



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE AGRONOMÍA
COORDINACIÓN DE POSGRADO
MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA



**DIAGNÓSTICO DE LA PARATUBERCULOSIS OVINA EN LOS REBAÑOS
DEL MUNICIPIO DE VILLA DE RAMOS, SAN LUIS POTOSÍ**

Por:

Jessica Janette Sánchez Govea

**Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en
Producción Agropecuaria**

Profesor Consejero:

M.C. Felipe de Jesús Morón Cedillo

Director de Tesis:

Dr. César Cortez Romero

Asesor:

Dr. Glafiro Torres Hernández



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE AGRONOMÍA
COORDINACIÓN DE POSGRADO
MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA



**DIAGNÓSTICO DE LA PARATUBERCULOSIS OVINA EN LOS REBAÑOS
DEL MUNICIPIO DE VILLA DE RAMOS, SAN LUIS POTOSÍ**

Por:

Jessica Janette Sánchez Govea

**Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en
Producción Agropecuaria**

El trabajo titulado **“Diagnóstico de la Paratuberculosis ovina en los rebaños del municipio de Villa de Ramos, San Luis Potosí”** fue realizado por: Jessica Janette Sánchez Govea como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Producción Agropecuaria en el área de Especialidad en Producción de Pequeños Rumiantes, fue revisado y aprobado por el suscrito comité de tesis.

M.C. Felipe de Jesús Morón Cedillo

Profesor Consejero

Dr. César Cortez Romero

Director de Tesis

Dr. Glafiro Torres Hernández

Asesor

En el ejido Palma de la Cruz, municipio de Soledad de Graciano Sánchez S.L.P. a los once días del mes de octubre de 2012.

DEDICATORIA

Cuando menos lo esperamos, la vida nos coloca delante un desafío que pone a prueba nuestro coraje y nuestra voluntad de cambio.

A mi madre

Gracias por darme tu mano cuando lo necesité; por estar siempre cerca, y aún así permitir que tomara mis propias decisiones, mis propios riesgos.

A mi padre

Gracias por enseñarme a volar, y dejarme volar por mí misma, gracias por enseñarme a soñar, y dejarme soñar a mi sola, y gracias por enseñarme a vivir, y dejarme vivir.

A mis hermanas

Porque el amor de hermanas no tiene sustituto, porque me conocen tal y como soy, porque me aceptan a pesar de todas mis faltas, porque posiblemente pensarán “no nos queda de otra”, pero siempre estarán conmigo.

A mi novio

Cuando todos parecían alejarse de mí y me daban la espalda fuiste el único que se puso de pie y me dijo que me acompañaría hasta el fin del mundo de ser necesario, te doy las gracias por estar junto a mí y te prometo hacer lo mismo por ti.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de San Luis Potosí y Facultad de Agronomía

Por haberme dado la oportunidad de prepararme profesionalmente y adquirir conocimientos, ofreciendo más que un recinto de estudios, un segundo hogar.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Por la beca otorgada para la realización de mis estudios de posgrado.

A mis maestros

Por brindarme su conocimiento y otorgarme apoyo en el transcurso de mi formación académica.

A mi asesor principal

M.C. Felipe de Jesús Morón Cedillo por compartir sus conocimientos, brindarme apoyo y confianza, le agradezco su dedicación en la elaboración de este proyecto.

A mis asesores

Dr. César Cortez Romeo y Dr. Glafiro Torres Hernández por su colaboración en el desarrollo de esta tesis.

CONTENIDO

DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
CONTENIDO	v
ÍNDICE DE CUADROS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
RESÚMEN	ix
SUMMARY	x
INTRODUCCIÓN	1
Objetivo e Hipótesis	3
REVISIÓN DE LITERATURA	4
Importancia de la Paratuberculosis en la Perspectiva Mundial	5
Paratuberculosis en México.	6
Importancia en la Medicina Humana	7
Origen	8
Descripción de <i>Mycobacterium avium</i> subsp <i>paratuberculosis</i>	8
Etiología	9
Aspectos Inmunológicos	10
Transmisión	11
Patogénesis	13
Signos clínicos	15
Lesiones	17
Diagnóstico	18
Vacuna	21
Factores que Influyen Sobre la Presencia de Paratuberculosis	22
Factores ambientales	22
Manejo de los ovinos y factores nutricionales	22
Evaluación de la infección del rebaño	23
Edad	24
Especies silvestres	24

Incidencia y Prevalencia	26
MATERIALES Y MÉTODOS	28
Localización	28
Animales.	29
Muestreo Sanguíneo.....	29
Método de Diagnóstico Por Inmunodifusión En Gel De Agar (IDAG)	29
Análisis Estadístico.....	30
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
CONCLUSIONES	33
LITERATURA REVISADA	34

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Pruebas empleadas en el diagnóstico de paratuberculosis	20
2. Prevalencia de Map en comunidades de Villa de Ramos, S.L.P.....	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1.	Ubicación municipio de Villa de Ramos, San Luis Potosí 28

RESUMEN

La paratuberculosis es una enteritis granulomatosa de curso crónico ocasionada por *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (Map), afecta a rumiantes domésticos y silvestres. Map es excretada en las heces de animales que desarrollan la enfermedad, y la transmisión de la infección se da mediante la ingestión de alimentos y agua contaminados por heces de animales infectados. Con el objetivo de determinar la presencia de paratuberculosis en ovinos se realizaron pruebas de sangre. Se evaluaron comunidades en el municipio de Villa de Ramos, S.L.P. El tamaño de muestra fue del 10% de la población ovina por comunidad y la obtención de los datos se realizó al azar. Como método de diagnóstico se utilizó la prueba de inmunodifusión en gel de agar. La prevalencia de Map en ovinos encontrada en las comunidades en estudio de Villa de Ramos, SLP, fue de 8.42 %. Las prevalencias fueron de 0.00 hasta 66.66% entre las comunidades encontrándose diferencias significativa ($p = 0.006$). De las ocho comunidades en estudio, se encontraron cinco seropositivas a Map, representando el 80 % de comunidades con presencia de paratuberculosis. Las pérdidas económicas ocasionadas por la enfermedad y su posible vinculación con la enfermedad de Crohn en humanos, determinan la necesidad de ampliar estudios para conocer la situación epidemiológica de la paratuberculosis, con la finalidad de diseñar estrategias de control y prevención acordes con las particularidades de la zona.

SUMMARY

Paratuberculosis is a chronic granulomatous enteritis of chronic course caused by *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (Map), affects domestic and wild ruminants. Map is shed in the feces of animals which develop the disease, and the transmission of the infection occurs through ingestion of food and water contaminated by feces of infected animals. With the aim of determining the presence of paratuberculosis in sheeps, blood tests were performed. Communities were evaluated in the municipality of Villa de Ramos, S.L.P. The sample size was 10% of the sheep population by community and obtaining data was performed randomly. As a diagnostic test was used agar gel immunodiffusion. The prevalence of Map in sheep found in the communities studied of Villa de Ramos, S.L.P., was 8.42%. The frequencies were from 0.00 to 66.66% between communities found significant differences ($p = 0.006$). Of the eight communities studied, we found five seropositive Map, representing 80% of communities with presence of paratuberculosis. Economic losses caused by the disease and its possible link to Crohn's disease in humans, determine the need for further essays to ascertain the paratuberculosis epidemiological situation, in order to design control and prevention strategies with the characteristics of the area.

INTRODUCCIÓN

La paratuberculosis es una enfermedad bacteriana, crónica, contagiosa, de los rumiantes. La enfermedad fue descrita por primera vez en 1895 por Johne y Frothingham como una forma de tuberculosis aviar. Bang aisló el mismo bacilo ácido resistente y sugirió el nombre de paratuberculosis para este padecimiento. La incidencia de esta enfermedad ha ido aumentando en las explotaciones, mas sin embargo las razones de este aumento aun no son claras. Las investigaciones actuales se han enfocado en la vida silvestre como un papel potencial por la cual esta en aumento. Se han aislado conejos, zorros, roedores y córvidos, lo que sugiere que la vida silvestre puede estar involucrada en la perpetuación del ciclo de la enfermedad (Daniels *et al.*, 2011).

En México, Unzueta en 1936, informa la presencia de esta enfermedad en bovinos lecheros, utilizando como método de diagnóstico la aplicación de johnina y tuberculina aviar y también al observar el bacilo al microscopio. El aislamiento del microorganismo a partir de muestras de ganglios mesentéricos e intestino delgado se realizó en 1978. La paratuberculosis, inicialmente reconocida en ganado vacuno, después en ovejas y posteriormente en cabras, se encuentra muy a menudo en rumiantes domésticos y silvestres y presenta una distribución global. Se ha descrito la enfermedad en caballos, cerdos, ciervos y alpacas, y recientemente en conejos, armiños, zorros y comadrejas (Beard *et al.*, 1999).

La paratuberculosis en el ganado ovino y caprino es probablemente el problema más frecuente en la literatura actual. A diferencia del ganado bovino las cabras y ovejas normalmente no muestran signos de diarrea y debido al gradual enflaquecimiento, la enfermedad se pasa por alto en la mayoría de los casos (Khodakaram y Rashidi, 1999).

A pesar que la paratuberculosis o enfermedad de Johne es una enfermedad que se reconoce desde hace más de un siglo y no había mostrado una presencia preponderante en las explotaciones rumiantes, ha incrementado su importancia en los últimos años

dependiendo de los avances que se hacen en el control de otras enfermedades, como brucelosis y tuberculosis. Las dificultades en su diagnóstico han limitado su conocimiento limitado de su distribución geográfica y hoy en día existe en México un creciente interés en conocer más sobre la presencia de la enfermedad y poner en práctica las alternativas para su control. La enfermedad ocurre a nivel mundial con alta frecuencia encaminada al crecimiento de las pérdidas económicas en la industria láctea y cárnica. Se estima que la paratuberculosis no ha alcanzado su distribución potencial y continua expandiéndose. Cuando en un país o región se advierte su efecto ya puede haber un estado de hiperendemia. Pese a la tolerancia ecológica de las ovejas, la ovinocultura encuentra concentrada en las porciones del país con climas templados y semiáridos, posiblemente por razones de índole cultural (Chávez, 1998). Así mas de la mitad del rebaño de ovinos se encuentra en: Estado de México, Hidalgo, Veracruz, Puebla, Jalisco, Zacatecas y Tamaulipas (SAGARPA, 2010).

Objetivo

Diagnosticar la presencia de *Mycobacterium avium* subs. *paratuberculosis* por medio de la prueba de inmunodifusión en gel de agar en ovinos del municipio de Villa de Ramos, S.L.P.

Hipótesis

La paratuberculosis en ovinos no esta presente en el municipio de Villa de Ramos, S.L.P.

LITERATURA REVISADA

Importancia de la Paratuberculosis en la Perspectiva Mundial

La paratuberculosis (Ptb) o enfermedad de Johne, es una enteritis granulomatosa de curso crónico que afecta a rumiantes domésticos (bovinos, ovinos, caprinos), así como también a antílopes, camellos, llamas y otras especies animales. Su distribución es mundial con una prevalencia que varía de 5 a 25 % (Martínez *et al.*, 2012).

La Ptb es endémica a nivel mundial, con altos niveles de prevalencia, fuerte impacto económico e importancia en la salud pública. Las pérdidas económicas acarreadas por la infección afectan a rodeos, bovinos de carne, lecheros y mixtos, por el descenso en la producción láctea, alteraciones reproductivas, mayor incidencia de mastitis, eliminación prematura de animales, pérdida del valor del animal en matadero, pérdida de potencial genético, entre otros. En Argentina las pérdidas económicas en el 2003 se estiman en aproximadamente 28 millones de dólares (Gilardoni y Mundo, 2008).

La paratuberculosis en bovinos causa grandes pérdidas económicas: en Estados Unidos por ejemplo, los productores tienen pérdidas anuales, cercanas a 1.5 billones de dólares y en modelos de regresión de la enfermedad se han estimado pérdidas entre 40 y 227 dólares/ animal/año, basados en el porcentaje de vacas eliminadas con signos clínicos, las pérdidas en producción de leche, las bajas en la eficiencia reproductiva, y las pérdidas en el valor de venta de la canal. Otro estudio indica que las vacas afectadas con esta enfermedad presentan una reducción en la producción entre el 5 y el 15% (Zapata *et al.*, 2011).

En Colombia no se tienen estudios epidemiológicos ni estudios clínicos completos que permitan tener una idea clara sobre la prevalencia de la enfermedad en el país. Los únicos estudios realizados se han hecho en casos clínicos aislados, en los que se ha trabajado sobre la base del aislamiento de los bacilos ácido-alcohol resistentes. La ausencia de una información consolidada en Colombia que permita conocer la prevalencia y la epidemiología de la Ptb, puede ser debida a la dificultad en diagnosticar

los animales portadores y diseminadores de la enfermedad, pues se requiere de pruebas diagnósticas suficientemente sensibles y específicas para detectar los animales infectados en los estados iniciales de la enfermedad, para erradicarla del hato afectado, lo que exigen políticas gubernamentales que implican un alto costo económico y un elevado costo social en potencia. La Ptb es una enfermedad contagiosa que afecta el ganado y otros rumiantes en la gran mayoría de países del mundo, y representa grandes pérdidas económicas a la industria ganadera (Zapata *et al.*, 2011).

Según los datos económicos elaborados por la Comisión Europea, la ganadería ovina y caprina aporta a la Producción Final Agraria de la Unión Europea cerca de 4.000 millones (2.1% del total) en 1993, contribuyendo al mantenimiento de casi un millón de explotaciones, localizadas mayoritariamente en las zonas más desfavorecidas de la Comunidad. La Unión Europea es también la principal área de consumo del mundo de este tipo de carne, siendo deficitaria anualmente en más de 250 t que tiene que importar con destino al Reino Unido (47%), Alemania (14%), Italia(11%), Francia (9%) y Grecia (6%) principalmente (Mainar, 1995).

Teniendo en cuenta que la Ptb es una preocupación potencial para cada país que se encuentre afectado con la enfermedad, se debería promover una perspectiva realista y útil a nivel mundial. Una comprensión completa ayudara a los afectados en varias maneras, ya sea a través de las actividades de regulación, gestión de la ganadería en la medicina, investigación y salud pública (Collins y Manning, 1995).

La Paratuberculosis en México

Países como los Estados Unidos de América, Canadá, Australia, Italia, Francia, España, Holanda, República Checa, Suecia e Israel, cuentan con programas específicos para la prevención y control de la enfermedad, por lo que la iniciativa que se tome en México es de gran relevancia para el futuro cercano (Chávez, 2010).

La Ptb se encuentra ampliamente distribuida en todo el mundo incluyendo México. En nuestro país en estudios llevados a cabo en rastros se ha determinado una gran

prevalencia en el ganado ovino y caprino. Las pérdidas que provoca en la ganadería son debidas principalmente a la muerte o desecho de los animales, así como la disminución de la productividad. Otros problemas asociados son una mayor susceptibilidad a otras infecciones, disminución de la producción de lana y costos elevados por diagnósticos. Se cuenta con información que indica que esta enfermedad es de alta relevancia, ya que conjuntamente con la tuberculosis bovina, la brucelosis y la infestación por garrapatas del género *Boophilus*, contribuye al decremento en la producción e inocuidad de alimentos. En un estudio realizado en 2005, sobre el impacto económico de la Ptb en bovinos lecheros del centro del país, se calculó que este ascendía a \$10,345.00 pesos por vaca al año, con una prevalencia del 8.87 % en una población de casi 30,000 bovinos, donde el mayor impacto se asoció a la pérdida en la producción láctea (Chávez, 1998).

En los últimos quince años, el Departamento de Patología y Microbiología, y desde hace poco más de tres años en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal del Altiplano (CEIEPAA), ubicado en Tequisquiapan, Querétaro, pertenecientes a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, se ha realizado el diagnóstico de la Ptb mediante diversos procedimientos tales como estudios anatomopatológicos, serológicos, bacteriológicos así como de biología molecular (PCR, RFLP). De lo anterior, se conoce que en 16 estados del país existen frecuencias del 9%, 19.72% y 36% en bovinos, caprinos y ovinos respectivamente, lo que indica su distribución en el territorio nacional en pruebas realizadas en más de 7000 muestras. Países como los Estados Unidos de América, Canadá, Australia, Italia, Francia, España, Holanda, República Checa, Suecia e Israel, cuentan con programas específicos para la prevención y control de la enfermedad, por lo que la iniciativa que se tome en México es de gran relevancia para el futuro cercano (Chávez 2010).

Importancia en la Medicina Humana

En medicina humana se menciona la posible asociación entre Map y una ileocolitis granulomatosa crónica, denominada enfermedad de Crohn (EC). Esta enfermedad fue descrita por primera vez en 1913 por Dalziel en pacientes del Western Infirmary de Glasgow. Pero a partir de 1932, luego de la publicación de Crohn en 1932, en el J. Am.

Med. Assoc., adquiere el nombre de EC, que afecta a individuos jóvenes, entre 15 y 25 años. Los signos clínicos (diarrea y pérdida de peso corporal) y las lesiones anatomopatológicas (ileocolitis granulomatosa) son similares en ambas patologías, PTB y Crohn. Varios investigadores informaron el aislamiento de Map en leche materna y en biopsia intestinal de pacientes con EC, y otros la asociación entre individuos portadores de alelos heterocigotos del gen NOD2 /CARD15 con la susceptibilidad a bacterias intracelulares como el Map (Gilardoni y Mundo, 2008).

Mycobacterium paratuberculosis, es el agente causal de la Ptb (Enfermedad de Johne) y se ha aislado de tejidos intestinales de varios pacientes de la enfermedad de Crohn, para los cuales la etiología es desconocida. Ambas son enfermedades crónicas en las cuales interviene una inflamación en el intestino, las mismas condiciones tanto para rumiantes como para humanos, para la cual, no hay cura (Lambrecht, 1992).

Origen

La primera identificación de una micobacteria data de finales del siglo XIX, momento en el que se describió el bacilo tuberculoso (denominado *Bacterium tuberculosis* por Koch en 1882) y el bacilo de la lepra (denominado *Bacillus leprae* por Hansen en 1880) (Euzeby, 1997).

La paratuberculosis o enfermedad de Johne fue descrita por primera vez en 1895 cuando H. A. Johne y L. Frothingham hallaron la presencia de microorganismos ácido alcohol resistente a partir de frotis de material intestinal, durante un brote de diarrea bovina en Alemania, sin poder identificar taxonómicamente al agente. En 1923 Bergey *et al.* otorgaron el nombre de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (Map) al microorganismo causante de la enfermedad, como en la actualidad se le identifica. El Map es un patógeno intracelular obligado, ácido- alcohol resistente, de difícil cultivo en medios de laboratorio, requiriendo de micobactina como factor de crecimiento y de 8-16 semanas de incubación, debido a su baja velocidad de crecimiento. En la naturaleza, el Map puede sobrevivir en suelos ácidos, 5 meses en agua de río, 9 meses en agua de laguna, considerándose la micobacteria que mejor resiste los factores físicos y químicos.

Sin embargo, la clasificación de ambas especies como micobacterias no tuvo lugar hasta 1896, año en el cual Lehmann y Neumann propusieron que ambas se incluyeran dentro del género *Mycobacterium* y a las cuales ellos renombrarían *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium leprae*. En la actualidad hay descritas 147 especies dentro del género *Mycobacterium*, las cuales se recogen en la lista de nombres procariotas con base en la nomenclatura (*List of prokaryotic names with standing in nomenclature*) de J. P. Euzéby's (Euzebý, 1997).

Descripción de *Mycobacterium avium*

En la actualidad, los requisitos mínimos necesarios para la inclusión de una especie dentro del género *Mycobacterium* son la ácido-alcohol resistencia, la presencia de ácidos micólicos con 60-90 átomos de carbono de longitud y un 61-71% de guanina y citosina en su genoma (Levy-Frebault y Portaels, 1992).

La dependencia a los metales es necesaria para el crecimiento de la mayoría de las bacterias y especialmente al hierro en el caso de las micobacterias patógenas. Para la entrada y utilización de éste al interior de la bacteria se necesita en primer lugar una fuente orgánica del mismo. A continuación, este hierro es quelado por los sideróforos y mediante un transporte transmembrana pasa al interior del citoplasma. Hay dos tipos de sideróforos, las micobactinas y las exoquelinas: los primeros son agentes internos secuestradores y los segundos vectores externos. Las exoquelinas son moléculas proteicas pequeñas que están presentes en el fluido extracelular, las cuales se liberan a altas concentraciones en condiciones de deficiencia de hierro. Se han identificado exoquelinas tanto liposolubles como hidrosolubles y la función de las mismas en el caso de las micobacterias es la de adquirir el hierro presente en el hospedador en forma de ferritina a través de la pared celular bacteriana. Una vez ocurrido este proceso, a partir de ahí puede tener lugar el intercambio del metal quelado con el otro tipo de sideróforo (la micobactina), el cual tiene una localización intracelular y será el responsable de la formación de un depósito de hierro en el interior de la célula (Merkal y Curran, 1974).

Las micobacterias son bacilos aerobios, no formadores de esporas, inmóviles y ácido alcohol resistentes; los bacilos de *Mycobacterium bovis* y *avium* subsp *avium* son delgados y de hasta 4µm de longitud, mientras que los de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* son anchos y habitualmente no alcanzan los 2µm de longitud. Aunque las micobacterias son desde el punto de vista citoquímico gram positivas, el alto contenido en lípidos y ácido micólico de su pared celular evitan la fijación de los colorantes empleados en la tinción de gram. Los lípidos de la pared celular evitan la fijación de los colorantes empleados en la tinción de Ziehl Neelsen. Los bacilos que se tiñen de color rojo por este método se denominan ácido alcohol-resistentes o Ziehl Neelsen positivos. Las micobacterias influyen distintas especies, que van desde saprófitos ambientales y patógenos oportunistas hasta patógenos obligados. Aunque algunas micobacterias patógenas muestran una marcada preferencia de hospedador (Quinn *et al.*, 2002).

Etiología

La identificación del agente etiológico se atribuye a F.W. Twort, quien en 1912, tuvo éxito en realizar un cultivo y caracterización de una microbacteria que en 1914 se demostró que producía enteritis experimental. Después de la caracterización completa de *Mycobacterium paratuberculosis* como una especie distinta dentro del género *Mycobacterium*, la enfermedad pasó a llamarse Paratuberculosis (Chiodini *et al.*, 1984).

La pared celular de las micobacterias presenta como característica principal un alto porcentaje en lípidos con respecto a la masa celular total (40%), porcentaje muy elevado en comparación con el descrito en otras bacterias gram positivas (5%) e incluso gram negativas (10%). Esta propiedad podría explicar la tendencia de las micobacterias a producir un crecimiento en forma de agregados bacterianos y también la propiedad de ácido-alcohol resistencia. La pared celular de micobacterias está constituida por una capa interna y una capa externa que rodean a una membrana plasmática. El compartimento exterior o capa externa está formado a su vez por lípidos y proteínas. Estos lípidos están normalmente asociados a la pared celular a través de ácidos grasos de cadena corta y larga que complementan las cadenas largas y cortas de la capa interna. Los lípidos y polisacáridos asociados con la parte externa de la pared celular externa

son: el lipoarabinomanano (LAM), lipomanano, lípidos tiocerol como el dimicocerosato, dimicolil-trealosa, sulfolípidos específicos en el caso de *M. tuberculosis* y el tidil-inositolmanósido. El compartimento interno está constituido por peptidoglicano (PG), arabinogalactano (AG) y ácidos micólicos (AM), los cuales están unidos covalentemente y constituyen el denominado complejo PG-AG-AM. Este complejo es insoluble y se caracteriza por conformar la estructura esencial de la pared celular y además es la diana a la que van dirigidas la mayoría de los agentes antimicrobianos (Hett y Rubin, 2008).

El agente causal de esta enfermedad es el *Mycobacterium paratuberculosis*, es una bacteria gram positiva, ácido-resistente, no esporulada, inmóvil, que mide de 1 a 2 micras de largo por 0.5 micras de ancho. Semejante antigénica y morfológicamente a las micobacterias que causan la tuberculosis. Es un microorganismo difícil de cultivar, debido a que no crece con facilidad en medios normales, pero metaboliza y prolifera lentamente en agar con yema de huevo, que contenga un factor de crecimiento llamado micobactina, que es un derivado del extracto del *Mycobacterium phley* o bacilos tuberculosos muertos. Muere con la exposición durante 15 minutos, a compuestos cresílicos diluidos en una proporción de 1:64, fenol 1:40 y alcohol etílico al 70 % (Ramírez, 1986).

Aspectos Inmunológicos

A principios de las etapas de la paratuberculosis, hay una respuesta proliferativa de alta de los linfocitos a antígenos de micobacterias positivos y una respuesta a las pruebas cutáneas con johnina o con sensitin aviar. Por otro lado, los linfocitos de bovinos con evidentes síntomas clínicos de la paratuberculosis pueden dar respuestas más débiles a mitógenos que los de los animales sanos (Bendixen, 1978, Grange, 1988).

En el caso de infecciones micobacterianas, como paratuberculosis, se sabe que la inmunidad celular posee un papel determinante en los mecanismos de control aunque es capaz de inducir a una respuesta humoral esta última no es crucial en los procesos de contención de la infección, sin embargo esta respuesta es de ayuda para realizar el diagnóstico de la infección sobre todo en fases avanzadas de la enfermedad. Así, los macrófagos son cruciales para que se desencadene una respuesta inmune. Estas células

fagocitan y procesan antígenos para presentarlos a los linfocitos T (LT). Estos linfocitos cuentan con receptores altamente específicos que reconocen a los antígenos en asociación con glicoproteínas de las membranas de los macrófagos, con la subsecuente síntesis y liberación de interleucina 1 (IL-1) por parte de los macrófagos. Posteriormente, esta IL-1 estimula a los LT para producir IL-2, la cual es responsable de la proliferación de estos linfocitos. Una vez que los LT se han activado, se facilita la actividad y diferenciación de los macrófagos por parte de otras interleucinas, como el γ -interferón (IFN). En la paratuberculosis, se reconocen dos formas histopatológicas de la enfermedad, que dependen directamente del tipo de respuesta inmune que esté predominando. En el tipo tuberculoide la respuesta es principalmente con linfocitos T cooperadores tipo 1 (Th1), en ella existe una fuerte respuesta inmune celular con una pobre respuesta inmune humoral. En este caso, los niveles de γ -IFN e IL-2 son altos. Por el contrario, en el tipo lepromatoide, predominan los LTh1, por lo que la respuesta inmune celular es baja, mientras que la respuesta inmune humoral es elevada (Chávez, 1998).

El cuadro inmunológico de la enfermedad de Johne imita a la de la lepra humana: tanto en la micobacteriosis, hiperactivas y formas anérgicas pueden ser reconocidas. En el polo hiperactivo que es característico de las primeras etapas de paratuberculosis, hay fuertes reacciones mediadas por células inmunes que limitan la proliferación del agente etiológico. Esta etapa de la enfermedad de Johne al enfermedad se asemeja a la forma tuberculoide de la lepra humana, en el polo opuesto, en el anérgico la paratuberculosis se asemeja a la fase lepromatosa de la lepra humana (Bendixen, 1978).

Entre los dos polos existe una etapa intermedia correspondiente a la forma límite de la lepra humana, que se caracteriza por un debilitamiento progresivo de mediada por células la inmunidad y aumento de los niveles sanguíneos de antimicobacteriana inmunoglobulina. La semejanza entre el espectro inmunológico, los espectros de la lepra y la paratuberculosis es apoyado por numerosas observaciones de baja respuesta humoral en subclínica casos de la enfermedad de Johne y la debilidad de las reacciones mediadas por células en el formas avanzadas (Chiodini *et al.*, 1984).

Transmisión

La fuente primaria de infección son los animales adultos infectados. La principal vía de transmisión es oral- fecal a través de calostro y leche de animales infectados, como también de pasturas y agua de bebida contaminadas con materia fecal y, en menor porcentaje, a través de placenta y semen (Gilardoni y Mundo, 2008).

Los signos clínicos son un reflejo de la patología intestinal que se traduce en un síndrome de mala absorción, caracterizado por una fermentación anormal en el colon y diarrea con olor peculiar. Hay antecedentes de que la presencia de la infección en el rebaño incrementa la incidencia de mastitis e infertilidad y acorta las expectativas de vida de los animales (Ábalos, 2001).

Whitlock y Buergelt citados por Gilardoni y Mundo (2008), describieron en 1996 la infección con Map en tres estadios según los signos clínicos: estadio silencioso o subclínico, clínico y avanzado. En los dos primeros estadios, los animales no presentan signos clínicos de enfermedad pero son eliminadores de Map por materia fecal en cantidades no detectables. Los animales progresan al estadio de Ptb clínica, generalmente entre los 3 - 5 años post infección y manifiestan signos clínicos de diarrea intermitente, pérdida de peso y de producción láctea. En estadio de Ptb avanzada, el animal presenta edema submandibular, diarrea persistente, observándose deshidratación y caquexia que lo conducen a la muerte.

Los animales adquieren la infección a una edad temprana, generalmente durante los primeros seis meses, como resultado de la ingestión de microorganismos infectantes que son eliminados en las heces de los animales infectados, siendo esta infección de tipo subclínico. Las diversas circunstancias, que tienen alguna influencia en la posibilidad de transformar esta infección en padecimiento clínico, pueden ser factores como el parto, la desnutrición, y el elevado rendimiento lácteo. La paratuberculosis es casi siempre introducida al rebaño por un animal infectado, el cual no muestra signos al momento de la compra, por lo tanto el retraso en el diagnóstico puede resultar en el establecimiento de la enfermedad de un hato. Es imposible conocer esto, puesto que un gran porcentaje

de los rebaños de cabras en México, están formados por los animales importados de países en donde esta enfermedad existe con alta incidencia (Lambeth *et al.*, 2004).

Patogénesis

En el caso de la paratuberculosis, la principal fuente de infección es a partir de heces contaminadas, excretadas por animales infectados, por lo que la vía de transmisión más común es por la ingestión de agua y alimento contaminados con el bacilo, aunque también existe la infección *in útero*. La infección ocurre durante las etapas tempranas de vida, antes de los 4 meses de edad y tiene un período de incubación variable, ya que oscila entre 6 meses a 5 años (Chávez, 1998).

Mycobacterium avium subsp. *Paratuberculosis* es un parásito intracelular, y las reacciones de base celular son las responsables de las lesiones entéricas. Las micobacterias ingeridas son fagocitadas por los macrófagos, donde son capaces de sobrevivir y multiplicarse, y alcanzan así las placas de Peyer. A medida que progresa la infección, se desarrolla una reacción granulomatosa por las células del sistema inmune, con una importante acumulación de linfocitos y macrófagos en la lámina propia y la submucosa. La enteropatía resultante conduce a la pérdida de proteínas plasmáticas a y a la mala absorción de agua y nutrientes. Los macrófagos presentes en la pared intestinal y en los ganglios linfáticos regionales aparecen repletos de micobacterias (Quinnet *et al.*, 2002).

La identificación de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* se basa en su requerimiento de micobactina y su patogenicidad en el hospedador. La dependencia de micobactina se ha utilizado ampliamente como una característica taxonómica de *M. paratuberculosis* porque la mayoría de las micobacterias son capaces de sintetizar micobactina. Sin embargo, *Mycobacterium paratuberculosis*, *M. silvaticum* y algunos aislados primarios de *M. avium* carecen de esta capacidad y requieren micobactina para crecer en el laboratorio. Así, el requerimiento de micobactina no es exclusivo de *M. paratuberculosis*; esta característica existe en diferentes grados dentro del grupo de *M. avium* (Thorel, 1991).

La propagación de la enfermedad a la mucosa no está asociada con las placas de Peyer y la presencia de lesiones en el intestino delgado apoya el hecho de que la infección se extiende a lo largo del tracto intestinal después del establecimiento de los focos iniciales de la infección en el tejido linfático intestinal (Lambeth *et al.*, 2004).

En la mayoría de los casos, los microorganismos son ingeridos, durante la etapa de lactancia, después de ingeridos comienzan a multiplicarse lentamente en la lámina propia del intestino y ganglios linfáticos. Se conoce, que, independientemente de la vía de inoculación, aunque el microorganismo pueda aparecer en diferentes órganos gradualmente su presencia se hace más predominante en el tracto intestinal. El tropismo que manifiestan los bacilos paratuberculosos por el tejido intestinal, podría deberse a la estimulación de las enzimas oxidativas de los macrófagos intestinales, liberadas después de la infección. Se conoce también, que el aumento en la disponibilidad de intermediarios metabólicos en estos macrófagos y no en otras células similares, pueden estimular la multiplicación bacteriana. Este ambiente favorable para el crecimiento microbiano se hace óptimo por la pérdida de la actividad lisosomal de los macrófagos, los cuales están dedicados a ingerir los bacilos paratuberculosos que están multiplicando en la lámina propia del intestino. Debido a que los microorganismos se multiplican en estas células, quedan protegidos de los anticuerpos formados por el animal y la mayoría de los antimicrobianos usados como tratamiento. Los mecanismos inmunológicos por medio de los cuales se desencadena la diarrea y la respuesta febril se explican de la siguiente manera:

- Debido a una reacción antígeno-anticuerpo en el intestino afectado, esta reacción de tipo hipersensibilidad inmediata, podría resultar en la liberación de histamina con la consecuente presentación de la diarrea.
- Debido a una reacción de tipo hipersensibilidad retardada, que involucra a los antígenos de *Mycobacterium paratuberculosis* y a los linfocitos sensibilizados. De esta reacción resulta la liberación de linfocinas, y si la citotoxina es liberada, puede tener relación con la atrofia muscular, la leucopenia, la anemia y el daño renal observados en la infección de paratuberculosis. Se libera además un

pirógeno de las células inflamatorias, y esta sería la explicación para la presentación de la fiebre que forma parte del cuadro clínico.

La paratuberculosis es un proceso crónico con largo periodo de incubación que provoca mala condición corporal, así como diarrea profusa que no responde a tratamiento médico, generando enteritis granulomatosa con presencia de bacilos ácido-alcohol resistente que son eliminados a través de heces. La paratuberculosis cursa preferentemente en forma subclínica, tiene un largo periodo de incubación y los signos clínicos son solo una manifestación terminal de la enfermedad (Ramírez, 1986).

La infección se establece en las células M de las placas de Peyer, invadiendo progresivamente la mucosa de íleon terminal, válvula ileocecal, ciego, colon proximal, y ganglios mesentéricos. Se produce una endematización de estas estructuras, adquiriendo un color pálido y aumentando de volumen y desarrollándose una hipertrofia difusa de la mucosa del yeyuno e íleon la que adquiere una apariencia rugosa. La bacteria también puede establecerse en la glándula mamaria en el 35 % de los casos clínicos y 10 % de los casos subclínico por lo que el uso de calostros conservados puede ser un factor de riesgo de diseminación (Ábalos, 2001).

La comprensión de los aspectos básicos inmunológicos y de su patogenia son primordiales para comprender las estrategias de control de esta enfermedad. No obstante es un hecho que los programas de control de paratuberculosis con laboriosos contemplando que es problema del rebaño y no es únicamente la presentación de casos clínicos esporádicos. Es importante considerar que es difícil conseguir tener rebaños libres de la enfermedad y se recomienda mantener la tasa de infección por debajo del 3%, pues en estos niveles los efectos económicos que se derivan de esta infección se consideran como mínimos (Chávez, 1998).

Signos Clínicos

El periodo de incubación de este padecimiento es prolongado e irregular. Los síntomas se manifiestan generalmente entre los 3 y 5 años de edad, pero se han observado casos en animales de uno a dos años. Un alto porcentaje de los animales infectados en un hato, puede no desarrollar la fase clínica, de cualquier forma estos

animales estarán eliminando intermitentemente el microorganismo por las heces, quedando como reservorios. Los bovinos con paratuberculosis clínica son fácilmente reconocidos por la presencia de diarrea profusa crónica, acompañada por una pérdida progresiva de peso, debilitamiento y pueden presentar fiebre intermitente. En contraste los caprinos y ovinos afectados, rara vez desarrollan diarrea, salvo en forma intermitente y en las fases terminales de la enfermedad, en estos casos las heces pierden su forma característica de bolas y se vuelven blandas. Un hecho importante es que el apetito de los animales infectados se conserva y la pérdida progresiva de peso puede ser en muchos casos el único signo aparente pero no específico (Ramírez, 1986).

Solo una minoría de animales infectados presenta signos clínicos y existen factores de riesgo definidos para su establecimiento como: Producción intensiva, suelos ácidos, mala nutrición, estrés relacionado con el transporte, lactancia prolongada, parto, deficiencia de elementos esenciales e inmunodepresión por agentes como diarrea viral. En rumiantes la enfermedad clínica se caracteriza por ser afrebil, pérdida de peso progresiva hasta la emaciación, edema submandibular, mala calidad del pelaje a pesar de un buen apetito. En los rebaños infectados los animales se pueden categorizar por cuatro grupos:

- Animales clínicamente enfermos : Son grandes diseminadores, tiene alta tasa de anticuerpos y bajo nivel de inmunidad molecular.-
- Diseminadores esporádicos: Sin signos clínicos excepto por disminución en la producción, hay respuesta inmune humoral y celular intermedia. A medida que avanza la infección, aumenta la excreción, aumentan los anticuerpos, y disminuye la inmunidad celular.
- Animales portadores: No son detectados por pruebas serológicas o cultivo de deposiciones.
- Animales resistentes no – infectados: Nunca se infectaron o desarrollaron inmunidad activa protectora que resulto en la eliminación completa de la bacteria.

(Ábalos, 2001).

En condiciones naturales, la enfermedad en vacas se transmite mediante ingestión de *M. paratuberculosis* a partir del ambiente contaminado. La enfermedad persiste después de la introducción de animales infectados. La infección puede transmitirse verticalmente al feto y el semen puede infectarse con el organismo. La fuente primaria de contagio en terneros es la leche procedente de vacas infectadas o leche contaminada con heces de bóvidos enfermos (Sweeney *et al.*, 1995).

Lesiones

La gravedad de las lesiones no guarda relación con la diarrea y la emaciación, de forma que algunos animales con lesiones graves pueden aparecer clínicamente normales, mientras que muchos grave y crónicamente afectados no muestran lesiones macroscópicas definidas. En el yeyuno e ileón se pueden presentar varios grados de engrosamiento, aunque esta lesión es poco constante y no tiene utilidad diagnóstica (Ramírez, 1986).

Las lesiones se clasificaron como leve, moderada y severa:

- Leve: las lesiones se caracterizan por acumulación de macrófagos epiteliales en la parte superior de la lámina de las vellosidades ileales. Los macrófagos epiteloides tenían un citoplasma prominente con núcleos grandes y en forma de ovoide. Numerosos bacilos alcohol-resistente visibles dentro de estas células por el método de ZN. Los pequeños focos de las agregaciones de los macrófagos epiteloides, similares a las descritas en el ileón, también se observaron en la zona paracortical de los ganglios linfáticos mesentéricos afectados. Algunas de estas células tenían pocos bacilos alcohol-resistente en el citoplasma por ácido-tinción.
- Moderada: las lesiones se caracterizan por la filtración y la agregación de macrófagos epiteloides y algunos linfocitos, eosinófilos y células plasmáticas en la parte superior y zonas más profundas de la lámina del ileón y, finalmente, de toda la lámina. Las vellosidades se ven atrofiadas y comprimidas y hasta cierto punto las criptas de las glándulas de Lieberkuehn.
- Severa: las lesiones se caracterizan por la infiltración y la agregación de muchos macrófagos epiteloides, algunas células gigantes, numerosos linfocitos,

células plasmáticas y a veces pocos neutrófilos en la mucosa, submucosa y hasta la túnica muscular y serosa. Toda la lámina fue invadida por un número masivo de macrófagos epiteloides, que a su vez comprimen las criptas de glándulas de Lieberkuehn y las vellosidades se ven seriamente atrofiadas. (Khodakaram y Rashidi 1999).

Diagnóstico

El diagnóstico de paratuberculosis ha tenido en los últimos años grandes avances. La detección del agente mediante cultivo de deposiciones es el método de diagnóstico definitivo de diagnóstico y aunque es lento, mediante nuevos protocolos se ha mejorado ampliamente su eficiencia. También se están desarrollando pruebas moleculares de detección de Map. Debido a la característica de la infección en que se establece al inicio un equilibrio entre la respuesta inmune celular protectora y la retención del agente en un estado latente para luego al cabo de algunos años, deteriorarse y dar paso a un incremento en la actividad de anticuerpos y eliminación de la bacteria desde el intestino, es que se puede recurrir a técnicas de detección de la respuesta inmune celular y humoral para afinar el diagnóstico (Ábalos, 2001).

El diagnóstico en *in vivo* en la paratuberculosis en los caprinos y ovinos es muy incierto ya que en el estado temprano no se muestran signos, y en los últimos estadios son inespecíficos, pudiéndose confundir con parasitosis internas, que es un padecimiento muy común en los hatos nacionales. En ovino y caprino, la sintomatología es todavía más inespecífica, puesto que la emaciación, edemas y la caída de la lana son caracteres comunes con las parasitaciones digestivas y con la carencia de cobalto sobre todo. Para el diagnóstico de esta enfermedad se han empleado un sin número de pruebas que se resumen en el cuadro 1.

Las pruebas diagnósticas incluyen:

- Examen clínico.- El signo clínico más característico en los ovinos y caprinos es la pérdida de condición acompañada de edema submandibular. La diarrea es menos frecuente y está presente únicamente en casos terminales. Por lo tanto

como caracteres diferenciadores podemos ver como estos procesos sólo se presentan a partir de los 2 años de edad, que en la diarrea las heces se eliminan sin esfuerzo y que el apetito y la lucidez se conservan hasta las fases terminales de la enfermedad. Sin embargo, a nivel de colectivo la sintomatología resulta muy significativa: presentación de animales de 2 a 5 años con adelgazamiento y diarrea, ésta última de forma intermitente durante años, es señal de Ptb puesto que otras causas de diarreas son más agudas, afectan a mayor número de animales y/o o bien no persisten tanto a través del tiempo.

- Diagnóstico inmunológico.- Las pruebas en *in vivo* de inmunidad.- fueron las que primero se emplearon en el diagnóstico de la paratuberculosis, utilizando tuberculina aviar y posteriormente johnina en inoculación intradérmica. La prueba de la johnina se aplica subcutánea, intravenosa e intradérmicamente, el problema de este tipo de pruebas es que pueden ocurrir reacciones falsas positivas por infección con otras microbacterias poco específicos, de cualquier forma estas pruebas pueden tener valor sobre un hato base. 2.- Pruebas basadas en inmunidad humoral.- en la actualidad son poco utilizadas pues se ha comprobado su baja especificidad aunado en la dificultad que representa adaptarlas en el laboratorio. De estas pruebas solamente la prueba del inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) y la prueba de inmunodifusión gel de agar (IDAG) se emplean en el diagnóstico de la paratuberculosis en ovinos y caprinos. Cuando un anticuerpo es puesto en contacto con el antígeno correspondiente, se forman complejos antígeno-anticuerpo que se insolubilizan en su mayor parte, dando lugar a una reacción de precipitación (Morilla y Bautista, 1986).
- Diagnóstico bacteriológico. 1.- Examen microscópico.- el frotis de raspado de mucosa rectal coloreado con la tinción de Ziehl Nielsen es uno de los métodos más rápidos, pero tiene las desventajas de que no detecta concentraciones bajas de microorganismos, por lo que algunos laboratorios prefieren utilizar la tinción fluorescente de aureamina o para detectar las microbacterias en estos raspados y en improntas de ganglios linfáticos mesentéricos, y también de que se requiera

cierta experiencia para diferenciar en *Mycobacterium paratuberculosis* de las micobacterias saprófitas que se encuentran en las heces. 2.- Cultivo.- El cultivo de heces ha sido el método más uniforme para detectar este padecimiento, sobre todo para eliminar animales, pero aunque este método es definitivo, presenta los siguientes inconvenientes: se requieren 3 meses para la confirmación; se necesita que el animal sospechoso elimine un mínimo de 100 microorganismos por gramo de heces para obtener cultivos positivos y finalmente, que existe el grave problema de contaminación por hongos y bacterias en los tubos sembrados.

Cuadro 1. Pruebas empleadas en el diagnóstico de Paratuberculosis

• <u>Exámen clínico</u>
• <u>Pruebas inmunológicas:</u>
1.- Pruebas basadas en la inmunidad celular
a) Prueba de johnina
b) Prueba doble comparativa de tuberculina
c) Transformación linfocitaria <i>in vitro</i>
2.- Pruebas basadas en inmunidad humoral:
a) Fijación de complemento
b) Hemoaglutinación
c) Precipitación
d) Inmunofluorescencia
e) Floculación de bentonita
f) Prueba de inmunoabsorción ligado a enzimas
• <u>Pruebas bacteriológicas:</u>
1.- Examen microscópico directo
2.- Cultivo
• <u>Necropsia</u>
1.- Lesiones microscópicas
2.- Lesiones macroscópicas

Adaptado de Ramírez, (1996).

Vacuna

Los animales vacunados contra la paratuberculosis desarrollan anticuerpos séricos. La vacunación ayuda a prevenir la enfermedad clínica pero no evita necesariamente la infección. También interfiere con programas de diagnóstico y control de la tuberculosis bovina. Así, si se necesita diagnosticar la infección en los vacunados, sólo se pueden usar pruebas de detección de *M. paratuberculosis* en las heces (Jorgensen, 1984).

En la fabricación de las vacunas para la paratuberculosis pueden emplearse bacterias vivas atenuadas o muertas a las que se les incorpora un adyuvante o bien se liofilizan y se les adiciona el adyuvante, durante la reconstitución. El recuento celular es difícil y el contenido bacteriano de las vacunas se puede basar en el peso, mientras que la potencia de la vacuna puede estimarse mediante un conjunto de pruebas de desarrollo de capacidad sensibilizante, empleando cobayas (Collins *et al.*, 1990).

La enfermedad de Johne causada por *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* en la última década se ha convertido en una de las causas más importantes de pérdidas económicas a la ganadería y agricultura. Los rumiantes están particularmente en riesgo y varios países que dependen en gran medida principalmente de la agricultura, estos están desarrollando una vacuna y programas de ejecución para el control de la enfermedad. Dos vacunas comerciales están actualmente registradas a nivel internacional para uso contra paratuberculosis en ovejas, ambas basadas en una inyección subcutánea con un adyuvante oleoso y un conjunto de célula bacterial, Neoparasec (MAP vivo y antivirulento) y Gudair (que comprende células muertas por calor). Se ha demostrado que ambas vacunas proporcionan niveles moderados de protección contra la enfermedad de Johnes en ovejas, sin embargo sufren de varios inconvenientes. En términos de eficacia, ni la vacuna previene la infección, pero reduce la incidencia y la gravedad clínica, y reduce considerablemente el derramamiento de patógenos de animales infectados (Griffin *et al.*, 2008).

Dentro de los diferentes métodos de control de la paratuberculosis ovina, la vacunación ha sido una de los métodos más utilizados y que se ha señalado como más rentable económicamente. Así, ya en los años 20 se desarrolló en Francia una vacuna atenuada a partir de *M. paratuberculosis* para su aplicación en ganado vacuno, obteniéndose excelentes resultados en el control de la enfermedad. A partir de entonces se han elaborado y aplicado diferentes vacunas, tanto vías atenuadas como inactivadas que han sido aplicadas a las especies vacuna, ovina y caprina siendo los resultados plenamente satisfactorios (Castellanos *et al.*, 2010).

Factores que Influyen Sobre la Presencia de Paratuberculosis

Factores ambientales

Los factores ambientales en los cuales se establece un rebaño son muy importantes para tener un manejo adecuado a la raza y especie a producir. Para que no haya incidencia de ciertas enfermedades así como parasitosis, se deberá tener una infraestructura adecuada, sistema de alimentación de acuerdo a las necesidades del animal, tener un manejo sanitario establecido, verificar la cantidad de animales en la explotación para evitar hacinamiento (Navneet *et al.*, 2007).

Manejo de los ovinos y factores nutricionales

En los sistemas de manejo extensivo las ovejas dan a luz y crían a sus ovejas en los pastos. Práctica que no es factible para separar a los corderos recién nacidos de las ovejas y criarlos artificialmente, como se hace con el ganado lechero. Tampoco es asequible eliminar a las ovejas y corderos de las pasturas, y darles de comer una ración preparada. Por estrategia comercial madres y crías deberán estar juntos en los pastos hasta que se puedan ser destetados (Abbott *et al.*, 2004).

Según Abbott *et al.* (2004), hay una mayor prevalencia de la enfermedad en el ganado ovino cuyas madres tenían una condición corporal muy baja, que son indicadores de la mala nutrición y estrés. Por otra parte una condición corporal baja aumenta la posibilidad y transmisión de la infección a la descendencia por ambas rutas, horizontales y verticales.

La influencia de la nutrición y estrés se desprende de una prevalencia mayor en los corderos nacidos en otoño (de los nacidos en primavera) cuando usualmente hay una buena disposición de pastos. Sin embargo la baja prevalencia de infección en los corderos nacidos en invierno era todo lo contrario a las expectativas esperadas y se podría reflejar la importancia de las condiciones del clima y la disponibilidad de los pastos al momento del destete en lugar del momento de la parición. Los corderos nacidos en invierno suelen ser destetados en primavera, cuando los pastos están disponibles en mayor cantidad (lo que implica una mejor nutrición y menor ingestión de suelos contaminados). Una prueba más del impacto de la nutrición inadecuada y el estrés que se enfrentan las crías en las primeras 12 semanas de vida, en las cuales son más susceptibles a la enfermedad tiempo (Navneet *et al.*, 2007).

Evaluación de la infección en el rebaño

La gravedad de la infección o el grado de difusión dentro de un rebaño o manada depende de las condiciones de manejo, el número de animales infectados y la duración de la infección en el grupo. Debido al largo periodo de incubación, muchos animales en el grupo pueden estar expuestos o infectados subclínicamente por el tiempo que cada caso clínico se hace evidente. Esto ha sido referido como efecto iceberg en el rebaño. Para cada caso clínico, hasta 15 a 25 animales pueden ser asintomáticos en la granja (Stheman y Shulaw, 2002).

Una alta carga animal conduce a una mayor contaminación de las pasturas con Map debido a un mayor número de animales por unidad e incrementando el esparcimiento de Map como resultado del estrés nutricional. En consecuencia los corderos conocidos por ser altamente susceptibles a la infección están expuestos a dosis más altas de Map que se traduce a una mayor prevalencia de la enfermedad entre ellos a través del tiempo (Abbott *et al.*, 2004).

Cierta comprensión de la prevalencia de la enfermedad en un rebaño es necesario para la adecuada interpretación de los resultados de la prueba serológica. Las pruebas se han utilizado como una herramienta para evaluar la extensión de la infección en la granja para identificar a los individuos infectados y para determinar el nivel de control necesario y el seguimiento del mismo. La frecuencia de los análisis varían con los

objetivos de cada explotación y los fondos disponibles para la toma de muestras y los costos de las mismas (Stheman y Shulaw, 2002).

Edad

Existe alguna evidencia de una disminución de la susceptibilidad a la infección con Map de acuerdo a la edad de los ovinos. En un estudio reciente un grupo de corderos que fue expuesto a altos niveles de infección en el periodo post-destete mientras que otro grupo de corderos fue expuesto a niveles medios de infección solo en el pre-destete. Los corderos expuestos a mayor edad tuvieron una mayor incidencia de infecciones graves. Esto podría explicarse simplemente por el mayor nivel de exposición de los corderos post-destete expuestos. Si hubo un aumento en la resistencia de los corderos después del destete, que fue superando fácilmente por el mayor nivel de exposición en el entorno post-destete y no parecen existir, ya sea en absoluto o con la fuerza suficiente para ser útil en las granjas encuestadas y aplicar un control de la enfermedad acorde a la edad de los ovinos (Abbott *et al.*, 2004).

Especies silvestres

El organismo responsable de la paratuberculosis *Mycobacterium avium*, ha sido encontrado en conejos salvajes (*Oryctolagus cuniculus*) en algunas granjas de Escocia. Algunos estudios han investigado tanto el nivel de la contaminación fecal de los conejos en las granjas como la efectividad potencial de la excreta de los conejos. La transmisión de la ptb se asume que ocurre mediante la vía fecal-oral y consecuentemente existe el efecto potencial de infección por la excreta del conejo que transmite la enfermedad a las pasturas (Daniels *et al.*, 2003).

La dosis de infección requerida para que se produzca un estado clínico en los rebaños aun no es conocida. En consecuencia las estimaciones pueden basarse únicamente en las dosis encontradas para producir la enfermedad en animales infectados. Terneros y corderos podrían recibir una dosis infecciosa de la ingestión de unos pocos gramos de heces de ganado infectado. La bacteria de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* puede sobrevivir en el medio ambiente un tiempo máximo de un año es por eso que una dosis puede ser consumida de las pasturas contaminadas con heces (Daniels *et al.*, 2011).

El papel exacto de los conejos en la epidemiología de la paratuberculosis es desconocido. Sin embargo a pesar de su papel en la transmisión de la Ptb, se considera que los conejos tiene un importante impacto económico en la agricultura. En cuanto a las pasturas, experimentos han demostrado que el pastoreo del conejo puede reducir la ganancia de peso del ganado y por lo tanto de la producción. Como resultado, muchas granjas tienden a tomar medidas de control para esta especie. Sin embargo, el impacto de tal control sobre el número de pellets fecales que ingresan a las tierras de pastoreo y por lo tanto el potencial de transmisión de paratuberculosis es hasta la fecha sin cuantificar. Los resultados de estos estudios dan como conclusión que la contaminación por la excreta de los conejos en granjas infectadas puede representar un significativo riesgo de enfermedad para el rebaño (Abbott, 2002).

La posibilidad de que la vida silvestre pueda estar involucrada en la epidemiología de las especies ovinas fue examinada previamente en dos estudios en dos explotaciones ovinas infectadas. En un estudio el ileón, illeocical, la válvula, el ciego, el colon proximal, los ganglios linfáticos mesentéricos y la materia fecal de 100 canguros grises orientales (*Macropus giganteus*) fueron cultivados para Paratuberculosis y todos dieron negativo. En el segundo estudio 206 canguros grises del este del New South Wales fueron examinados por cultivo de heces y un subconjunto de 94 canguros también fue examinado por citología e histopatología (Abbott, 2002). Un canguro tenía un bajo número de *M. paratuberculosis* en las heces, pero no hubo lesiones histopatológicas en ese o cualquier otro animal. La conclusión provisional de estos dos casos fue que si estaba presente la Paratuberculosis en los macrópodos australianos, fue probablemente una baja prevalencia y la baja importancia en la epidemiología de la enfermedad del ganado ovino. Un estudio posterior se evaluó el rol de la infección de paratuberculosis con la epidemiología de las especies ovinas. Se aisló una pequeña población de macrópodos, lo que indica que una pequeña población se puede infectar cuando pastan con las ovejas infectadas. Sin embargo la excreción de grandes organismos era rara en macrópodos y se concluyó que era poco probable que estos proporcionaran un reservorio de infección que podría comprometer seriamente el control, de los esfuerzos de las especies ovinas (Cleland *et al.*, 2010).

Incidencia y Prevalencia

La prevalencia en medicina mide la proporción de sujetos que en un área geográfica y periodo de tiempo establecido sufren una determinada enfermedad. La prevalencia se calcula dividiendo el número de individuos que padecen el trastorno por el número total de habitantes del área considerada incluyendo a los que lo padecen (Tapia, 1995).

Se calcula según:

$$P = \frac{\text{N}^\circ \text{ de casos con la enfermedad en un momento dado}}{\text{Total de población en ese momento}}$$

Si la variable estudiada es de tipo cualitativa (por ejemplo una enfermedad o sus síntomas), los resultados de un estudio de prevalencia se entregan generalmente como porcentajes (tasas de prevalencia). Las variables cuantitativas pueden expresarse a través de medidas de resumen como promedios y sus desviaciones estándar, dependiendo del tipo de variable, o bien pueden categorizarse de acuerdo a criterios clasificatorios previamente establecidos (Merino, 2007).

La incidencia se define como el número de casos nuevos de una enfermedad que se desarrollan en una población durante un período de tiempo determinado. Hay dos tipos de medidas de incidencia: la incidencia acumulada y la tasa de incidencia, también denominada densidad de incidencia. La incidencia acumulada (IA) es la proporción de individuos sanos que desarrollan la enfermedad a lo largo de un período de tiempo concreto (Tapia, 1994).

Se calcula según:

$$IA = \frac{\text{N}^\circ \text{ de casos nuevos de la enfermedad durante el seguimiento}}{\text{Total de población en riesgo al inicio del seguimiento}}$$

Prevalencia e incidencia son conceptos a su vez muy relacionados. La prevalencia depende de la incidencia y de la duración de la enfermedad. Si la incidencia de una enfermedad es baja pero los afectados tienen la enfermedad durante un largo período de tiempo, la proporción de la población que tenga la enfermedad en un momento dado puede ser alta en relación con su incidencia. Inversamente, si la incidencia es alta y la duración es corta, ya sea porque se recuperan pronto o fallecen, la prevalencia puede ser baja en relación a la incidencia de dicha patología. Por lo tanto, los cambios de prevalencia de un momento a otro pueden ser resultado de cambios en la incidencia, cambios en la duración de la enfermedad o ambos (Merino, 2007).

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del área de estudio

El municipio de Villa de Ramos se encuentra localizado en la parte noreste del estado de S.L.P. en la zona altiplano con las siguientes coordenadas geográficas 101° 55' O y 22° 50' N y con una altitud de 2200m. La superficie total del municipio, de acuerdo con el Sistema Integral de Información Geográfica y Estadística del INEGI (2000) es de 2,495.68 km² y representa el 4.12% del territorio estatal. Cuenta con una vegetación de matorral micrófilo desértico, espinoso, izotal, pastizal, nopalera y cardonal de cuyas asociaciones se tienen especies como: *Larrea tridentata* (gobernadora), *Prosopis laevigata* (mezquite), *Acacia berlandieri* (huizache), *Flourensiacernua* (hojasen), *Opuntia spp.* (nopales), *Yuccafilifera* (palmachina) y una variedad de pastos como: *Boutelouagracilis* (navajita), *Bouteloua curtispindula* (banderilla), *Enrioneruo pulchellum* (borreguero) y *Distchlis spicata* (salado). Las comunidades en estudio de este municipio fueron las siguientes: Cerro Pinillos, El Calvario, El Zacatón, La herradura, La Mina, Lagunillas, San Pedro del Saltito y Villa de Ramos.



Figura 1. Ubicación municipio de Villa de Ramos, San Luis Potosí

Animales

Se seleccionaron ocho comunidades para ser incluidas en este estudio de acuerdo a la disposición y cooperación de los productores, dado que algunos productores se mostraron poco cooperantes para proporcionar datos y permitir tomar las muestras sanguíneas necesarias. La raza ovina predominante en el área de estudio es Rambouillet y sus cruza, se tomaron muestras sanguíneas del 10 % de animales del rebaño ovino en cada predio de cada comunidad, con una edad mayor a dos años, confirmada por formula dentaria. Se identificaron los ovinos por medio de aretes plásticos con número, para poder dar seguimiento a los animales que pudieran resultar positivos.

Muestreo Sanguíneo

Se obtuvieron 178 muestras de suero sanguíneo de animales. Las muestras de sangre se obtuvieron por punción de vena yugular en tubos vacutainer estériles en cantidad aproximada de 5 ml por animal, las cuáles fueron transportadas al laboratorio, en donde se obtuvo el suero por medio de centrifugación a 3,000 rpm por 10 minutos. El suero obtenido fue congelado a -20°C hasta su proceso en el laboratorio de diagnóstico.

Método de Diagnóstico por Inmunodifusión en gel de agar (IDAG)

Para la preparación del gel se pesaron 0.5 g de agar noble (*Difco laboratories*), los cuales se disolvieron por calentamiento en 50 ml de buffer salino de fosfatos (PBS 1X) para obtener una concentración final de 0.75% de agar. Una vez disuelta, se añadió 1 ml de azida de sodio al 0.2% y posteriormente se colocaron 15 ml del agar en una caja de petri para formar el gel. Una vez polimerizado, se realizaron las perforaciones para formar las rosetas. En el pozo del centro se colocó el antígeno 3065 de Map (elaborado en INIFAP) y en los pozos periféricos los sueros problema en cantidades iguales (30 µL). La caja se mantuvo en una cámara húmeda y se incubaron a 37° C entre 24 y 48 h. para realizar la lectura. Si se presentaba una banda de precipitación definida antes de 48 h. se consideraba como positivo, mientras que en la ausencia de dicha banda se daba un resultado negativo (Sherman *et al.*, 1984).

Análisis Estadístico

En la investigación médica nos encontramos con frecuencia con datos o variables de tipo cualitativo, mediante las cuales un grupo de individuos se clasifican en dos o más categorías mutuamente excluyentes. Las proporciones son una forma habitual de expresar frecuencias cuando la variable objeto de estudio tiene dos posibles respuestas, como presentar o no un evento de interés (enfermedad, muerte, prevalencia, etc.), por lo que se utilizó una prueba de ji cuadrada (Daniel, 2002).

Para calcular las diferencias del porcentaje de animales positivos entre rebaños se utilizó la prueba de Ji cuadrada ($p < 0.05$). Una prueba de t-student fue utilizada para calcular las diferencias de rebaños positivos y negativos. La prueba de t student ayuda a pronosticar la probabilidad de que dos promedios pertenezcan a una misma población (en el caso en que las diferencias no sean significativas) o que provengan de distintas poblaciones (Daniel, 2002)

El cálculo de Ji cuadrada se realiza a partir de la siguiente fórmula:

$$X^2 = \sum \frac{(O-E)^2}{E}$$

donde:

O = frecuencia de casilla (celda) observada

E = frecuencia esperada o teórica

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente estudio realizados los resultados obtenidos señalan una prevalencia de 8.42 % (15/178) de Map en ocho comunidades del municipio de Villa de Ramos, San Luis Potosí; con la técnica de inmunodifusión en gel de agar (IDAG). Las prevalencias oscilaron entre 0.00 hasta 66.66 %. Entre las comunidades estudiadas ($p=0.006$).

De las ocho comunidades en estudio, se encontraron cinco seropositivos a Map, representando el 80 % de comunidades con presencia de Ptb.

De las 178 muestras analizadas resultaron 15 positivas a Map y 163 negativas utilizando la prueba IDAG. La inmunodifusión en gel agar es un método de diagnóstico serológico económico para detectar paratuberculosis en los rumiantes.

Se considera que un animal infectado por *Mycobacterium avium* subs. *paratuberculosis* tardara más de tres años en desarrollar la enfermedad. De esa manera, un rebaño que tiene pocos casos clínicos puede albergar muchos animales infectados subclínicamente, por lo que al momento de diagnosticar positivo a un individuo, el 30 al 40% del hato puede estar infectado. La inmunodifusión en gel de agar es un método de diagnóstico serológico económico para detectar paratuberculosis en los rumiantes, se puede detectar el anticuerpo de 3 a 9 meses después del derramamiento de microbacterias. La prueba tiene una especificidad del 100 %, es una prueba confiable para detectar Map (Rajib *et al.*, 2011).

El costo del diagnóstico por prueba de IDAG, es de 50 pesos mexicanos (aproximadamente 3.60 USD), por lo tanto difícilmente un pequeño productor absorbe el gasto. En los hatos donde la población es mayor a 500 animales se ha encontrado menor porcentaje de animales positivos, posiblemente debido a los controles sanitarios que implementan estos hatos, para el diagnóstico de la Ptb (Méndez *et al.*, 2008).

Veléz *et al.*, (1999), reportan prevalencias de paratuberculosis en caprinos en México de 6.39% y 4.89% en un programa de control que se estableció y siguió durante dos años en dos rebaños. Por otro lado en otro estudio también en caprinos Chávez *et al.* (2004)

reportan una prevalencia de 6.73 % con la prueba de inmunodifusión en gel de agar (IDAG) a 120 caprinos.

En el estado de Guanajuato, en un estudio epidemiológico de tipo transversal, se encontró una prevalencia de paratuberculosis ovina de 42.42% (28/66) a nivel explotación y de 4.33% (60/1385) a nivel individual, con base en los sueros analizados por inmunodifusión en gel de agar (Santillán *et al.*, 2006).

En otro estudio realizado en 2005 con bovinos en el mismo Estado, se encontró una seroprevalencia del 29% (33/115) en los establos bovinos incluidos en el estudio, la seroprevalencia a nivel animal fue de 11% (44/411). Los sueros fueron evaluados con un ELISA comercial (Córdova, 2006).

Cuadro 2. Prevalencia de Map en Comunidades de Villa de Ramos, S.L.P.

COMUNIDADES	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL	PREVALENCIA
Cerro Pinillos	0	10	10	0.00%
El Calvario	1	2	3	33.33%
El Zacatón	8	44	52	15.30%
La Herradura	3	44	47	6.38%
La Mina	2	1	3	66.66%
Lagunillas	0	10	10	0.00%
San Pedro del Saltito	0	30	30	0.00%
Villa de Ramos	1	22	23	4.34%
TOTAL	15	163	178	8.42

CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio prueban que la enfermedad de paratuberculosis se encuentra presente en algunas comunidades del municipio de Villa de Ramos. Debido a los resultados se hace necesario y prioritario el establecimiento de un programa de atención de la paratuberculosis reconociendo la importancia que tiene para el estado de San Luis Potosí la ganadería ovina, así como las políticas del gobierno federal para impulsar la producción, la sanidad, la inocuidad y el comercio nacional e internacional de leche, carne y pie de cría.

Los resultados obtenidos permiten establecer que la situación del ganado ovino de las comunidades evaluadas no es la mejor en lo que se refiere a paratuberculosis por lo que se tiene que continuar con los estudios para poder establecer cuales son los factores asociados para que se de la infección y de esta manera tratar de establecer las posibles medidas de control.

Debido al efecto sobre la productividad de los rebaños y su posible condición de zoonosis, es importante considerar la presencia de esta enfermedad en el municipio de Villa de Ramos, San Luis Potosí, para diseñar estrategias de control que contribuyan a incrementar la productividad del sector ovino tomando en cuenta las condiciones de la región.

LITERATURA REVISADA

- Ábalos, P. 2001. Actualidad en Paratuberculosis. Universidad de Chile, Departamento de Medicina Preventiva Animal. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. <http://www.ovinoscaprinos.com.ar/SANIDAD/Actualidad%20en%20Paratuberculosis.pdf>. Consultado el 26 de septiembre de 2011.
- Abbott, K., Whittington R., and McGregor H. 2004. Exposure Factors Leading to Establishment of OJD Infection and Clinical Disease. Faculty of Veterinary Science. University of Sidney. Animal Health and Welfare.
- Abbott, K. 2002. Prevalence of Jhone 's disease in rabbits and kangaroos. University of Sidney. Meat and Livestock Australia. <http://hdl.handle.net/2123/954>. Consultado el 25 de septiembre 2011.
- Beard, P. M., Henderson, D., Daniels, M. J., Pirie, A., Buxton, D., Greig A., and Mckendrick I. 1999. Evidence of paratuberculosis in fox (*Vulpes vulpes*) and stoat (*Mustela erminea*). Journal of Clinical Microbiology. 145: 612-613.
- Bendixen, P. H. 1978. Immunological reactions caused by infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. Nordisk Veterinary Medicine. 30:163-168.
- Bergey, D. H. 1923. Bergey's manual of determinative bacteriology. American Society for Microbiology. Ed. Baltimore. Pág. 374-375. USA.
- Castellanos, E., Romero, B., Rodríguez, S., Juan, L., Bezoz, J., Mateos, A., Domínguez, L. y Aranaz, A. 2010. Molecular characterization of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* Types II and III isolates by a combination of MIRU-VNTR loci. Veterinary Microbiology. 144: 118-126.

- Chávez, G. G. 1998. Control de la paratuberculosis en caprinos y en ovinos. Comité de enfermedades infecciosas de los ovinos y caprinos. Consejo Técnico Consultivo Nacional de Sanidad Animal. Departamento de Patología. Facultad de Veterinaria y Zootecnia. UNAM. Disponible en: <http://www.conasamexico.org.mx>. Consultado el 12 de septiembre 2011.
- Chávez, G. G., Talavera, T. F. J., Svastova, P. y Pavlik, P. 2004. Identificación del poliformismo genético de aislamiento de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* de caprinos en el centro de México. *Veterinaria México*. 35:1
- Chávez, G. G. 2010. Plan estratégico para del programa para la atención de la paratuberculosis en ganado, bovino, ovino y caprino en México. Consultivo Nacional de Sanidad Animal. Unidad de posgrado e investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. Disponible en: <http://www.conasamexico.org.mx/conasa/pdf>. Consultado el 14 de diciembre 2011.
- Chiodini, R. J. 1989. Crohn's disease and mycobacterioses: a review and comparison of two entities in the Belgian cattle population. *American Society of Microbiology. Clinical Microbiology Reviews*. 2: 90-117.
- Chiodini, R. J., Kruiningen, H. J. and Merkal, R. S. 1984. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. *Cornell Veterinary*. 74:218-262.
- Cleland, P. C., Lehmann, D. R., Phillips, P. H., Cousins, D. V., Reddacliff, L. A. and Whittington, R. J. 2010. A survey to detect the presence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Kangaroo Island macropods. *Veterinary Microbiology*. Volume 145, Issues 3-4, Pages 339-346.
- Collins, M. T., Kenefick, K. B., Sockett, D. C., Lambrecht, R.S., McDonald, J. and Jorgensen, J.B. 1990. Enhanced radiometric detection of *Mycobacterium paratuberculosis* by using filter-concentrated bovine fecal specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 28: 2514–2519.

- Collins, T. M. and Manning E. J. B. 1995. John's Disease - The International Perspective. Department of Pathobiological Sciences. University of Wisconsin School of Veterinary Medicine. Disponible en <http://crohn.ie/archive/johneint.htm#zoonosis>. Consultado el 26 de diciembre 2011.
- Córdova, L. D. 2006. Tuberculosis y Paratuberculosis en el estado de Guanajuato. Folleto técnico INIFAP.
- Daniel, W. W. 2002. Bioestadística, Base Para el Análisis de las Ciencias de la Salud. 4^{ta} edición . Ed. Limusa-Wiley. pp. 755
- Daniels, M. J., Henderson D., Greig, A., Stevenson, K., Sharp, J. M. and Hutchings, M. R. 2003. The potential role of wild rabbits *Oryctolagus cuniculus* in the epidemiology of paratuberculosis in domestic ruminants. Cambridge Journals. 130:553-559.
- Daniels, M. J., Hutchings, M. R., Allcroft, D.J. and McKendrick, I. J. 2011. Risk factors for John's disease in Scotland the result of a survey of farmers. Animal Nutrition and Health Department. Volume 150, issue 5.
- Euzeby, J. P. M. 1997. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Disponible en <http://www.bacterio.cict.fr/>
- Gilardoni, M. V. y Mundo, S.L. 2008. Paratuberculosis bovina. Proyecto respuesta inmunológica frente a *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* en bovinos; interacción entre la bacteria y el macrófago. Infovet. Disponible en http://www.produccionanimal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciones/bovinos_en_general/88-infovet_102.pdf. Consultado el 28 enero 2012.

- Griffin, T. F. J., Hughes, A., Liggett, S. Farquar, P. A., Mackintosh, C. G. and Bakker, D. 2008. Efficacy of novel lipid-formulated whole bacterial cell vaccines against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in sheep. *Vaccine*. Volume 27 Issue 6.
- Grange, J. M. 1988. *Mycobacteria and human disease*. Ed. Eduard Arnold. Pág 63-89. USA.
- Hett, E. C. and Rubin, E.J. 2008. Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 72: 126-56.
- Jorgensen, J. B. 1984. The effect of vaccination on the excretion of *Mycobacterium paratuberculosis*. *In: Paratuberculosis: Diagnostic methods, their practical application and experience with vaccination*. Commission of the European Communities Agriculture Publication. Pág 131–136.
- Khodakaram, T. and Rashidi, K. 1999. The pathology of goat Paratuberculosis: Gross and histopathological lesions in the intestines and Mesenteric lymph nodes. *Veterinary Medicine*. Volume 47, 487- 495
- Lambeth, C., Reddacliff, L. A., Windsor, P., Abbott, K. A., McGregor, H. and Whittington, R. J. 2004. Intrauterine and transmammary transmission of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in sheep. *Veterinary Journals*. Volume 82, Issue 8, Pag 504-508.
- Lambrecht, R. S. and Collins, M.T. 1992. *Mycobacterium paratuberculosis* factors that influence mycobactin dependence. *Diagnostic Microbiology and Infection Disease*. 15:239-246.
- Levy-Frebault, V. V. and Portaels, F. 1992. Proposed minimal standards for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium*

species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.
Unité de la Tuberculose et des Mycobactéries, Institut Pasteur. 42: 315-323.

Mainar, J. R. C. 1995. Caracterización de la explotación de pequeños rumiantes de la C.A.M. e identificación de factores asociados con la seroprevalencia frente a diversas infecciones mediante encuesta y análisis multivariante. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Veterinaria.

Martínez, C. A. G., Santillan, F. M. A., Fávila, H. L. C., Córdova, L. D., Hernández, A. L. y Blanco, O. M. A. 2012. Desarrollo de un inmuno-ensayo enzimático (ELISA) para el diagnóstico de paratuberculosis en Bovinos. *Revista Mexicana Ciencia Pecuaria*. 3: 1-18.

Méndez, G. M., Perea, A. R., Enrique V. A. y García C. L. 2008. Análisis descriptivo de casos recibidos para diagnóstico de paratuberculosis ovina y caprina en el laboratorio de patología animal de Calamanda, Querétaro. Disponible en :<http://www.ovinoscaprinos.com.ar/SANIDAD/Analisis%20para%20el%20diagnostico%20de%20Paratuberculosis%20Ovina%20y%20Caprina.pdf>. Consultado el 25 de septiembre 2011.

Merino, T. 2007. Estudios de prevalencia. Universidad Católica de Chile. Disponible en: <file:///C:/Documents%20and%20Settings/Salud%20Publica/Escritorio/RecEpidem/EPIDESC6.HTM30/08/2007> . Consultado 18 de noviembre 2011.

Merkal, R. S., y Curran, B.J. 1974. Growth and metabolic characteristics of *Mycobacterium paratuberculosis*. US National Library of Medicine National Institute of Health. *Applied Microbiology*. Pág: 276-279.

Morilla, G. A. y Bautista, C. R. 1986. Manual de Inmunología. 1a edición. Ed. Diana. Pág. 51 – 62. México.

- Navneet, K. D., Eppleston, J., Richard, J., Wittington, J. A. and Toribio, L. M. L. 2007. Risk factors for Ovine Johne's disease in infected sheep flocks in Australia. Faculty of Veterinary Science. Preventive Veterinary Medicine. 82(1-2):51-71
- Quinn, P. J. Markey, M. E. Carter, W. J. C. Donnelly, F. C. and Leonard. 2002. Veterinary Microbiology and Microbial Disease. 1st Ed. Blackwell Science.
- Rajib, D., Vijay, K. S., Goswani, P. P. 2011. Diagnostic tools against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections in animals: Agricultural Research Communication Center. 32:46-54.
- Ramírez, C. 1986. Paratuberculosis *in* Principales enfermedades de los ovinos y caprinos. Ed. Pijoan y Tórtora. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. Pág. 90-101.
- Santillán, F. M. A., Córdoba, L. D., Guzmán, R. C., Jaimes M. N. 2006. Situación epidemiológica de la paratuberculosis ovina en el estado de Guanajuato. XXX Congreso Nacional de Buiatría. León, Guanajuato.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2010. Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx>. Consultado el diciembre de 2011.
- Sherman, D. M., Markham, R. J. F. and Bates F. 1984. Agar gel immunodiffusion test for diagnosis of clinical paratuberculosis in cattle. Journal of the American Veterinary Medical Association. 185, 179-182.
- Stheman, S. M and Shulaw, W. P. 2002. Paratuberculosis in sheep and goats. United States Animal Health Association. Revisado en 2011. Disponible en: <http://www.usaha.org/reports/reports97/shgojd96.html>. Consultado el 23 de noviembre 2011.

- Sweeney, R. W., Whitlock, R. H., Buckley, C. L. and Spencer, P. A. 1995. Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle. *Veterinary Diagnosis International*. 7: 488-493.
- Tapia, J. A. 1994. Incidencia: concepto, terminología y análisis dimensional. Organización Panamericana de la Salud. Programa de publicaciones Washington. 103: 140-142.
- Tapia, J. A. 1995. Medidas de prevalencia y relación incidencia-prevalencia. Organización Panamericana de la Salud. Programa de publicaciones Washington. 105: 216-218.
- Thorel, M. F. 1991. Taxonomic and genomic research on mycobactin-dependent mycobacteria. *In: Paratuberculosis: Diagnostic Methods, Their Practical Application and Experience with Vaccination. Proceedings of the Third International Colloquium on Paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis. Pág 222–235.*
- Vélez, H. M., Domínguez, P. M., Chávez, G. G. and Suárez, G. F. 1999. Control of paratuberculosis in two goat flocks. *Control Strategies and Epidemiology. Sixth International Colloquium on Paratuberculosis.*
- Zapata, R. M. M., Rodas, G. P. Maldonado, E. J. G. 2011. Paratuberculosis bovina: Conocemos la situación real de la enfermedad en la ganadería. Grupo de Investigación en Ciencias Veterinarias Centauro. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. Vol 21. No. 3.*

