dis.* 78 (3-4): 145-158.
- Van Kruningen, H.J.**; Ruiz, B. y Gumprecht, L. (1991). Experimental disease in young chickens induced by a *Mycobacterium paratuberculosis* isolated from a patient with Crohn's disease. *Can. J. Vet. Res.* 95: 199-202.
- Van Schaik, G.**; Kalis, C.H.; Benedictus, G.; Dijkhuizen, A.A. y Huine, R.B. (1996). Cost benefit analysis of vaccination against paratuberculosis in dairy cattle. *Vet. Rec.* 139: 624-627.
- Van Schaik, G.**; Stehman, S.M.; Shukken, Y.H.; Rossiter, C.R.; Shin, S.J. (2003). Pooled fecal culture sampling for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* at different herd sizes and prevalence. *J. Vet. Diagn. Invest.* 15: 233-241.
- Van Soolingen, D.**; De Haas, P.E.W.; Haagsma, J.; Eger, T.; Hermans, P.W.M.; Ritacco, V.; Alito, A. y Van Embden, J.A.N. (1994). Use of various genetic markers in differentiation of *Mycobacterium bovis* strains

Bibliografía

from animals and humans and for studying epidemiology of bovine tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 32: 2425-2433.

Van Soolingen, D.; Bauer, J.; Ritacco, V.; Liao, S.C.; Pávik, I.; Vincent, V.; Rastogi, N.; Gori, A.; Bodmer, T.; Garzelli, C. y García, M.J. (1998). IS1245 restriction fragment length polymorphism typing of *Mycobacterium avium* isolates: proposal for standardization. *J. Clin. Microbiol.* 36: 3051-3054.

Vannuffel, P.; Gilot, P.; Limbourg, B.; Naerhuyzen, B.; Dieterich, C.; Coene, M.; Machtelinckx, L. y Cocito, C. (1994). Development of species-specific enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Johne's disease in cattle. *J. Clin. Microbiol.* 32: 1211-1216.

Vary, P.H.; Andersen, P.R.; Green, E.; Hermon-Taylor, J. y McFadden, J.J. (1990). Use of highly specific DNA probes and the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in Johne's disease. *J. Clin. Microbiol.* 28: 933-937.

Velarde, F.S.; Morales, L.A.; Garzón, T.J.; Álvarez, O.G.; Aviles, G.M.; Mendoza, D.L.; Félix, A.B.; Robles, C.T.; Velarde, F.J. y Berrelleza, A.T. (2007). Detección mediante PCR de organismos del complejo *M. tuberculosis* en muestras de exudado en ganado bovino. *J. Clin. Med.* 11-16.

Vestal, A.L. (1975). Procedures for the isolation and identification of mycobacteria. *Center for Disease Control, PHS, Atlanta*.

Vicente, J.; Hofle, U.; Garrido, J.M.; Fernández de Mera, I.G.; Juste, R. y Gortázar, C. (2006). Wild boar and red deer display high prevalences of tuberculosis-like lesions in Spain. *Vet. Res.* 37: 107-119.

Villanueva, V. y de Aluja, A. (1998). Estado actual de algunas plantas de sacrificio de animales para consumo humano en México. *Vet. Méx.* 29 (3): 273- 278.

Vitale, F. (1998). Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Cattle by PCR Using Milk, Lymph Node Aspirates and Nasal Swabs. *J. Clin. Microbiol.* 36: 1050-1055.

Vuorinem, P.A.; Uvento, M.R. y Hallstron, O. (1995). Direct detection *M. tuberculosis* complex respiratory specimens by Gene-Probe amplified *M. tuberculosis* direct test and roche amplicor *M. tuberculosis* test. *J. Clin. Microbiol.* 33 (7): 1856-1859.

Wards, B.J.; Collins, D.M. y Liste, G.W. (1995). Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.* 43: 227-240.

Waters, W.; Palmer, M.; Whipple, D.; Carlson, M. y Nonnecke, B. (2003). Diagnostic implication of antigen-induced gamma interferon, nitric oxide, and tumor necrosis factor alpha production by peripheral blood mononuclear cells from *Mycobacterium bovis*- infected cattle. *Clin. Diagn. Lab. Immun.* 10: 960- 66.

Wayne, L.G. y Kubica, G.P. (1986). Family *Micobacteriaceae* Chester, 1987. En: "Bergey" *manual of systematic bacteriology*. Sneath, P.H.A.; Mair, N.S.; Sharpe, M.E.; Holt, J.G. (Eds.). Willians & Wilkins Vol. 2: 1436-1457. Baltimore, E.E.U.U.

Weber, A.; Gurke, R.; Bauer, K. y Schreyer, K. (1992). Bacterial studies on the occurrence of *Mycobacterium paratuberculosis* in fecal samples of zoo ruminants. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 105: 161-164.

Wells, S.J.; Whitlock, R.H.; Linderman, C.J. y Fyock, T. (2002). Evaluation of bacteriologic culture of pooled fecal samples for detection of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.* 63: 1207-1211.

Wells, S.J.; Godden, S.M.; Lindeman, C.J. y Collins, J.E. (2003). Evaluation of bacteriologic culture of individual and pooled fecal samples for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in dairy cattle herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 223: 1022-1025.

- Wells, S.J.**; Michael, T.; Collins, K.S.; Kay, S.; Faaberg, C.; Wees, C.; Tavoranpanich, S.; Petrini, R.; James, E.; Collins, C.N. y Withlock, H. (2006). Evaluation of a rapid fecal PCR test for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy cattle. *Clin. Vacc. Immunol.* 13(10): 1125-1130.
- Whipple, D.L.** y Palmer, M.V. (2000). Reemergence of Tuberculosis in animals in the United States. En: *Emerging Diseases of Animals*. Ed. C. Brown y C. Bolin. ASM Press, Washington, D.C.
- Whipple, D.L.**; Bolin, C.A.; Davis, A.J.; Jarnagin, J.L.; Johnson, D.C.; Nabors, R.S.; Payeur, J.B.; Saari, D.A.; Wilson, A.J. y Wolf, M.M. (1995). Comparison of the sensitivity of the caudal fold skin test and a commercial gamma-interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis. *Am. J. Vet Res.* 56 (4): 415-419.
- Whipple, D.L.**; Bolin, C.A. y Miller, J.M. (1996). Distribution of lesions in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8 (3): 351-354.
- Whist, S.K.**; Storset, A.K. y Larsen, H.J.S. (2000). The use of interleukin-2 receptor expression as a marker of cell-immunity in goats experimentally infected with *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 73: 207-218.
- Whitlock, R.H.** (1998). Johne´s disease (Paratuberculosis): diagnosis tests for individual animal and the herd. En: *ANEMBE* editor. Pp. 69-72. Stiges.
- Whitlock, R.H.** (1999). Enfermedad de Johne (paratuberculosis): Test diagnósticos individuales y a nivel de rebaño. *ANEMBE*. Boletín informativo. 17: 24-26.
- Whitlock, R.H.** y Buergelt, C. (1996). Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract.* 12: 345-356.
- Whitlock, R.H.**; Wells, S.J.; Sweney, R.W. y Van Tiem, J. (2000) ELISA and faecal culture for sensitive and economic detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in flocks of sheep. *J. Clin. Anim. Pract.* 12, 345-356.
- Whittington, R.H.**; Reddacliff, L.A.; Marsh, I.B. y Saunders, V. (1999b). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in formalin-fixed paraffin-embedded intestinal tissue by IS900 polymerase chain reaction. *Aust. Vet. J.* 77: 392-397.
- Whittington, R.J.**; Fell, S.; Walker, D.; McAllister, S.; Marsh, I.; Sergeant, E.; Taragel, C.A.; Marshall, D.J. y Links, I.J. (2000). Use of pooled fecal culture for sensitive and economic detection of *mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* infection in flocks of sheep. *J. Clin. Microbiol.* 38: 2550-2556.
- Whittington, R.J.**; Lloyd, J.B. y Reddacliff, L.A. (2001a). Recovery of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* from nematode larvae cultures from the faeces of sheep with Johne´s disease. *Vet. Microbiol.* 81: 273-279.
- Whittington, R.J.**; Marsh, I.B. y Whitlock, R.H. (2001b). Typing of IS1311 polymorphisms confirms that bison (*Bison bison*) with Paratuberculosis in Montana are infected with a strain of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* distinct from that occurring in cattle and other domesticated livestock. *Mol. Cell. Probes.* 15: 139-145.
- Whittington, R.J.**; Taragel, C.A.; Ottaway, S.; Marsh, I.; Seaman, J. y Fridriksdottir, V. (2001c). Molecular epidemiological confirmation and circumstances of occurrence of sheep (S) strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cases of paratuberculosis in cattle in Australia and sheep and cattle in Iceland. *Vet. Microbiol.* 79: 311-322.
- WHO.** (1994). Report of the WHO group on zoonotic tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) with the participation of FAO: World Health Organization. *Veter. Public. Health*, 1-43.

Bibliografía

WHO. (2009). Global tuberculosis control. WHO/HTM/TB/2009. 411 Geneve: World Health Organization 2009.

Wilesmith, J.W. (1991). Epidemiological methods for investigating wild animal reservoirs of animal disease. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 10: 205–214.

Williams, G.T. y Williams, W.J. (1983). Granulomatous inflammation- a review. *J. Clin. Pathol.* 36: 723-733.

Wobeser, Gary. (2009). Bovine tuberculosis in Canadian wildlife: An updated history. *J. Can. Vet.* 50: 1169-1176.

Wolinsky, E. (1980). Mycobacterium. En: Tratado de Microbiología. (Davis, B.D.; Dulbecco, R.; Eisen, H.N.; Ginsberg, H.S.; Wood, W.B. y McCarthy, M., eds.) pp. 867-892. Salvat Editores, S.A. Barcelona.

Wood, P.R.; Kopsidas, K.; Milner, A.R.; Hill, J.; Gill, I.; Webb, R.; Mack, W.N. y Coates, K. (1989). The development of an in vitro cellular assay for Johne's disease in cattle. En: *Johne's disease: current trends in research, diagnosis and management.* Milner, A.R. y Wood, P.R. (Eds.) CSIRO: 164-167. Melbourne, Australia.

Wood, P.R.; Corner, L.A. y Plackett, P. (1990). Development of a simple, rapid in vitro cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of γ interferon. *Res. Vet. Sci.* 49: 46-49.

Wood, P.R.; Corner, L.A.; Rothel, J.S.; Baldock, C.; Jones, S.L.; Cousins, D.B.; McCormick, B.S.; Francis, B.R.; Creeper, J. y Tweddle, N.E. (1991). Field comparison of the interferon-gamma assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Aust. Vet. J.* 68: 286-290.

Yajko, P.D.M.; Hadley, W.K.; Sanders, C.A.; Nassos, P.S.; Madej, J.J. y Hopewell, P.C. (1995). Clinical utility of a commercial test based on the polimerasa chain reaction for detecting *M. tuberculosis* in respiratory specimens. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 151 (6): 1872-1877.

Yakes, B.; Lipert, J. Bannantine, P. y Porter, D. (2008). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by a sonicate immunoassay based on surface-enhanced raman scattering. *Clin. Vacc. Immunol.* 15(2): 227-234.

Yañez, L.; Jaimes, L. y Olivera, H. (1996). *Mycobacterium bovis* en salud pública: técnicas moleculares en el diagnóstico de la tuberculosis. *Comité.* 9

Yokomizo, Y.; Yugi, H. y Merkal, R.S. (1983). A method of avoiding false positive reactions in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculosis. *Jap. J. Vet. Sci.* 47:111-119.

Yokomizo, Y.; Kishima, M.; Mori, Y. y Nishimori, K. (1991). Evaluation of enzyme-linked immunosorbent Assay in comparison with complement fixation test for the diagnosis of subclinical paratuberculosis in cattle. *J. Vet. Med. Sci.* 53: 577-584.

Zapata, R.; Rodas, G. y Maldonado, E. (2008). Paratuberculosis bovina: situación real de la enfermedad en la ganadería colombiana. *Rev. Colom. Cienc. Pecuaria.* 21(3).

Zendejas, M.H.; Milián S.F.; García, C.L.; Cruz, B.G.; Anaya, E.A.M. y Huitrón, M.G. (2007). La utilidad de los sistemas de información geográfica en la predicción de la distribución regional de la tuberculosis bovina en Jalisco, México. *IMS éx.* 45(3): 279-287.

Zimmer, K.; Dräger, K.G.; Klawonn, W. y Hess, R.G. (1999). Contribution to the diagnosis of Johne's disease in cattle. Comparative studies on the validity of Ziehl-Neelsen staining, faecal culture and a commercially available DNA-probe test in detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in faeces from cattle. *J. Vet. Med. B.* 46: 137-140.

