

87

2-aj



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

COMPARACION DE CUATRO FORMAS DE DIAGNOSTICO DE LA PARATUBERCULOSIS EN CAPRINOS

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES-CUAUTITLAN



SECCION DE EXAMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

JOAQUIN DE LUCAS TRON

ASESORES:

DIRECTOR: CAROLINA RAMIREZ CASILLAS

CODIRECTOR: EDMUNDO PEREZ DURAN

1 9 8 4



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

	Pag.
Introducción	1
Objetivo	13
Material y Métodos	14
Resultados	20
Discusión	24
Conclusiones	26
Literatura citada	27

II.- INTRODUCCION.

a) Historia.

La enfermedad de Johne es una infección bacteriana contagiosa de los rumiantes (19, 15, 41, 2, 34), conocida también con el nombre de paratuberculosis. El agente etiológico de esta enfermedad es el Mycobacterium paratuberculosis. La enfermedad fue reportada por primera vez en Alemania en 1895 por Johne y Frothingham como una forma de tuberculosis aviar. Sin embargo, Bang, en Dinamarca, aisló el mismo bacilo ácido-resistente y sugirió el nombre de paratuberculosis. En los Estados Unidos se aisló el bacilo paratuberculosis en 1916 (39). Twort lo cultivó por primera vez en medios artificiales (15, 11, 2).

b) Características de la bacteria.

El Mycobacterium paratuberculosis es una bacteria, gram positiva, ácido resistente, no esporulada que mide alrededor de 1 a 2 micras de largo por 0.5 micras de ancho. Semejante antigénicamente y morfológicamente a las micobacterias que causan tuberculosis, es un organismo difícil de cultivar debido a que no crece con facilidad en medios normales de laboratorio, pero metaboliza y prolifera lentamente en agar de yema de huevo que contiene un factor de crecimiento llamado mycobactina, derivado del extracto de Mycobacteria phley o bacilos tuberculosos muertos (28). Este microorganismo puede persistir en pastizales durante períodos prolongados conservando su capacidad infecciosa hasta por un año, es relativamente susceptible a la desecación, luz solar, concentraciones elevadas de calcio y al pH alto del suelo. El organismo muere con la exposición durante 15 minutos a compuestos cresílicos diluidos en una proporción 1:64, fenol diluido 1:40, ortofenilfenato de sodio diluido 1:200, alcohol etílico al 70% y cloruro de mercurio al 0.1% (2).

Se han identificado tres cepas de M. paratuberculosis que -

manifiestan cierto grado de especificidad del hospedador en condiciones naturales. La cepa más usual es la bovina que parece tener escasa patogenicidad para los óvidos. Una segunda cepa se ha aislado de ovinos y es capaz de infectar a los bovinos en forma natural. Difiere -- del tipo clásico por ser más exigente en sus requerimientos. Un tercer tipo se caracteriza por la producción de un intenso pigmento naranja tanto en tejidos como cultivos y se ha encontrado sólo en borregos de Escocia (14). Se ha informado de una variante pigmentada que - produjo una lesión anaranjada en los ganglios linfáticos mesentéricos e intestinales de una ternera infectada por vía experimental (14, 15).

c) Transmisión.

Los animales adquieren la infección a una edad temprana, generalmente durante los primeros seis meses como resultado de la ingestión de microorganismos que son eliminados en las heces de los animales infectados siendo esta infección subclínica (36, 27, 18, 20, -- 29). Son susceptibles ratones y cuyos, en los cerdos que conviven con bovinos infectados se comprueba a menudo agrandamiento de los ganglios linfáticos mesentéricos, por lo que hay que considerar la posibilidad del cerdo como reservorio de la infección (15, 23). También - los caballos pueden tener un papel importante como reservorios de la enfermedad al igual que las llamas y algunos rumiantes salvajes (25, 11).

Hay algunas evidencias de animales que pueden ser susceptibles a nuevas infecciones a lo largo de su vida dentro del rebaño si el nivel de contaminación es suficientemente alto (39).

Blood (1968) menciona que 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, el elevado rendimiento lácteo y las enfermedades in

terrecurrentes, pero con ciertas irregularidades pues la enfermedad es a menudo más grave en efectivos muy bien tratados y los brotes clínicos pueden darse sin que sean causas predisponentes o precipitantes (15).

La enfermedad de Johnne es casi siempre introducida a un rebaño por un animal infectado, el cual no muestra signos al momento de la compra. Un retraso en el diagnóstico, en el cual un animal empieza a mostrar síntomas puede resultar en el establecimiento de la enfermedad, pues para entonces, las instalaciones estarán excesivamente contaminadas con organismos, esto forma una situación ideal para la perpetuación del padecimiento en un rebaño el cual previamente era libre. Esto es importante puesto que gran porcentaje de los rebaños de cabras en México están formados por animales importados de países donde esta enfermedad existe con alta incidencia (7, 24).

d) Reproducción experimental.

La mucosa intestinal macerada es considerada como el mejor material de inoculación cuando se suministra por vía oral. La enfermedad se puede reproducir en algunos animales de laboratorio como ratones, hamsters, ratas y conejos; esto es importante porque la enfermedad puede entonces reproducirse experimentalmente. El éxito al usar estos animales depende de que estén sin destetar. La edad de mayor susceptibilidad y el desarrollo de las lesiones es importante en estos animales de laboratorio, porque estos hechos se repiten en el hospedero natural; los animales de laboratorio infectados no muestran diarrea ni adelgazamiento (15).

e) Signos.

Con frecuencia, los animales infectados se sacrifican por otras razones como problemas reproductivos o mastitis, antes de

que los signos típicos de la enfermedad se manifiesten.

El período de incubación de esta enfermedad es prolongado e irregular. Los síntomas se manifiestan generalmente entre los 3 a 5 años de edad, sin embargo los animales de uno a dos años pueden mostrar síntomas (2, 15, 16, 18, 19, 31) y un alto porcentaje de animales infectados en un hato puede no desarrollar la enfermedad clínica. De cualquier forma estos animales estarán eliminando intermitentemente el microorganismo por las heces quedando como reservorios para nuevas infecciones (20, 29, 40).

Los bovinos con paratuberculosis clínica son fácilmente reconocidos por la presencia de diarrea profusa crónica acompañada -- por una pérdida progresiva y severa de peso con debilitamiento, pueden presentar fiebre intermitente (2, 11, 12, 15, 29). En contraste -- las cabras afectadas 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 vuelve -- blanda; la pérdida progresiva de peso puede ser en muchos casos el -- único signo aparente pero no específico (2, 8, 15, 37, 39). Los animales que presentan el padecimiento de una manera subclínica donde los únicos signos aparentes serán la mala conversión alimenticia, la baja en la producción láctea y por lo mismo menos peso al mercado, pasando la mayor de las veces desapercibidos y en el último de los casos se -- nota sólo en el costo de la producción para el ganadero.

f) Diagnóstico clínico.

El diagnóstico en vivo de la enfermedad de Johne en la -- cabra es muy incierto ya que en el estado temprano no muestra síntomas, los cuales en los últimos estadios son inespecíficos (8, 39), -- por lo que el diagnóstico clínico en muchas ocasiones debe ser confirmado por exámen posmortem al igual que en los ovinos y bovinos.

Se ha reportado que la infección al momento del nacimiento es posible y ultimamente también la infección fetal. Se ha encontrado en vacas que no presentan síntomas, además se le asocia como causante de abortos y mastitis; en toros se ha aislado en líquido seminal y testículos (16, 33, 36). En los tipos fulminantes de la infección -- hay una bacteremia y precisamente en estos casos poco corrientes es -- cuando el germen se elimina con la leche. Esta excreción no ha sido de mostrada en las ovejas, pero sí la infección uterina (15).

El grado de este problema en cabras no es completamente conocido pero puede tener serias repercusiones para programas de control y erradicación.

Un hecho importante para realizar un diagnóstico diferencial es que el apetito de los animales afectados se conserva y el conocimiento permanece claro. Algunas afecciones como la pielonefritis, la helmintiasis, sobre todo la ostertagiosis, la fasciolosis crónica, la acidosis hepática y la intoxicación con molibdeno pueden tener un cuadro muy similar a este padecimiento (15). Esto hace difícil el poder asegurar un diagnóstico de esta enfermedad antes de la muerte en forma preclínica aún en los casos de clara sintomatología.

Por otro lado Jubb y Kennedy (1970) mencionan que la gravedad de las lesiones no guarda relación con la diarrea y la emaciación, que en realidad algunos animales con lesiones graves pueden aparecer clínicamente normales, mientras que muchos gravemente afectados crónicamente no muestran lesiones macroscópicas definidas. En ovinos y caprinos es normal que las lesiones macroscópicas sean mínimas; las únicas lesiones específicas macroscópicas se encuentran en el intestino y ganglios linfáticos regionales. Las lesiones macroscópicas son nódulos linfáticos edematosos con caseificación y a menudo un proceso --

parcial de calcificación principalmente confinado a la región cortical, en el yeyuno e ileon, se pueden presentar varios grados de engrosamiento de la mucosa y con menor frecuencia corrugación marcada. Las lesiones microscópicas en los nódulos linfoides son áreas de células epitelioides confluentes en su mayor parte confinadas a la región cortical. Estas células usualmente contienen abundantes bacilo ácido resistentes. Células gigantes de tipo Langhans son vistas rara vez en las etapas tempranas de la enfermedad. En los estados tardíos hay evidente formación nodular de caseificación o focos de calcificación en los ganglios linfáticos, el hallazgo más común en la mucosa del intestino delgado son acúmulos de células epitelioides conteniendo gran número de bacilos ácido resistentes. Esta infiltración celular ocasionalmente penetra dentro de la submucosa (1, 8, 9, 10, 12, 17). Las lesiones que se mencionan como específicas de válvula ileocecal y regiones inmediatas a ella son tan inaparentes que carecen de importancia (15).

g) Patogenia.

En la mayoría de los casos, los organismos son ingeridos durante la etapa de lactancia, después de ingeridos comienzan a multiplicarse lentamente en la lámina propia del intestino y ganglios linfáticos.

Se han hecho algunos experimentos tratando de explicar los pasos que se llevan a cabo al ponerse en contacto los microorganismos con la mucosa intestinal. Independientemente de la vía de inoculación, aunque el microorganismo puede aparecer en varios órganos gradualmente su presencia se hace más predominante en el tracto intestinal. Woolcock (1979) da una explicación para el tropismo que manifiestan los bacilos paratuberculosos hacia este tejido, sugiriendo que podría ser por la estimulación de las enzimas oxidativas de los macrófagos intestinales liberados después de la infección, menciona también que -

el aumento en la disponibilidad de intermediarios metabólicos en estos macrófagos y no en células similares en otras localizaciones pueden -- estimular la multiplicación bacteriana. Este estímulo para el creci--- miento podría ser fortalecido por la presencia de otros nutrientes in--- tésitiales o algunos factores de crecimiento; estos productos a pesar de que se encuentran extracelularmente, pueden estar disponibles para los organismos localizados en las vacuolas fagocíticas. Este ambiente - favorable para el crecimiento microbiano se hace más óptimo por la pér--- dida de la actividad lisosomal de los macrófagos, los cuales están de--- dicados a ingerir los bacilos paratuberculosos que se están multipli--- cando en la lámina propia del intestino, como los microorganismos se - multiplican aquí, quedan protegidos de los anticuerpos formados por el animal y de la mayoría de los antimicrobianos usados como tratamien--- tos. El englobamiento de un gran número de bacterias por los macrófa--- gos da como resultado la pérdida de la estructura vacuolar y de aquí - que la actividad bacteriana de los lisosomas sea eliminada. Los meca--- nismos inmunológicos por medio de los cuales se desencadena la diarrea y la respuesta febril son explicados por Woolcock (1979) de la siguien--- te manera: a) puede haber una reacción antígeno-anticuerpo en el intes--- tino afectado, esta reacción de tipo hipersensibilidad inmediata po--- dría resultar en la liberación de histamina con la consecuente presen--- tación de diarrea; b) puede haber una reacción de tipo hipersensibili--- dad retardada involucrando a los antígenos de Mycobacterium paratuber- culosis y a los linfocitos sensibilizados. En general, de esta reac--- ción resulta la liberación de linfocinas; en el caso particular de la enfermedad de Johne se ha especulado que algunos de estos pueden me--- diar en otras características de la infección. Así si la citotoxina -- (que es una sustancia liberada por linfocitos sensibilizados y que ma--- nifiesta citotoxicidad inespecífica para varias células blanco en dife-

rentes especies animales) es liberada, puede tener relación con la atrofia muscular, leucopenia, anemia y daño renal en la infección por paratuberculosis: por lo tanto se libera un pirógeno que es expulsado de -- las células inflamatorias y esto podría ser entonces la explicación para la presentación de la fiebre que forma parte del cuadro clínico. La confirmación de estos eventos que parecen llevarse a cabo en el intestino, proviene de animales infectados con bacilos de Johne a los que se les administró una dosis de Johnina. En estos animales indujo la fiebre y la diarrea, que pudo ser tratada posteriormente con drogas antihistamínicas (Fig. I).

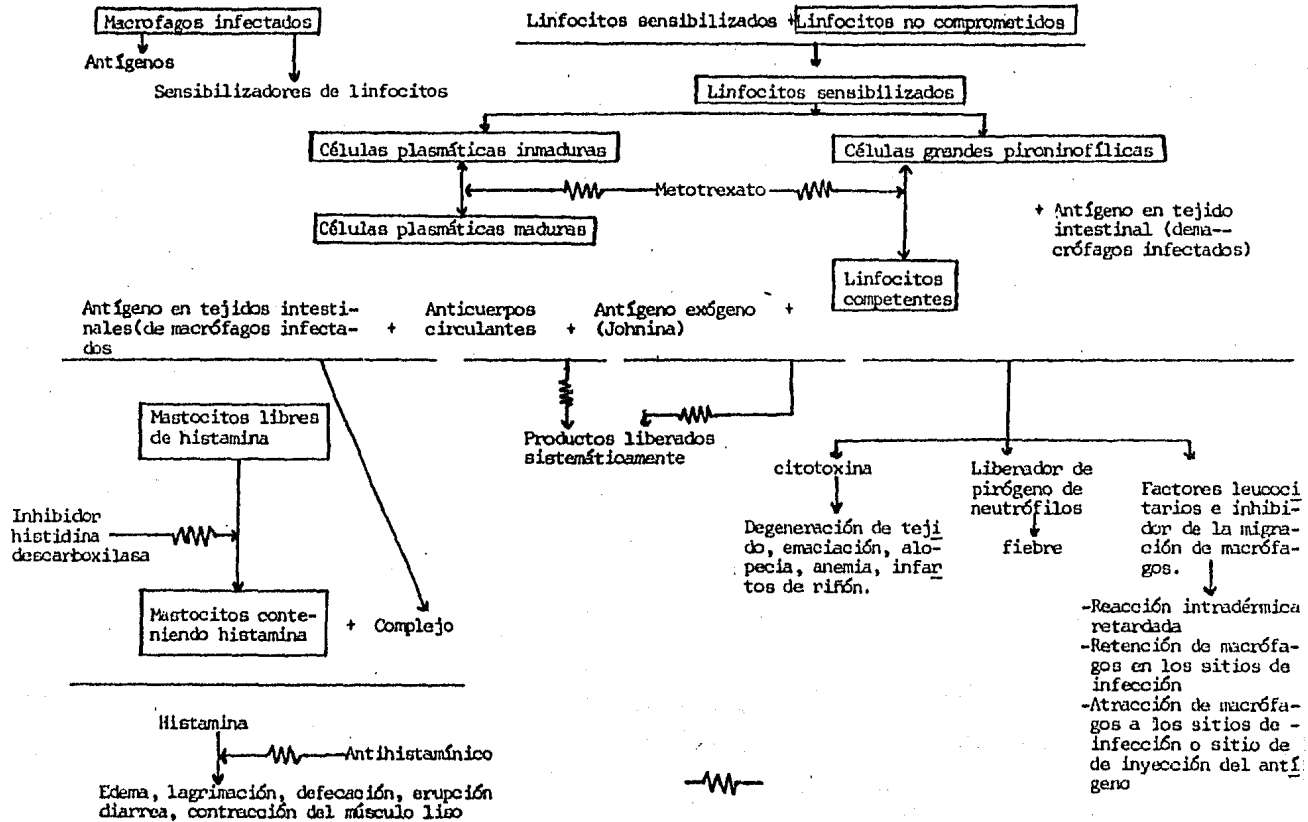
Los estadios de la enfermedad son semejantes a los de la lepra, en donde se observa fase de tubérculo, fase intermedia y forma lepromatosa. Los animales que presentan una respuesta inflamatoria inmunológica activa, muy similar a la fase de tubérculo, tienen poca cantidad de organismos en sus tejidos y manifiestan reacciones de hipersensibilidad retardada con la aplicación de Johnina o tuberculina aviar. En la fase intermedia, animales mucho mas contaminados, manifiestan poca reacción cutánea y los animales que presentan una gran cantidad de -- microorganismos englobados por macrófagos, semejante a la forma lepromatosa, con frecuencia fallan a reaccionar a la prueba intradérmica con -- Johnina o tuberculina aviar (43).

h) Diagnóstico de Laboratorio.

No obstante la importancia de esta enfermedad, uno de los grandes problemas que presenta es el diagnóstico. Es importante que --- éste sea hecho a nivel de hato y que también el tiempo para llevarlo a cabo sea menor, para que de esta manera se puedan tomar las medidas necesarias para controlar este padecimiento.

De acuerdo con Larsen (1968), el ganado expuesto a Myco-- bacterium paratuberculosis puede clasificarse en cuatro categorías: --- 8

Fig. I.- Vías sugeridas de las reacciones inmunobiológicas para la producción de los signos clínicos de la enfermedad de Johne, y los puntos en los que varios agentes pueden actuar (Traducido de Woolcock, 1979)



1) animales clínicamente enfermos, 2) animales asintomáticos, 3) animales portadores que no eliminan bacilos y 4) animales no infectados. De esta clasificación es importante el diagnóstico que pueda hacerse de los animales asintomáticos, pues evidentemente van a esparcir la enfermedad a corto o largo plazo. Es de gran importancia la detección de los animales que presentan la enfermedad en forma subclínica pues la erradicación de este padecimiento del hato sólo es posible eliminando estos animales (27).

Para el diagnóstico de paratuberculosis se han empleado la mayoría de las pruebas serológicas y alérgicas usadas en el diagnóstico de otras enfermedades. En bovinos éstas no han dado buenos resultados en condiciones de campo para identificar infecciones subclínicas, pues existe una alta incidencia de resultados falsos positivos y falsos negativos (25, 26). Estos resultados pueden atribuirse a varios factores incluyendo la falla en el uso de una prueba única para identificar animales individualmente durante el curso completo de la infección y la ocurrencia de reacciones cruzadas en animales que estuvieron expuestos a otras bacterias y hongos (39).

Los hatos de cabras infectados naturalmente no han sido estudiados tan extensamente como el ganado bovino, aceptándose generalmente que se presentan las mismas limitaciones en pruebas de diagnóstico cuando se aplican a cabras.

x El examen por cultivo ha sido el método más uniforme para detectar infección en el ganado bovino aparentemente sano. El tiempo entre la recolección de la muestra fecal o de órgano y la obtención de resultados es mucho más largo que en otros métodos de diagnóstico, pero un resultado positivo es definitivo (29, 30, 31, 33), sin embargo, el cultivo de heces resulta muy deficiente por la gran variedad y número de microorganismos que estas contienen, la cantidad de mycobacterias excretadas en las heces debe ser aproximadamente de cien microorganismos-- 10

mos por gramo de muestra y porque el microorganismo se excreta intermitentemente (6, 13, 15). El frotis de heces de raspado de mucosa rectal coloreado con Ziehl-Neelsen es el método de mayor empleo por su rapidez, facilidad y economía a pesar de que según Doyle (1946) sólo detecta el 30% de los animales enfermos (7). Por otro lado debido a que existe estrecha semejanza morfológica no es posible hacer una diferenciación positiva entre tuberculosis y paratuberculosis bajo el microscopio (33, -45).

Otra forma de diagnóstico es la prueba de la Johnina, ésta se prepara del bacilo de Mycobacterium paratuberculosis, es usada subcutánea, intravenosa e intradérmicamente. La prueba dérmica parece ser una de las menos específicas como método. Otros investigadores reportan una buena correlación con la prueba de la Johnina en animales artificialmente infectados, pero en una infección natural la reacción varía de moderada a inconcluyente; pueden ocurrir reacciones falsas por infección con otras mycobacterias y organismos relacionados. Sin embargo hubo una tendencia general a una prevalencia alta en los hatos donde el organismo fue aislado, sugiriendo que la prueba de hipersensibilidad puede tener valor sobre un hato base (42). En un estudio semejante llevado a cabo en bovinos se encontró que la prueba intradérmica era la mejor, ya que el bacilo fue encontrado post-mortem en el intestino del 56% de los animales reactores positivos, aunque encontraron también bacilos en el intestino de 5 animales no reactores (17).

En la prueba intradérmica se produce una reacción local comparable a la vista con la tuberculina (34).

Una nueva técnica de diagnóstico es la prueba de Inmuno--difusión en agar, de la que actualmente existen algunas publicaciones, que sugieren esta prueba como una técnica superior para la identificación de borregos y cabras infectados con Mycobacterium paratuberculosis (1, 4, 7, 16, 17). Esta prueba implica la formación de una línea de pre

cipitación en medio semisólido (agar) entre el organismo causante y los anticuerpos contra el organismo, presente en el suero de cabras infectadas. Sorprendentemente esta prueba ha sido de poco valor cuando es aplicada al diagnóstico de la enfermedad de John en ganado bovino, pero parece ser completamente precisa cuando es aplicada a ovinos y caprinos (1, 28, 30, 39). La prueba es de bajo costo, requiere una pequeña muestra de suero de cada animal y puede dar resultados en 24 horas. Aunque generalmente es una prueba de diagnóstico aceptada, el potencial para el futuro es extenso por su aplicación en el diagnóstico de paratuberculosis a nivel de hato en las especies ya mencionadas (39).

i) Problemática en México.

En México Unzueta (1936), informó la presencia de esta enfermedad por primera vez 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 fue hecho por Ramírez y col. en 1978 (38).

Existe poca información sobre este padecimiento a nivel mundial en cabras, acerca de la prevalencia y métodos para tratar de diagnosticarla. En México, esta especie es explotada en su mayoría por pequeños propietarios o ejidatarios para los cuales es totalmente desconocido el problema.

La relevancia de esta enfermedad radica en el factor económico, pues aunque la mortalidad que produce no es mayor a 3 a 5%, sí produce una alta morbilidad que se ve reflejada en animales que consumen su ración de alimento normalmente, pero que van perdiendo peso paulatinamente y bajan su producción lechera por lo tanto al salir al mer-

cado son mal pagados.

Como en muchas otras enfermedades la investigación de este padecimiento en cabras, en nuestro país ha sido relegado a un tercer plano y por consiguiente el grado de diseminación que existe en México es desconocido.

III.- OBJETIVOS.

El objetivo de este trabajo consiste en comprobar cuatro técnicas de diagnóstico de paratuberculosis en cabras a nivel de hato.

Estas técnicas serán:

- a) Cultivo bacteriológico a partir de heces y órganos.
- b) Inmunodifusión.
- c) Histopatología.
- d) Intradermorreacción.

IV. - MATERIAL Y METODOS.

A) Materiales

a) Material biológico. 50 cabras con una edad promedio de 5 años, de las razas Saanen, Toggenbourg y Alpina.

b) Material para Cultivo Biológico.

Guantes de nylon

Mortero de porcelana

Tubos con medio de Herrolds con y sin micobactina

Pipetas

Frascos de cristal estériles.

Zephirán al 3%

Estufa

c) Material para Inmuno Difusión.

Tubos y agujas vacutainer

Cajas de Petri con agarosa al 1% con 5 mm. de grosor.

Antígeno liofilizado - I.D.

Centrífuga.

d) Material para Histopatología.

Formol amortiguado al 10%

Histokinette

Parafina de laboratorio (punto de fusión 56%)

Micrótopo

Baño de flotación de tejidos

Platina de calentamiento

Microscopio óptico

Reactivos y colorantes para tñir de Hematoxilina-eosina y Ziehl-Neelsen.

Portaobjetos.

e) Material Intradérmo Reacción.

Jeringas 2 ml.

Johnina

Vernier

3) Método.

a) Animales:

El hato bajo estudio pertenece a un rancho de cabras lecheras y el pie de cría localizado en el Estado de Guanajuato, el cual en su origen se formó importando sementales y hembras de los Estados Unidos, país en donde la enfermedad de John está ampliamente diseminada (19). Se formó un grupo de 50 cabras sospechosas de padecer paratuberculosis por las manifestaciones clínicas que presentaban, que concordaban con las que se mencionan en la literatura; éstas son: emaciación, debilitamiento progresivo, decremento de la producción láctea, ausencia de fiebre, apetito normal y ninguna respuesta a tratamientos antimicrobianos (2, 15, 18, 23, 40). Estos animales tenían un promedio de 3 a 5 años de edad. A este grupo se les realizó la prueba de Inmunodifusión y Cultivo de heces, de este grupo se separaron 35 cabras al azar para realizar la prueba de intradermorreacción y de aquí se escogieron 10 animales que se sacrificaron para el examen post-mortem.

b) Prueba Serológica:

Se practicaron con suero obtenido por punción yugular empleando tubos vacutainer, se colectaron 10 ml. por animal. Se realizaron 3 muestras: el primero a los 50 animales, el segundo a los 35 animales que se les realizó la prueba intradérmica y el tercero a los 10 animales al momento del sacrificio. La prueba se realizó por el método de inmuno difusión en gel que es como sigue: se utilizó un medio con 0.75% de agorasa y TRIS buffer 0.3% con pH 7.7, éste se colocó en cajas de petri, se perforó el medio con siete agujeros, utilizando la perforación central para el antígeno*, dos agujeros laterales para los sueros controles, tanto positivo como negativo y en las perforaciones restantes

*El antígeno no fue proporcionado por el Dr. Richard Merkall, National Animal Disease Laboratory, Ames, Iowa.

se depositaron los sueros sospechosos.

El antígeno fue un extracto protoplásmico de la cepa de la boratorio número 18 de Mycobacterium paratuberculosis, preparado por un fraccionador hidráulico, centrifugado a 40,000 xg durante 2 horas, el antígeno estaba liofilizado; se reconstruyó para usarse en una concentración de 10 mg/ml. La presencia de una o más líneas de precipitación claras y definidas, semejantes a las del suero control positivo en gel después de 48 horas se consideró como un resultado positivo.

c) Cultivo a partir de heces.

Se colectaron muestras de los tres grupos antes mencionados. Las muestras de heces fueron tomadas utilizando un guante desechable por cada animal para extraer directamente del recto de 2 a 3 bolas de excremento, cada guante se invirtió y fue marcado con el número de cada animal para realizar posteriormente el cultivo bacteriológico.

d) Prueba Intradérmica:

Se realizó en el hato de 35 animales a los cuales se les aplicó 0.2 ml. de Johnina vía intradérmica en el pliegue anocaudal previa medición del grosor y midiéndose a las 24 y 48 horas. Se tomaron como positivos a los animales que mostraron un aumento de más de 5.5 mm. en las mediciones posteriores a la inoculación.

e) Exámen Post-mortem.

Se sacrificaron 10 cabras según el cuadro I. Dos animales fueron clínicamente negativos y los demás positivos.

Se hizo la observación microscópica de las vísceras y se tomaron dos muestras por animal de intestino delgado, válvula ileo-cecal y ganglios mesentéricos, se colocó una porción en frasco estéril para cultivo bacteriológico y la otra se colocó en un frasco con formol - tamponando al 10% para análisis histopatológicos. Los animales se muestrearon de mayo a septiembre de 1982.

CUADRO I

No. de animales	INMUNO DIFUSION	CULTIVO DE HECES	INTRADERMO- REACCION
2	+	+	+
2	-	-	-
2	-	-	+
3	+	-	+
1	-	+	+

f) Exámen Histológico.

Las muestras tomadas para histopatología se trabajaron con la técnica de rutina de Culling (5), se hicieron cortes de 5 micras de grosor y se colorearon con hematoxilina-eosina y colorantes para ácido-resistentes.

g) Pruebas bacterianas.

Para intentar el aislamiento del Mycobacterium paratuberculosis a partir de heces y vísceras (intestino delgado, válvula ileocecal y ganglios mesentéricos) se realizó bajo los métodos de rutina, recomendado por R. Merkal (1971), los cuales consisten en:

a) Los especímenes sospechosos se colocarán en un homogenizador vitris con el fin de liberar los bacilos de las células epiteliales y fagocíticas.

b) A continuación se depositarán durante 12 horas en una solución de cloruro de benzalconio (zephirán) al 0.3% para destruir hongos y bacterias contaminantes (32, 35).

c) Se inoculan medios de yema de huevo con y sin micobactina incubándose a 38°C con tapones flojos durante una semana para desecar el medio y posteriormente se aprietan dejándose en incubación un máximo de cuatro meses para posteriormente observar los resultados.

d) Se seleccionarán las colonias sugestivas y se preparan

frotis los cuales se colorean por la técnica de Ziehl Neelsen.

Todas las muestras de heces como de órganos se sembraron en dos tubos por espécimen siguiendo esta técnica.

V.- RESULTADOS.

Los resultados obtenidos del primer muestreo que se realizó a 50 animales fueron los siguientes: 44% (22 animales) positivos y 56% (28 animales) negativos a la prueba de Inmunodifusión en gel, para la prueba de Cultivo de Heces se obtuvo un 20% (10 animales) positivos y un 80% (40 animales) negativos. La correlación entre los animales positivos a Inmunodifusión y el aislamiento de Mycobacterium paratuberculosis a partir de heces es de 16% y un 50% para los negativos (Cuadro - II).

CUADRO II

Resultados del estudio serológico y bacteriológico practicado con muestras del hato de 50 cabras clínicamente enfermas.

No. de casos	%	INMUNO DIFUSION	AISLAMIENTO DE <u>Mycobacterium paratuberculosis</u> a partir de heces
15	30	+	-
3	4	-	+
7	16	+	+
23	50	-	-
% total de positivos		44%	20%

En el hato de 35 animales muestreados posteriormente, se obtuvo un 82.8% de positivos, 17.1% de negativos a la prueba Intradérmica; un número menor de animales fueron positivos a las otras pruebas: 37.14% a la prueba de Inmunodifusión en Gel y un 40% al cultivo fecal, un 62.8% y 60% fueron negativos a estas pruebas respectivamente. La correlación de positivos entre las tres pruebas es de un 22.8% y de negativos a estas pruebas 17.1 (Cuadro III).

Todos los animales positivos al Cultivo fecal lo fueron -

CUADRO III

Resultados de las pruebas de Intradermo-reacción, Inmunodifusión y Cultivo de heces de 35 animales.

No. de casos	%	INMUNO DIFUSION	CULTIVO DE HECES	INTRADERMO- REACCION
8	22.8	+	+	+
6	17.1	+	+	+
10	28.5	-	-	+
5	14.2	+	-	+
6	17.1	-	-	-
% de casos positivos		37.14	40	82.8

también a la prueba Intradérmica y de Inmunodifusión en gel; sin embargo 6 animales (17.1%) fueron positivos a la prueba Intradérmica pero no al cultivo de heces e Inmunodifusión en gel.

De los 10 animales sacrificados 9 fueron positivos al Cultivo de Organos y a la Histopatología de ganglio e intestino. Los resultados de estas pruebas de diagnóstico se pueden observar en los Cuadros IV y V.

Histológicamente hubo enteritis crónica, la mucosa y la submucosa estaban infiltradas con células leucocitarias, predominando linfocitos y células epitelioides. Los vasos linfáticos estaban dilatados con las paredes engrosadas debido a una infiltración de células mononucleares, en su mayoría linfocitos y células epitelioides. En los ganglios linfáticos mesentéricos hubo granulomas con centros.

CUADRO IV

Resultados de las pruebas realizadas a los 10 animales

No.	Cultivo de Organos		Histopatología		Intradermorreacción	Inmunodifusión	Cultivo de Heces
	I. Delgado	Ganglio L	I. Delgado	Ganglio L			
1.-	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
2.-	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)
3.-	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
4.-	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
5.-	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
6.-	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
7.-	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
8.-	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
9.-	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
10.-	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

CUADRO V

Resultados de los 10 animales a los cuales se les realizaron todas las pruebas expresado en porcentajes.

	CULTIVO DE ORGANOS E HISTOPATOLOGIA	INTRADERMO- REACCION	INMUNODIFUSION	CULTIVO DE HECES
POSITIVOS	90%	80%	50%	40%
NEGATIVOS	10%	20%	50%	60%

A la necropsia las lesiones encontradas fueron similares en 9 de los animales. En general hubo peritonitis sobre la serosa del intestino delgado, también se encontraron nódulos en la mucosa y submucosa de este órgano; los ganglios linfáticos mesentéricos estaban alargados y edematosos, a través de la cápsula eran visibles algunos focos blanquecinos, la mucosa intestinal se encontraba hiperémica y el contenido intestinal acuoso.

VI.- DISCUSION.

1.- La técnica de Histopatología apoyada por el cultivo de órganos, se tomó como base para comparar los resultados obtenidos con el aislamiento del microorganismo y la observación de las lesiones que ocasiona esta enfermedad. Es mencionado por Fodstad (1979) que el examen pos-mortem es el método de diagnóstico mas confiable de la enfermedad de Johnes en la cabra. Estos resultados son similares a los encontrados en este trabajo.

2.- La prueba de Intradermorreacción se reporta como la menos específica de estas pruebas de diagnóstico (Sherman, 1980). Esto es porque puede dar una reacción cruzada con animales tuberculinizados, esto se presenta en ganado bovino donde esta prueba se lleva a cabo rutinariamente (Donald, 1977). En cabras esto no ocurre ya que esta práctica no se realiza en México. Sin embargo se reporta una prevalencia alta de animales positivos en hatos donde el organismo ha sido aislado (Sherman, 1980). En este trabajo se observó que tiene una alta sensibilidad en comparación con la técnica de Histopatología y Cultivo bacteriológico.

3.- La prueba de Inmunodifusión se menciona como una prueba nueva y que parece ser completamente precisa cuando es aplicada en ovinos y caprinos (Baas, 1977, Lenghans, 1977, Merkal, 1971, Sherman, 1980).

En este trabajo esta prueba al igual que el cultivo de heces en comparación con la técnica de histopatología y cultivo de órganos mostró que da un alto porcentaje de falsos negativos.

4.- Cultivo de heces es mencionado por Colling (1974), Haganll (1970), Kopecky (1975), Sherman (1980), que es la técnica mas confiable para dar un diagnóstico definitivo de paratuberculosis. En este trabajo se encontró que esta prueba presentó un margen alto de falsos negativos, esto se puede apoyar en que la cantidad de microorganismos excretados en las heces debe ser aproximadamente de cien microorganismos por gra-

mo de muestra para que el microorganismo pueda ser aislado y que este - se excreta intermitentemente según Donald (1977), Johnson (1949) y Julian (1975).

VII.- CONCLUSIONES.

1.- Es evidente que el empleo de una sola prueba para diagnosticar la enfermedad de Johne a nivel de hato no es suficiente.

2.- El empleo de las pruebas de Intradermorreacción e Inmunodifusión para determinar la diseminación de la enfermedad en un hato puede dar buen resultado, una vez que el microorganismo ha sido aislado en cultivo de heces, además el empleo de estas pruebas tiene una aplicación práctica para realizar estudios epizootiológicos por su bajo costo y facilidad de realizar.

3.- Dado el pequeño número de animales utilizados en este trabajo a los cuales se les realizaron todas las pruebas se recomienda continuar con este estudio con un mayor número de animales para obtener mayor confiabilidad sobre el diagnóstico de esta enfermedad.

VII.- BIBLIOGRAFIA

- (1).- Baas, E.J., 1977: Paratuberculosis in goats, Jour.Am.Vet.Med.Ass. 171:1254.
- (2).- Blood, D.C. and J.A. Henderson, 1968: Veterinary Medicine. 3rd. Ed. Baltimore, Williams and Wilkins Co., Baltimore, p.401-406.
- (3).- Bustamante X., 1974: Detección de anticuerpos a Mycobacterium paratuberculosis por medio de la prueba de fijación de complemento. Tesis de Licenciatura, Fac. de Med.Vet. y Zoot., Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.
- (4).- Cowan, S.T. and K.J. Steel, 1974: Manual for the identification - of Medical Bacteria, 2nd. Ed., Cambridge University Press, ----- Cambridge.
- (5).- Culling, C.F.A., 1974: Handbook of histopathological and histochemical techniques, 3rd. Ed., Butterworths, London, p. 151.
- (6) Donald W. Johnson, 1977: (Skin) Testing, Fecal Culture and Lymphocyte Immunostimulation in Cattle Inoculated with Mycobacterium paratuberculosis. Am.Jour.Vet.Res. Vol.38, No.12.
- (7).- Doyle, T.M., 1956: Johne's disease; Vet.Rec., 68:869-877
- (8).- Fodstad, F.H. and E.Gunnarsson, 1979: Post-mortem examination in the diagnosis of Johne's disease in goats, Acta.Vet.Scand., 20: 157-167.
- (9).- Gilmour, N.J., 1976: The pathogenesis, diagnosis and control of Johne's disease, Vet. Rec., 99:433-434.
- (10).- Gunnarsson, E. and F.H. Fodstad, 1979: Cultural and biochemical characteristic of Mycobacterium paratuberculosis isolated from - goats in Norway, Acta. Vet. Scand., 20:122-134.
- (11).- Hagan, W.A., W.D. Bruner y J.H. Guilliespie, 1970: Enfermedades - infecciosas de los animales domésticos, 3a. Ed., La Prensa Médica Mexicana, México.
- (12).- Jensen, R. and B.L. Swift, 1982: Disease of sheep; 2nd.Ed., Lea -- and Febiger, Philadelphia, p.194-196.
- (13).- Johnson, H.W., A.B. Larsen, R.R. Henley and A.H. Groth, 1949: -- Studies of Johnin. VI. The relationship of the allergens of ---- Mycobacterium paratuberculosis vars. Avium, Bovis and Hominis -- and Mycobacterium phlei. Am. Jour. Vet. Res., 10:138-141.
- (14).- Jubb, D.V.F. and P.C. Kennedy, 1970: Pathology of Domestic Animals 2nd. Ed., Academic Press., London.
- (15).- Julian, R.J., 1975: A short review and some observations on ----- Johne's disease with recommendations for control, Can. Vet. Jour. 16:33-43.
- (16).- Kopecky, K.E., 1973: Distribution of bovine paratuberculosis in - the United States. Jour. Am. Vet. Med. Ass., 9:787-788.
- (17).- Larsen, A.B., 1952: Te evaluation of acid-fast allergens on sensitized goats. Am. Jour. Vet. Res., 49:545-548.
- (18).- Larsen, A.B., 1954: Johne's disease- Its diagnosis and control; - Am. Vet. Med. Assoc., Ninety-First Annual Meeting, Seattle pp. 98-100, Aug. 23-26.
- (19).- Larsen, A.B., 1968: Johne's disease and the practitioner; The --- South-Western Veterinarian, Bol XXI, No.3: s/P.
- (20).- Larsen, A.B., 1973: Johne's disease. Immunization and diagnosis. Jour. Am. Vet. Med. Assoc., 163:902-903.
- (21).- Larsen, A.B., A.L. Baisden and R.S. Merkai, 1955: A comparison of regular intradermic Johnin and purified protein derivated of intradermic Johnin on artificially and naturally sensitized ruminants. Am. Jour. Vet. Res., 58:35-37.

- (22).- Larsen, A.B., A.H. Groth and H.W. Johnson, 1950: Allergic Response to Johnin and Tuberculin of various skin regions of cattle. -- Am. Jour. Vet. Res. 40:301-303.
- (23).- Larsen, A.B., W.M. Harley and R.S. Merkal, 1971: Susceptibility of swine to Mycobacterium paratuberculosis. Am. Jour. Res., ---- 4:589-595.
- (24).- Larsen, A.B., H.A. Groth, 1949: Johne's disease in the United States, Vet. Med. Vol XXI, No. 7 July.
- (25).- Larsen, A.B., W.M. Moon and R.S. Merkal, 1972: Susceptibility of horses to Mycobacterium paratuberculosis. Am Jour. Vet. Res. 11: 2185-2189.
- (26).- Larsen, A.B., T.H. Vardaman and R.S. Merkal, 1963: An extended -- study of a herd of cattle naturally infected with Johne's disease. I. The significance of the Intradermic Johnin Test. Am. Jour. Vet. Res., 98:91-93.
- (27).- Larsen, A.B., T.H. Vardaman and R.S. Merkal, 1963: An extended -- study of a herd of cattle naturally infected with Johne disease. The significance of the complement-fixation test, Am. Vet. Res., 102:948-950.
- (28).- Lenghaus, C., R.T. Badman and J.C Hillick, 1977: Johne's disease in goats, Aut. Vet. Jour., Vol. 53:460.
- (29).- Merkal, R.S., 1973: Laboratory diagnosis of bovine paratuberculosis, Jour. Am. Vet. Med. Ass., 9:963-969.
- (30).- Merkal, R.S., 1971: Diagnosis Methods for detection of Paratuberculosis (Johne's disease), in Proceeding 74th. Annual Meeting --- U.S. Anim. Health Assoc: 620-623.
- (31).- Merkal, R.S., K.E. Kopecky, A.B. Larsen and J.R. Thurston, 1964: Improvements in the techniques for primary cultivation of Mycobacterium paratuberculosis, Am. Jour. Vet. Res., 25.
- (32).- Merkal, R.S., A.B. Larsen, K.E. Kopecky, J.P. Kluge, W.S. Monlux, R.P. Lehmann and L.Y. Quinn, 1968: Experimental paratuberculosis in sheep after oral, intratracheal, or intravenous inoculation: - serologic and intradermal test; Am. Jour. Vet. Res., 5:963-969.
- (33).- Merkal, R.S., A.B. Larsen, K.E. Kopecky and R.D. Ness, 1968: Comparison of examination and test methods for early detection of paratuberculous cattle. Am. Jour. Vet. Res., 8:1533-1538.
- (34).- Merkal, R.S. and J.R. Thurston, 1968: Susceptibilities of Mycobacterium and nocardial species to benzalkonium chloride. Am. Jour. Vet. Res., 29:759.
- (35).- Morrow, S.A., 1980: Current therapy in theriogenology: diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in animals; -- W.B. Saunders Company, Philadelphia, p. 985.
- (36).- Nelson, D.R., 1980: Infections diseases of goats. International - goat and sheep Research 1(1) 11-17.
- (37).- Ramírez, P.C., E.T. Trigo, F.G. Suárez y R.S. Merkal, 1979: Aislamiento e identificación de Mycobacterium paratuberculosis en México, Téc. Pec. Méx, 36:74-75.
- (38).- Sherman, D.M., 1980: Johne's disease in dairy goat, Dairy Goat -- Jour. 4:14-17.
- (39).- Sherman, D.M. and H.M. Gezon, 1980: Comparison of agar gel immuno diffusion and fecal culture for identification of goats with paratuberculosis; Jour. Am. Vet. Med. Ass. 12:1208-1211.
- (40).- Trigo, F.J., 1979: Diagnóstico de la paratuberculosis (enfermedad de Johne), estudio recopilativo, Vet. Méx., 10:239-244.
- (41).- Unzueta, R.J., 1936: Contribución al estudio de la enteritis paratuberculosis bovina en México. Tesis de Licenciatura, Fac. de --- Med. Vet. y Zoot., Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.