

11664
1
204

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN



V N A M

ENSAYO DE LA INMUNIZACION SUBCUTANEA CON UNA BACTERINA OLEOSA DE Mycobacterium paratuberculosis EN UN REBAÑO OVINO INFECTADO NATURALMENTE

FALLA DE ORIGEN

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS
(Area: Producción Animal Ovinos y Caprinos)
P R E S E N T A
VIRGINIA CITLALI HERNANDEZ VALLE

Director: Dr. Roberto Cervantes Olivares

Asesor: Dr. Abel Ciprián Carrasco



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 está 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.

MIEMBROS DEL JURADO

Dr. Juan Antonio Montaraz Crespo

M.C. Jorge Tórtora Pérez

Dr. Javier Ocadiz García

Dr. Abel Ciprian Carrasco

Dr. Roberto Cervantes Olivares

Este trabajo fué realizado en: Laboratorios del Centro
Nacional de Referencia en Salud Animal en Santa Ana
Tecamac, Estado de México y la Facultad de
Estudios Superiores Cuautitlán - UNAM " Posgrado "

I N D I C E

RESUMEN.....	I
SUMMARY.....	III
I. INTRODUCCION.....	1
I.1 Generalidades.....	1
I.2 Antecedentes.....	7
I.3 Diagnostico.....	6
I.4 Control y Profilaxis.....	23
II. OBJETIVOS.....	34
II.1 Planteamiento del objetivo general.....	34
II.2 Objetivos particulares.....	34
III. MATERIAL Y METODOLOGIA.....	36
III.1 Diagnostico inicial de la enfermedad.....	36
III.2 Eficacia de la vacunaci3n subcut3nea.....	40
IV. RESULTADOS.....	44
V. DISCUSION.....	67
VI. CONCLUSIONES.....	77
VII. BIBLIOGRAFIA.....	80
VIII. ANEXOS	
VIII.I T3cnica de Contraimmunoelectroforesis (CIEF).....	93
VIII.II T3cnica de Dobleimmunodifusion en gel (DIDG).....	96
IX. INDICE DE FIGURAS	

IX.1	Figura 1: Técnica DIDG. Reacción positiva.....	46
IX.2	Figura 2: Técnica CIEF. Reacción positiva.....	47
IX.3	Figura 3: Grafica del resultado de ambas pruebas serológicas.....	48
IX.4	Figura 4: Cuadro clinico.....	49
IX.5	Figura 5: Cuadro clinico.....	50
IX.6	Figura 6 a: Cuadro clinico.....	51
IX.7	Figura 6 b: Cuadro clinico.....	52
IX.8	Figura 7: Lesiones macroscópicas.....	53
IX.9	Figura 8: Lesiones macroscópicas.....	54
IX.10	Figura 9: Lesiones macroscópicas.....	55
IX.11	Figura 10 a: Reacciones postvacunales.....	61
IX.12	Figura 10 b: Reacciones postvacunales.....	62
IX.13	Figura 11: Reacción postvacunal.....	63
IX.14	Figura 12: Reacción postvacunal.....	64
IX.15	Figura 13 a: Prueba de tuberculina.....	65
IX.16	Figura 13 b: Prueba de tuberculina.....	66
 X. INDICE DE CUADROS		
X.1	Cuadro 1: Pasos inmunológicos en la enfermedad de Johnes.....	6
X.2	Cuadro 2: Técnicas de diagnóstico de la enfermedad de Johnes.....	10
X.3	Cuadro 3: Resultados del muestreo serológico, técnica DIDG.....	59
X.4	Cuadro 4: Resultados de la prueba de tuberculina mamifera.....	60

El presente trabajo se refiere a la evaluación de la inmunización subcutánea con una bacterina oleosa de Mycobacterium paratuberculosis, en un rebaño ovino comercial.

Se realizaron análisis serológicos a 140 animales adultos del rebaño, mediante las pruebas de Contraimmunoelectroforesis (CIEF) y Dobleimmunodifusión en gel (DIDG).

De 140 sueros, 13 resultaron positivos a las pruebas de DIDG y CIEF y 3 de ellos correspondieron a hembras adultas que presentaron cuadro clínico sugerente de paratuberculosis, estas hembras fueron sacrificadas resultando positivas a la enfermedad.

A 20 corderas nacidas en la explotación entre uno y 30 días de edad, se les aplicó subcutáneamente la bacterina muerta por calor suspendida en aceite mineral conteniendo 50 mg. de materia seca de Mycobacterium paratuberculosis por ml., se formó un grupo de 20 corderas de la misma edad que se consideraron como grupo control, a cada grupo se le efectuó seguimiento serológico. A los 3 años postvacunales a 10 corderas de cada grupo se les aplicó la tuberculina mamífera y a una cordera de cada grupo que resulto positiva a dicha prueba, se le sacrificó para su estudio postmortem.

Siete corderas del grupo vacunado, presentaron reacciones positivas solo a la prueba de DIDG, 19 de las 20, presentaron lesiones granulomatosas de tamaño variable en el sitio de aplicación de la bacterina.

A la prueba de tuberculina, reaccionaron positivamente el 100% de las corderas del grupo vacunado y solo el 30% del grupo control.

En el presente trabajo no se pudo concluir sobre la adecuada ó inadecuada protección que brinda la bacterina utilizada, debido a que un animal del grupo vacunado y otro del grupo control enfermaron ante el desafío natural al que estuvieron expuestos.

This research work refers to the evaluation of subcutaneous immunization with an oil base bacterine of Mycobacterium paratuberculosis, in a ovine flock.

Two serological test, Counterimmunoelectrophoresis (CIE) and Double diffusion (D.D.) were performed on 140 sera taken from adult population of the flock, 13 of them were positives to both, three ewes with clinical symptoms of paratuberculosis were sacrificed and by means of histopathology stains a confirmation of Jhone's disease was made, no isolation of the agent was intended.

20 lambs borned in the exploitation, aged one and 30 days received a subcutaneous application of the bacterine and suspended in mineral oil which contained 50 mgc of dry Mycobacterium paratuberculosis for ml. A group of 20 lambs of the same age was formed and this was considered as a control group, to each group they were serologically follow up. After three years post-vaccination 10 lambs of each group received the mammalian tuberculine and one lamb of each group positive to such test, was sacrificed in order to perform the postmortem studio.

Seven lambs of the vaccinated group presented positive reactions only to the D.D. test; 19 of the 20 lambs presented granuloma harms of various sizes in the place where the bacterine was inoculated.

In the Tb. test 100% of the vaccination group were positive and only 30% of the control group were positive in the same test.

In this research it can not be conclude about the adequated or inadequated protection that the bacterine used can provide due got Jhone's disease, that one animal of the vaccinated group and one animal of the control group due the natural challenge to which they were exposed.

INTRODUCCION

I.1 GENERALIDADES

La paratuberculosis o enfermedad de Johne, es una enfermedad infectocontagiosa crónica ampliamente distribuida en todo el mundo (Trigo, 1979), es considerada hoy en día una de las enfermedades más serias que afectan la industria ganadera causando graves pérdidas económicas por la baja producción y la muerte de los animales que enferman (Merial, 1980 y 1984; Benedictus y col., 1987).

El agente etiológico es una bacteria ácido resistente (0.5 x 1.2 μ m), facultativa, intracelular, gram positiva, no esporula y se le denomina Mycobacterium paratuberculosis ó Mycobacterium johnei, la cual tiene la tendencia a formar equimulos compactos tanto en los tejidos como en las heces, lo que ayuda a su identificación, además su crecimiento es muy lento y es dependiente de micobactina (Rafiy y Entessar, 1971; Trigo, 1979; Morin, 1982).

Es susceptible a la desecación, aunque se ha encontrado que el bacilo resiste 17 meses a 38°C, también lo afecta la luz solar así como el pH elevado del suelo.

Tres cepas pueden producir la enfermedad, la primera es la clásica bovina que es poco patógena para los ovinos, la segunda y la tercera han sido aisladas de ovinos de las cuales una de ellas se caracteriza por producir un intenso pigmento color naranja en tejidos y cultivos (Truay y Roussel, 1987).

La enfermedad afecta a bovinos, ovinos, caprinos, camélidos y animales salvajes (búfalos, yak, llama) (Poddoubnsky, 1962; Williams y Spraker, 1979), es rara en equinos y cerdos, experimentalmente se puede producir la enfermedad en ratones, conejos y hamsters (Trigo, 1979). Los animales jóvenes son los más susceptibles, adquiriendo la infección en los primeros seis meses de vida (Julian, 1975; Thoen, 1979).

Se han encontrado en bovinos familias más susceptibles a la enfermedad (Hole y MacLay, 1959). En cabras y borregos se ha visto que a mayor edad se presenta una mejor resistencia, muchos autores han encontrado que la enfermedad clínicamente se presenta a los dos años de edad (Prudvi y col. 1984), lo que indica posible infección congénita, intrauterina o transmamaria (Rafyi y Entessar, 1961; Moser, 1982), ya que el microorganismo ha sido aislado de útero, feto, leche, glándula mamaria, semen y testículos (Thoen y Muscoplat, 1979; Trigo, 1979; Prudvi, 1984).

El período de incubación es muy variable, algunos autores lo consideran de alrededor de dos años, aunque también hay reportes de que éste puede ser de dos meses, sin embargo, muchos animales afectados nunca presentan cuadro clínico, en ratones inoculados por vía intravenosa presentaron un período de incubación de un año (Rafyi y Entessar, 1961; Sherman, 1980).

Información definitiva sobre la patogenia de la enfermedad no se tiene pero existe el conocimiento de que posterior

a la ingestión del microorganismo, éste tiene predilección por intestino (íleon, ciego, colon), donde aparentemente es el sitio de la lesión e infección primaria y el inicio de la multiplicación bacteriana. La enfermedad clínica se presenta después de que la lesión intestinal se desarrolla.

Grupos de microorganismos aparecen en la mucosa intestinal actuando como cuerpos extraños, produciendo inflamación, seguida de una infiltración masiva de células en la mucosa y submucosa, lo cual provoca aumento de la motilidad intestinal disminución del tiempo de tránsito del alimento, reducción de la absorción e incremento de la pérdida de nutrientes. La respuesta del hospedador será de acuerdo al estado inmunológico que presenta y al tipo de resistencia, por ello algunos animales presentan cuadro clínico, otros son portadores y diseminadores asintomáticos y otros son resistentes (Julian, 1975; Gilmour, 1976; Collins y col., 1984; Merkai y col., 1985; Larsen y col., 1988).

El microorganismo tiene predilección por tejido intestinal, a pesar de localizarse en otros órganos o tejidos, una posible explicación del tropismo que manifiesta el bacilo hacia este tejido podría ser por la estimulación de las enzimas oxidativas de los macrófagos intestinales liberados después de la infección; además de encontrar intermediarios metabólicos que estimulan su multiplicación.

El englobamiento de un gran número de bacterias por los macrófagos da como resultado la pérdida de la estructura var-

cuolar y de aquí que la actividad de los lisosomas sea eliminada. Los mecanismos inmunológicos por medio de los cuales se desencadena la diarrea y la respuesta febril son explicados debido a que hay una reacción antígeno-anticuerpo en el intestino afectado, ésta reacción de tipo hipersensibilidad inmediata podría dar como resultado la liberación de histamina con la consecuente presentación de diarrea; puede haber una reacción de tipo hipersensibilidad retardada, involucrando a los antígenos de Mycobacterium paratuberculosis y a los linfocitos sensibilizados.

En general de ésta reacción resulta la liberación de lipofocinas, en el caso particular de la enfermedad de Johne, se ha especulado que algunas de estas pueden mediar en otras características de la infección. Así, la citotoxina (que es una sustancia liberada por linfocitos sensibilizados y que manifiesta citotoxicidad inespecífica para varias células blanco en diferentes especies animales), es liberada y 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, provienen de animales infectados con bacilos de Johne, a los que se les administró una dosis de Johnina. En estos animales indujo la fiebre y diarrea, que pudo ser tratada

da posteriormente con drogas antihistamínicas (Cuadro 1), (Merkal y col. 1970; Braun, 1982).

El cuadro clínico típico incluye la progresiva emaciación, pérdida de peso, decremento en la producción láctea y cárnica (Julian, 1975; Moser, 1982; Merkal y col., 1985), edema submandibular el cual se presenta en algunos animales (Williams y Spraker, 1979), las constantes fisiológicas normales (Rafyi y Entessar, 1961; Williams y Spraker, 1979; East, 1983; Kumar y col., 1984; Merkal y col., 1985), el apetito es bueno y se observa en algunos animales desprendimiento de la lana, la diarrea se puede presentar intermitentemente, pero algunos animales no la presentan ó solo al final de la enfermedad.

Hay evidencias que los signos clínicos son el resultado de la acción de la histamina dando origen a una hipersensibilidad de tipo inmediata y es así que la diarrea cuando se presenta es el resultado de una reacción mediada por la histamina (Rafyi y Entessar, 1961; Braun, 1982; East, 1983; Van Amstel, 1984; Merkal y col., 1985). Los animales presentan un cuadro de anemia ya que hay una reducción de eritrocitos y hemoglobina, esto se puede deber a la no absorción de nutrientes para la hematopoyesis (Prudvi Reddy y col., 1982; East, 1983; Kumar y col., 1988).

En toda explotación afectada por Mycobacterium paratuberculosis, se pueden identificar cuatro categorías de animales:

1. Animales clínicamente enfermos. Eliminan bacilos en heces.
2. Animales infectados asintomáticos. Eliminan bacilos en las

heces en forma constante ó intermitente.

3. Animales infectados asintomáticos no excretores. No presentan cuadro clínico ni eliminan bacilos en las heces.
4. Animales no infectados. No presentan cuadro clínico, negativos al cultivo de heces y tejidos y eventualmente pueden reaccionar en forma positiva a pruebas intradérmicas ó serológicas, existiendo la posibilidad de que sean reactores recuperados de una leve infección. (Larsen, 1973; Brugère, 1987).

I.2 ANTECEDENTES:

No se tiene información confiable sobre las pérdidas económicas ocasionadas por la paratuberculosis en el País, a nivel mundial la enfermedad de Johne actualmente se describe como uno de los padecimientos más serios que afectan a la ganadería (Julian, 1975).

En Inglaterra representa un grave problema económico, y es la afección más importante en ciertas áreas de dicho País (Doyle, 1951 y 1956, citado por Ramirez y col., 1982).

También se ha descrito como un problema enzootico y económico en muchos países tales como: Bélgica, Francia, URSS (Julian, 1975; Merkal, 1984).

En México Unzueta en 1936, fué quien diagnosticó la enfermedad por primera vez en ganado bovino lechero mediante pruebas de tipo alergico como la Johnina y tuberculina aviar realizando la observación del bacilo en frotis de heces con

la tinción de Ziehl-Neelsen. Bustamante y Garibay en 1974, efectuaron las primeras pruebas diagnósticas en ovinos realizando la prueba de fijación de complemento y la doble comparativa intradérmica a la tuberculosis aviaria y mamífera.

Ramírez y col. en 1979, informan del primer aislamiento de Mycobacterium paratuberculosis en bovinos lecheros de muestras de nódulos mesentéricos e intestino delgado. Ramírez y col. en 1982, reportan el aislamiento de Mycobacterium paratuberculosis en bovinos lecheros de muestras de nódulos mesentéricos e intestino delgado. Ramírez y col. en 1982 reportan el aislamiento del Mycobacterium paratuberculosis en cabras de los estados de Querétaro y Guanajuato. Praxedis y col. en 1983 logran la identificación de la bacteria de heces de un ovino. De Lucas en 1984, informa de cuatro formas de diagnóstico de la paratuberculosis en cabras. Alemón en 1988, determina la prevalencia de la enfermedad en una explotación comercial mediante pruebas serológicas de contraínmunolectroforesis y la doble inmunodifusión en gel.

I.3 DIAGNOSTICO:

Es importante señalar que existen diversas técnicas ó métodos de diagnóstico para la paratuberculosis pero cada una de ellas tiene sus ventajas y desventajas ya que no siempre detectan a los animales infectados, o bien detectan animales expuestos que no están infectados y además en muchas ocasiones no diferencian entre infecciones por Mycobacterium para--

tuberculosis y otras micobacterias (Trigo, 1979; Brugère, 1987 Koh y col., 1988).

Dentro de los métodos de diagnóstico de la paratuberculosis se incluyen los métodos directos e indirectos (Brugère, 1987), los primeros incluyen a los siguientes:

III.1 Exámen clínico, III.2 Exámen bacteriológico al microscopio, III.3 Cultivo bacteriológico de heces ó tejidos y III.4 Biopsia de nódulos linfáticos mesentéricos.

Dentro de los métodos indirectos tenemos los que se basan en la inmunidad celular y los inmunológicos basados en la inmunidad humoral, los primeros incluyen a las siguientes pruebas: III.5 Prueba de la Johnina ó de la tuberculina, III.6 Prueba doble comparativa de tuberculina (bovina-aviaria), III.7 Inyección intravenosa de Johnina o de tuberculina, III.8 Inhibición de la migración de macrófagos y III.9 Transformación linfocitaria in vitro. Con respecto a las pruebas inmunológicas basadas en la respuesta humoral tenemos: III.10 Fijación de complemento, III.11 Hemoaglutinación, III.12 Inmunofluorescencia indirecta, III.13 Prueba inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), III.14 Floculación de bentonita, III.15 Precipitación en medio gelificado (Inmunodifusión en gel), III.16 Contraelectroforesis.

Además hay otros métodos como III.17 la necropsia que revela las lesiones macro y microscópicas, III.18 Exámenes hematológicos y Exámenes bioquímicos. (Cuadro 2) (Trigo, 1979; Brugère 1987).

CUADRO 2.

TECNICAS DE DIAGNOSTICO DE LA ENFERMEDAD DE JOHNE

A. METODOS DIRECTOS

1. Examen Clínico
2. Exámen Bacteriológico al microscopio
3. Cultivo Bacteriológico de heces y tejidos
4. Biopsia de nódulos linfáticos mesentéricos

B. METODOS INDIRECTOS

B.1 INMUNIDAD CELULAR

5. Prueba de la Johnina y de la tuberculina
6. Prueba doble comparativa de tuberculina
(aviar / mamífera)
7. Inyección intravenosa de johnina ó tuberculina
8. Inhibición de la migración de macrófagos
9. Transformación linfocitaria in vitro

B.2 INMUNIDAD HUMORAL

10. Fijación de Complemento
11. Hemoaglutinación
12. Inmunofluorescencia indirecta
13. Inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

14. Floculación de Bentonita
15. Precipitación en Gel
16. Contraimmunolectroforesis

C. OTROS METODOS

17. Necropsia
18. Exámenes hematológicos y bioquímicos

Cuadro Modificado de Trigo (1979).

III.1 EXAMEN CLINICO

Tiene valor limitado ya que los signos de la enfermedad son poco específicos y se confunden con otros procesos tales como: malnutrición, gastritis traumática, ataxia enzoótica, abscesos hepáticos, parasitismo grave, linfadenitis caseosa, marasmo enzootico entre otras. en los ovinos y caprinos, el principal signo es la pérdida de la condición acompañada de edema submandibular. La diarrea es menos frecuente y está presente únicamente en casos terminales (Larsen, 1973; Trigo, 1979; Van Amstel, 1984).

III.2 EXAMEN BACTERIOLOGICO AL MICROSCOPIO

El examen microscópico de organismos ácido resistentes en heces o mucosas intestinales provenientes de animales infectados, es uno de los métodos más rápidos y seguros (Julian 1975; Dent, 1985; Kumar, 1988). La desventaja es que sólo detecta aquellos animales que arrojan grandes cantidades de bacilos (animales altamente excretores), también en ocasiones se requiere examinar bastantes laminillas para identificar los microorganismos y por último se requiere de cierta experiencia para diferenciar M. paratuberculosis de M. phlei, siendo éste último un germen saprófito del intestino que por lo general es un poco más largo que M. paratuberculosis y se colorea menos intensamente; además tiene una menor tendencia a formar acúmulos de bacterias (Julian, 1975; Thoen y Mucoplat, 1979; Trigo, 1979; Brugère, 1987).

III.3 CULTIVO BACTERIOLOGICO A PARTIR DE MATERIA FECAL

El problema del aislamiento radica en el lento crecimiento de la mycobacteria, y del alto grado de contaminación de la materia fecal, aunado a la evidencia de que con esta técnica no se permite detectar al grupo de animales infectados asintomáticos no excretores ó a los excretores con eliminación intermitente de los bacilos, sólo detecta a los animales excretores con ó sin cuadro clínico que eliminen más de 100 bacilos por gramo de heces, además identifica animales vaginales que son excretores (Sherman, 1980; Merkal, 1984; Saxegaard, 1985).

Se requiere de tres meses de cultivo para la confirmación definitiva, además de utilizar medios de aislamiento especiales para mycobacterias y medios "descontaminantes" lo que hace que ésta técnica sea un método largo y costoso además de que cuando arroja un resultado negativo al cultivo no es de significancia diagnóstica ya que el microorganismo suele ser eliminado en forma intermitente (Hole y Maclay, 1959; Saxegaard, 1985; Brugère, 1987; Koh y col., 1988).

III.4 BIOPSIA DE NODULOS LINFATICOS MESENTERICOS

Este es un método de diagnóstico precoz, se logra prevenir las formas clínicas de la paratuberculosis, las desventajas de este método son la necesidad de efectuar una laparotomía y si el animal está muy gordo se dificulta su localización ya que dichos nódulos están incrustados en la grasa pu-

diendo darse debido a lo anterior animales falsos negativos (Pemberton, 1979; Benedictus y Bosna, 1985; Brugère, 1987).

III.5 PRUEBA DE LA JOHNINA O DE LA TUBERCULINA

La inyección intradérmica de johnina o de tuberculina permite una detección precoz de los animales infectados, pero se consideran poco confiables ya que pueden dar reactores falsos negativos por anergia ó falsos positivos debido a mycobacterias atípicas. Estas pruebas de hipersensibilidad cutánea son más eficaces durante la fase preclínica de la enfermedad. Pero una vez que los signos aparezcan su confiabilidad decrece. Se ha demostrado que la johnina es más sensible en el caso de los ovinos (Julian, 1975; Trigo, 1979; Brugère, 1987; Kumar y col., 1988; Cumphauser y col., 1988).

III.6 PRUEBA DOBLE COMPARATIVA DE TUBERCULINA BOVINA-AVIARIA

La tuberculina aviaria aplicada en forma intradérmica también a sido utilizada para el diagnóstico de la paratuberculosis, y cuando se utiliza junto con la tuberculina mamífera ofrece la posibilidad de un diagnóstico diferencial entre paratuberculosis y tuberculosis, dependiendo de cuál de ambas inoculaciones responda más energicamente. Estas pruebas una vez establecida la enfermedad son menos eficaces. Esto puede deberse a reacciones cruzadas con otras mycobacterias o bien en función del estado alérgico e inmune del animal (Hole y Ma clay, 1959).

III.7 INYECCION INTRAVENOSA DE JOHNINA O DE TUBERCULINA

Esta prueba se considera más específica que las pruebas intradérmicas, pero se pueden dar variaciones en la temperatura del animal por otros factores durante el día dándonos resultados falsos positivos. la inyección intravenosa de 2 a 4 ml. de Johnina inducen un aumento de temperatura en animales sensibilizados.

Un aumento de 1°C a las 5 u 8 hrs. después de la inyección se considera como positivo (Hole y Maclay, 1959; Thoral, 1980; Paliwal y col., 1984; Somanshi y col., 1986).

III.8 INHIBICION DE LA MIGRACION DE MACROFAGOS

Esta prueba es mas específica para la detección de animales infectados asintomáticos no excretores su gran desventaja es la de requerir de laboratorios especializados, lo que incrementa su costo, resultando cara y poco práctica además se ha reportado que da reactores falsos positivos (Brugère, 1987).

III.9 TRANSFORMACION LINFOCITARIA IN VITRO

Esta prueba consiste en la estimulación de linfocitos sensibilizados con antígenos específicos de mycobacterias, sin embargo, la tecnología y el equipo requerido para realizarla limitan su utilización como una prueba práctica (Bendixen, 1977; Williams y col., 1985).

III.10 FIJACION DE COMPLEMENTO

Esta prueba es una de las más utilizadas. Los anticuerpos fijadores de complemento se pueden desarrollar hasta que la infección está bien establecida (Larsen, 1973; Gilmour, 1976; Williams y col., 1985; Fedin y col., 1987). como desventajas se pueden mencionar las reacciones cruzadas que produce con otras mycobacterias (*M. bovis* y *M. avium*). también pueden presentarse reacciones falsos positivos ó falsos negativos en animales infectados asintomáticos (Gilmour, 1976; Goudswaard 1976; Koh y col., 1988).

III.11 HEMOAGLUTINACION

Esta prueba se basa en la absorción de un antígeno adecuado sobre eritrocitos, para buscar posteriormente su aglutinación por un suero inmune. presenta las mismas limitaciones que la prueba de Fijación de Complemento. es decir, reacciones cruzadas con otras mycobacterias. Se indica que esta prueba muestra una mayor sensibilidad que la antes mencionada para detectar animales en etapas iniciales de la infección (Larsen y col., citados por Trigo en 1979; Ajay Kumar, 1984).

III.12 INMUNOFLUORESCENCIA

Esta prueba tiene las mismas desventajas que la prueba de Fijación de Complemento. ha sido utilizada para detectar la infección en estado preclínico. siendo en este sentido más eficiente que la F. de C., Hemaglutinación e Inmunodifusión

(Gilmour y Gardiner, 1968; Gilmour, 1976; Paliwal y col., 1984).

Además esta prueba muestra estrecha correlación entre las lesiones macroscópicas y microscópicas (Paliwal y col., 1984).

III.13 PRUEBA DE INMUNOABSORBENTE LIGADO A ENZIMA (ELISA)

Esta prueba parece ser más sensible que la Fijación de Complemento, identifica animales con carga bacteriana baja para cultivo y puede ser utilizada para mandar sacrificar animales antes de que difundan la enfermedad en un rebaño (Yokomizo y col., 1983; Marhal, 1984; McKee, 1988).

Sin embargo se reporta como una limitante de esta prueba el dar reacciones falsos positivos y el de necesitar de laboratorios especializados (Yokomizo y col., 1983; McKee, 1988).

III.14 FLOCULACION DE BENTONITA

Wallace y col. en 1968 y en 1971 citados por Trigo en 1979, utilizaron como antígeno partículas de bentonita sensibilizadas con tuberculina de Koch. La dilución final del suero que aglutina a las partículas se tomó como título de anticuerpos. Se considera que esta prueba no diferencia a las infecciones de la tuberculosis.

III.15 PRECIPITACION

Esta prueba ha demostrado ser sensitiva y específica en ovinos y caprinos detectando a los animales más gravemente in-

fectados y afectados clínicamente, se ha reportado que refleja el progreso de la infección más exactamente que otras pruebas como la fijación de complemento y la hemoaglutinación (Merkal y col., 1968). de acuerdo con Merkal y col. en 1968 en ovinos infectados experimentalmente los anticuerpos precipitantes se desarrollan primero, seguidos de los hemaglutinantes y por último de los fijadores de complemento. Dichas precipitinas continúan aumentando con la infección y decrece conforme los animales se van recuperando. En estudios recientes se encontró que es de igual sensibilidad y especificidad que el cultivo bacteriológico en infecciones clínicas y subclínicas, además ofrece grandes ventajas prácticas ya que es rápida y de bajo costo y las reacciones cruzadas son mínimas (Merkal, 1970; Goudswaard y col., 1976; Ramirez y col., 1979; Sherman y Gezon, 1980; Ramirez y col., 1982; Praxedis y col., 1983; Merkal, 1984; De Lucas, 1984; Alemón, 1985).

III.16 CONTRAINMUNOELECTROFORESIS

Esta prueba consiste en hacer coincidir los anticuerpos específicos de los animales sospechosos con antígeno protoplásmico de M. paratuberculosis, para ello, basándose en la diferencia de cargas entre el anticuerpo y el antígeno en una cámara de electroforesis, se desplazan acarreados por corrientes en un medio gelificado. En esta técnica se utiliza una placa de acrílico para electroforesis la cual contiene ocho portaobjetos de 5 cm x 10 cm cubiertos con agar al 1% en es--

tos se elaboran pozos de 3 mm de diámetro distribuidos en tres series de cuatro pares cada una, en cada pozo de la serie de la izquierda se deposita el antígeno y en los de la derecha los sueros problema incluyendo un control positivo y un control negativo, se coloca la placa de acrílico dentro de la cámara de electroforesis la cual contiene buffer a pH 8.6 y se le pasa corriente de 200 volts durante 45 minutos al cabo de los cuales se efectúa la lectura tomándose como positivos aquellos que presentan una o más líneas de precipitación (Muhammed y col., 1978; Alemón, 1983). Esta prueba ha sido utilizada para detectar antígenos de hepatitis en suero, también para detectar antígenos virales en la gastroenteritis así como antígenos bacterianos y de hongos (Muhammed y col., 1978).

Purand Chand y col. en 1985, también emplearon esta técnica para un rápido diagnóstico de virus pox en borregos.

Esta prueba ha reportado ser más sensible que la inmunodifusión, además de tener la ventaja de ser más rápida (Muhammed y col., 1978; Muhammed y Eliasson, 1979; Collins y col., 1984).

III.17 DIAGNOSTICO POSTMORTEM (NECROPSIA)

17.1 Lesiones macroscópicas: la exploración postmortem es muy importante para auxiliar el diagnóstico de la enfermedad de John, aunque algunas investigaciones indican que los cambios macroscópicos en intestino o nódulos mesentéricos son de valor limitado e inespecífico o no son detectados, lo cual

puede corresponder a las fases tempranas de la enfermedad (Fodstad y Gunnarsson, 1979), por lo que son consideradas útiles en las fases tardías (Kumar y col., 1983).

Las lesiones se localizan por lo general en la parte posterior del aparato digestivo y nódulos linfáticos adyacentes del intestino, la porción del yeyuno, ileon, válvula ileocecal, ciego y primera parte del colon suelen estar afectadas, aunque en casos avanzados las lesiones se pueden presentar en duodeno y recto (Rayja y Singh, 1961; Nakamatsu y col., 1968; Momotami y Yoshino, 1985). Se ha observado en los animales en etapas terminales caquexia, edema submandibular, atrofia gelatinosa de la grasa, fluido seroso en cavidades (Prudvi Reddy y col., 1968). La mucosa intestinal muestra engrosamiento difuso, congestión y moco viscoso, la corrugación de la mucosa intestinal semejando un lavadero es poco común en ovinos. En la válvula ileocecal se observan lesiones que van desde hiperemia hasta edema y engrosamiento. Los nódulos linfáticos se encuentran edematosos, agrandados, con procesos de caseificación y/o calcificados y congestionados (Morin, 1982; Williams y col., 1983; Prudvi Reddy y col., 1984; Kumar y col., 1988).

17.2 Lesiones microscópicas: Las lesiones histológicas de la paratuberculosis son aquellas de una inflamación granulomatosa. El engrosamiento de la mucosa se debe en parte a la infiltración de las vellosidades con macrófagos y células gigantes, formando granulomas que en su interior contienen numerosos bacilos ácido-resistentes. También entremezclados con

la reacción granulomatosa se distinguen algunos linfocitos, células plasmáticas y eosinófilos; aunque es pertinente señalar que algunos de éstos son parte de la población normal celular de la mucosa (Rajya y Singh, 1961; Nakatsuu y col., 1968; Fedstad y Gunnarsson, 1979; Williams y col., 1983; Prudvi Reddy y col., 1984; Pent, 1985; Momotami y Yoshino, 1985; Kumar y col., 1988).

En casos severos de paratuberculosis, la reacción inflamatoria granulomatosa se puede extender a lo largo de los vasos linfáticos hacia la submucosa, capa muscular, serosa y mesenterio adyacente. Los vasos linfáticos se pueden encontrar ocluidos con macrófagos y células gigantes, desarrollándose incluso reacciones granulomatosas en la corteza de los nodulos linfáticos mesentéricos (Trigo, 1979).

No se ha informado de las lesiones macro o microscópicas en otros tejidos; aunque el bacilo ha sido aislado de numerosos tejidos como nodulos linfáticos, bazo, pulmón, riñón, aparato reproductor, glándula mamaria, placenta y fetos (Taylor, 1981; Braun, 1982).

III.18 EXAMEN HEMATOLOGICO Y BIOQUIMICO

Existe poca información sobre los cambios hematológicos y bioquímicos que se presentan en animales con paratuberculosis. Prudvi Reddy y col. en 1982, reportan que se presenta una significativa reducción de los valores normales, estos cambios se pueden explicar a los trastornos de absorción que

se presentan en los animales enfermos (Allen y Patterson, 1974 Prudvi Reddy y col., 1982; Ajay Kumar, 1984).

Brugère en 1987 indica que éstos métodos de diagnóstico son no específicos y que deben ser utilizados junto con otros métodos directos ó indirectos más específicos.

De todos los métodos de diagnóstico presentados con anterioridad, es fácilmente deducible que no existe uno ideal, por lo cuál deben de complementarse para realizar un diagnóstico más eficiente. La combinación de pruebas de inmunidad celular retardada con pruebas de inmunidad humoral, amplía el espectro diagnóstico, ya que se piensa que un animal afectado con paratuberculosis pasa primero por una fase de hipersensibilidad retardada, detectada con johnina ó tuberculina y que podría corresponder a la fase preclínica. Por otro lado, la fase clínica corresponde a la respuesta humoral. Estas dos fases pueden entremezclarse en algunos animales, siendo factible la demostración de ambas pruebas de inmunidad durante todo el curso de la infección (Trigo, 1979; Brugère, 1987).

Finalmente, el diagnóstico de la paratuberculosis mediante la utilización de pruebas inmunológicas debería de implementarse en los diferentes laboratorios que realizan funciones de diagnóstico; ya que en la actualidad la enfermedad se detecta únicamente en aquellos animales que presentan cuadro clínico sugerente mediante la observación microscópica de los bacilos ó bien al examen postmortem e histológico (Trigo, 1979).

I.4 CONTROL Y PROFILAXIS:

Un aspecto de gran importancia además de lograr un diagnóstico eficiente de la paratuberculosis, es el de implementar una serie de medidas de control y profilaxis que nos permitan disminuir el problema y eventualmente erradicarlo de las diferentes explotaciones donde este presente, para ello cuando en un rebaño se ha llegado al diagnóstico definitivo de la enfermedad, se recomienda desarrollar un programa de manejo integral y de vacunación que consiste en lo siguiente:

1. MANEJO

- a. Monitorear periodicamente el rebaño (cada seis meses), tomando muestras de heces con la finalidad de lograr el aislamiento del M. paratuberculosis, los animales detectados de esta manera deberán de ser aislados y retirados de la explotación, desinfectando el equipo y los corrales (Thoen y Braun, 1988).
- b. Al comprar animales de otras explotaciones hacerlo de rebaños libres de la enfermedad, determinando esto por medio de tres cultivos bacteriológicos de los animales adultos a intervalos de 6 a 12 meses ó bien mediante la prueba de ELISA (Merkal, 1984).
- c. En un rebaño positivo separar animales adultos de los jóvenes y a las crías nuevas alimentarlas con calostro pasteurizado ó calostro de hembras negativas y posteriormente efectuar la crianza artificial con leche comercial pasteurizada (Merkal y col.1970; Merkal, 1984; Thoen y Braun, 1988).

- d. Animales jóvenes de un rebaño infectado, no considerarlos libres, aún cuando sus padres hayan sido vacunados y sean negativos a pruebas serológicas ó bacteriológicas. Todo animal expuesto vacunado ó no, es un diseminador potencial de la enfermedad (Merkal,1984).
- e. Mantener limpia la explotación y desinfectarla periódicamente con la finalidad de evitar la contaminación del agua y el alimento que los animales consumen (Merkal y col.,1970 Braun,1982; Merkal,1984; True y Roussel,1987; Thoen y Baun 1988).
- f. Si el rebaño es positivo y el sistema de explotación es en base a pastoreo, es necesario pastorear a los animales jóvenes en otras áreas no contaminadas con anterioridad por los animales enfermos (Braun, 1982; True y Roussel,1987).
- g. Animales con cuadro clínico que permitan sospechar de paratuberculosis deberán de ser separados mientras se efectúa el diagnostico diferencial con otros padecimientos que en un momento dado presenten el mismo cuadro clínico (True y Roussel, 1987; Thoen y Baun, 1988).
- h. Evitar en lo posible tensión y factores predisponentes de la enfermedad, además de proveer de una buena alimentación a todo el rebaño (Merkal y col.,1970; Braun,1982; Merkal, 1984; True y Roussel,1987; Thoen y Baun,1988).
- i. Los animales pueden ser vacunados en los rebaños en los cuales la paratuberculosis ha sido diagnosticada mediante el aislamiento de heces ó tejidos. Pero únicamente animales

entre uno a 35 días de edad recibirán la vacuna muerta por calor en aplicación subcutánea (Thoen y Saun, 1988).

2. VACUNACION

2.1 Historia: Vallie y Rinyad en 1926 fueron los primeros en elaborar en Francia una vacuna con microorganismos vivos de Mycobacterium paratuberculosis, en vehículo de aceite de olivo y líquido de parafina. Boyle en 1945 fué el primero en usar la vacuna francesa en la Gran Bretaña, la cual fué aplicada antes del mes de vida para evitar vacunar a los animales ya infectados. En diferentes países la vacunación ha sido aplicada demostrando un alto grado de protección en ovinos y bovinos, sin embargo la vacunación dejó de aplicarse al dar inicio a las campañas de erradicación de tuberculosis, ya que animales vacunados contra paratuberculosis reaccionan positivamente a la prueba de la tuberculina (Rafyi y Entessar, 1961; Huitema, 1968; Larsen 1973).

2.2 Tipos de vacuna: La primera vacuna elaborada por Vallie y Rinyad en 1926, fue a partir de células vivas no atenuadas (Rafyi y Entessar, 1961), después de ésta se han probado otras vacunas con células muertas por calor a 70°C ó 100°C por una hora, utilizando diferentes adyuvantes (Rafyi y Entessar, 1961 Palsson, 1962; Markal y col., 1970). Actualmente se ha desarrollado mediante fraccionador de células de prensa hidráulica la fracción protoplasmática

del Mycobacterium paratuberculosis, para dar origen a la vacuna protoplasmática liofilizada ó bien en adyuvante de Freund's, ésta vacuna no causa a diferencia de las otras, reacción palpable en el sitio de inoculación, aunque a la necropsia se han detectado pequeños granulomas que miden de 2 a 3 mm de diámetro.

Además se indica que ésta vacuna causa poca ó ninguna hipersensibilidad a la prueba de tuberculina y de la Johnina (Gilmour y Brotherston, 1966; Larsen, 1973).

2.3 Tipos de adyuvantes: Uno de los primeros adyuvantes utilizados en las vacunas de M. paratuberculosis, fué el aceite de olivo y la parafina líquida (Rafyi y Entessar, 1961; Larsen 1973), después de ello se han utilizado diferentes adyuvantes como el aceite mineral y fenol al 0.3%, hidróxido de potasio, metanol y el adyuvante incompleto de Freund's, todos ellos al ser aplicados en el animal junto con las células o la fracción citoplasmática del M. paratuberculosis, dan origen a granulomas de diferentes tamaños (Rafyi y Entessar, 1961; Gilmour y Brotherston, 1966; Merkál y col., 1970; Larsen, 1973).

2.4 Vías de aplicación y dosis utilizadas: La principal vía de aplicación es la subcutánea efectuándose ésta en diferentes sitios como lo es el pecho del animal, la papada, el cuello, el esternón y la región axilar (Allson, 1960; Rafyi y Entessar, 1961; Larsen y col., 1964; Trigo, 1979; Thoen y Baun, 1988). Gilmour y Angus en 1974 efectúan un

ensayo aplicando la vacuna por vía oral.

En cuanto a las dosis, la de 5 mg ha sido la más utilizada (Allison, 1960; Rafyi y Entessar, 1961; Falsson, 1962; Larsen y col., 1964; Larsen, 1973; Crowther y col., 1976).

Larsen, en 1973 reporta una dosis de 8 mg de pared y la fracción protoplasmática de las células del bacilo en 0.5 ml de adyuvante.

2.5 Duración de la inmunidad: La inmunidad adquirida por la vacunación se caracteriza por desarrollar un incremento en la capacidad de los macrófagos para inhibir la multiplicación de la mycobacteria, éste efecto inhibitorio es el resultado de la respuesta inmune del hospedador (Larsen, 1973).

Rafyi y Entessar, en 1961, indican que la duración de la inmunidad no es bien conocida, pero es la suficiente para proteger por el tiempo en que son más susceptibles los animales, las vacunas que contienen células muertas por calor causan un alto grado de inmunidad y de hipersensibilidad a la tuberculina y a la johnina (Gilmour y Brotherston, 1966).

En el caso de la vacuna protoplasmática desarrolla poca o nula hipersensibilidad a la tuberculina y la johnina pero la inmunidad que desarrolla el individuo es pobre en comparación con las vacunas de células del bacilo muertas por calor en adyuvante oleoso (Gilmour y Brotherston, 1966). Larsen en 1973 informa que la vacuna ante un gran desafío

provocó que un 28% de animales vacunados, 46% de animales revacunados y un 60% de los controles enfermaran, la explicación que dió el autor a estos resultados es en el sentido de que el desafío por vía oral resulta ser mucho mayor al desafío en condiciones naturales que se da en rebaños donde la enfermedad esta presente.

En cuanto a la respuesta inmunológica de la vacuna proteoplasmática liofilizada de la mycobacteria aplicada por vía oral, concluyen que la vacuna falló en proteger a los ovinos desafiados en forma experimental con una cepa de campo encontrándose en los animales vacunados lesiones de mediana importancia a la necropsia, no lográndose aislar el agente etiológico de tejidos tres meses después de la vacunación y de haber efectuado el desafío, en este mismo experimento se sometió a todos los animales a la prueba de la tuberculina resultando lo siguiente:

Doce de los 10 animales vacunados que no fueron desafiados reaccionaron positivamente a la tuberculina y 9 de 10 animales no vacunados resultaron positivos a la tuberculina.

2.6 Edad en que se aplica la vacuna a los animales: La primera regla en este aspecto, es no aplicar la vacuna cuando no se tiene el conocimiento del estado inmunológico de un rebaño, es decir, si en cierta zona ó rebaño está presente la tuberculosis, no se aplica la vacuna, ya que la interpretación de la tuberculina se dificulta, ya que la vacuna de tuberculosis presenta o desarrolla una alta respuesta a

la tuberculina y a la Johnine (Larsen, 1973). si la vacuna se aplica en la etapa preclínica de la enfermedad la reacción local reportada por varios autores al utilizar la vacuna muerta por calor del bacilo, no se desarrolla y esto es un indicio de que el animal está infectado (Rafiy y Entezzar, 1961). Larsen y col., en 1964, informan que la vacunación entre dos y seis semanas de edad resultó ser mejor que a los seis meses. los autores explican lo anterior indicando que las posibilidades de contagio son o pueden darse a muy temprana edad por la vía oral ya sea por la leche de la madre, en el agua ó alimento ingerido por el cordero con heces contaminadas.

Estos mismos autores mencionan que si el animal está infectado al aplicar la vacuna ésta no protege. Thoen y Baun, en 1988 recomiendan que la vacuna deberá de aplicarse entre los primeros 35 días de edad.

2.7 Efecto de la revacunación: Las experiencias en este aspecto concuerdan en que no se justifica la revacunación mientras la reacción local en el sitio de inoculación este presente y además estos granulomas en animales revacunados son más grandes sin presentarse un incremento en la inmunidad.

2.6 Ventajas y desventajas de las vacunas: Markal y col., en 1970 informan que al utilizar la vacuna tradicional muerta por calor en adyuvante oleoso la infección en los animales persiste y sólo permite que el número de animales

con cuadro clínico sea menor, así como el número de bacilos excretados en heces, esto aunado a una serie de medidas de manejo dentro de las explotaciones positivas a la paratuberculosis permiten ir disminuyendo paulatinamente el número de animales que enferman en la explotación. Paisson en 1962, indica que animales vacunados y que luego fueron necropsiados pueden presentar lesiones que sugieren paratuberculosis.

Otra desventaja de la vacunación con el bacilo muerto por calor en adyuvante oleoso es que en el sitio de inoculación se presenta una reacción granulomatosa de tamaño variable que va de unos 2 cm a 8 cm de diámetro de consistencia firme, que perdura por 6 meses a dos años y en ocasiones debrida eliminándose un exudado caseoso de color blanco del cual se ha logrado recuperar después de varios meses el bacilo del Mycobacterium paratuberculosis (Rafy y Entessar, 1961; Larsen y col., 1964; Merkai y col., 1970; Larsen, 1973).

Se reporta también que la utilización de la vacuna oleosa da origen a reactores positivos a la tuberculina y a la IgG y a la IgM, pudiendo estar presente esta sensibilidad hasta por tres años (Gilmour, 1976). Lo anterior es una gran limitante en zonas donde está presente la tuberculosis y sobre todo si están desarrollando control y campañas de erradicación contra esta enfermedad ya que la interpretación de la tuberculina se dificultará bajo estas condiciones dando un

gran número de animales falsos positivos (Gilmour y Brotherston, 1966; Huitema, 1968; Gilmour, 1976).

Merkal y col. en 1970 recomiendan que una vez que los animales han sido vacunados, no efectuar diagnóstico mediante pruebas alérgicas o serológicas para monitorear el nivel de infección del rebaño, ya que estos no darían una información real ya que los resultados obtenidos se pueden deber a la respuesta a la vacunación. Con respecto a las desventajas o ventajas de la vacunación de la fracción protoplasmática del bacilo de Mycobacterium Paratuberculosis se informa que al ser utilizada con el adyuvante incompleto de Freund's no se desarrolla en el sitio de inoculación una reacción palpable, siendo esto una ventaja cuando se trata de animales de exposición (Gilmour y Brotherston, 1966).

Con respecto a la utilización de la vacuna con la fracción protoplasmática del bacilo liofilizada muerta por calor utilizada por vía oral, se reporta como ventaja que no se desarrolla el granuloma como en las vacunas subcutáneas, sin embargo falló al desarrollar inmunidad en los animales en los cuales se aplicó (Gilmour y Angus, 1974).

3. TRATAMIENTO

Muchos compuestos químicos han sido utilizados para el tratamiento de la enfermedad con pobres resultados, los signos clínicos han sido temporalmente disminuidos, pero al sus-

penderse el tratamiento estos se presentan de nuevo. En años recientes, los antibióticos usados para el tratamiento de la tuberculosis también han sido utilizados en la Enfermedad de Johne, y así tenemos que la hidracida del ácido isonicotínico en asociación con la estreptomina es uno de los más comunes (Rafyi y Entessar, 1961).

Anger en 1956 citado por East, en 1983 aplicó el medicamento anterior logrando un 50% de éxito.

En otros experimentos se aplicó una combinación de estreptomina, isoniacida y rifampin, estas drogas han sido utilizadas en humanos en infecciones por mycobacterias, no dan buenos resultados en el tratamiento de la paratuberculosis (Slocombe, 1982).

Gilmour en 1966 al utilizar Rimofenacina, encontró que es muy activa in vitro sobre 18 cepas de Mycobacterium paratuberculosis, y también inhibió el establecimiento experimental del desafío oral del bacilo en ratones y además redujo la infección intestinal en ovinos en los estados preclínicos de la enfermedad.

El sulfato de amikacin, reduce el número de microorganismos eliminados en heces, pero es una droga muy cara, la clofazimina elimina animales diseminadores, dicha droga está en estudio y aún no se ha probado para su uso en los Estados Unidos (Merkal, 1984).

Actualmente se sabe que los signos clínicos son el resultado de la respuesta histaminica, dando origen a una hipersen

sibilidad de tipo inmediata, por lo tanto si se aplican anti-histaminicos podemos disminuir los signos clinicos sin curar la enfermedad (Braun, 1982).

En conclusión a la fecha no se cuenta con un medicamento especifico para el tratamiento de la paratuberculosis ovina (Julian, 1975).

II. OBJETIVOS

Considerando que la paratuberculosis ó Enfermedad de Johne forma parte de las enfermedades "problema" dentro de las explotaciones ovinas, debido principalmente a que no existe un tratamiento eficaz, y la muerte de los animales que desarrollan el cuadro clínico de la enfermedad no puede ser evitada, provocando con ello pérdidas económicas importantes al productor, se propone con el presente trabajo contribuir en la comprensión de algunos aspectos de la enfermedad que ayuden al conocimiento de la misma en condiciones naturales y así poder disminuir su incidencia en los rebaños afectados.

Planteamiento de los Objetivos:

II.1 General:

Ampliar el conocimiento de la enfermedad en condiciones de una infección natural, en un rebaño ovino comercial.

II.2 Particulares:

- Determinar la utilidad de utilizar métodos de diagnóstico como la Doble inmunodifusión en gel (DIDG) y la Contraelectroforesis (CIEF) para confirmar la presencia de la enfermedad en un rebaño.
- Confirmar las lesiones postmortem de la Enfermedad de Johne que han sido reportadas en la bibliografía, y determinar la factibilidad de realizar el diagnóstico confirmativo de la enfermedad en base a dichas lesiones.

- Determinar la eficacia de una bacterina subcutánea oleosa de Mycobacterium paratuberculosis, en el rebaño naturalmente infectado.
- Comportamiento de la prueba de la tuberculina en los animales vacunados y los no vacunados.

III. MATERIAL Y METODOLOGIA

III.1 ETAPA 1. Diagnóstico inicial de la enfermedad en la explotación.

1.1. MATERIAL:

1.1.a. Localización y clima de la explotación:

El presente estudio se realizó en una explotación ovina comercial "Rancho La Palma", ubicado en el perímetro urbano del poblado de Visitación, Municipio de Melchor Ocampo, en el Estado de México (19° 44' de latitud norte y 99° 10' de longitud oeste en el meridiano de Greenwich); zona de clima templado seco, con lluvias en Verano-Otoño y con una precipitación pluvial de 700 mm. correspondientes al "Cw" de la clasificación de Köpen.

1.1.b. Características del rebaño:

La explotación contaba con 250 ovinos, de raza indefinida, con diferentes grados de encaste con las razas Suffolk, Corriedale y Rambouillet, siendo la estratificación por edades la siguiente:

- 136 hembras adultas, entre uno y seis años de edad.
- 110 corderos machos para abasto y corderas de reemplazo.
- 4 sementales: 2 de la raza Rambouillet, 1 Suffolk y 1 corriedale.

1.1.c. Manejo general de la explotación:

El rebaño se alimentaba principalmente de pastoreo en re-
pelo de alfalfa, durante 4 horas por día y en ocasiones se su-
plementaba a corral con rastrojo de maíz, paja de avena ó en-
silado de maíz, suministrando sales minerales y agua limpia
a libre acceso.

En cuanto al aspecto reproductivo el sistema que se im-
plementó era de empadre continuo, de tal manera que los machos
están en contacto permanente con las hembras a lo largo
de todo el año. En el aspecto sanitario, se realizaron mues-
treos mensuales de heces para su análisis coproparasitológico
y en base a los resultados se establecía el tratamiento y
control de las parasitosis internas.

No se efectuó ningún tipo de vacunación en el rebaño y
en general las condiciones higiénicas son deficientes.

1.1.d. Biológicos:

Antígeno protoplasmático de Mycobacterium paratubercu-
losis. (Proporcionado por el Dr. Richard S. Merkal,
del National Animal Disease Center, Ames Iowa, U.S.A.)

1.2 METODOLOGIA

En la explotación, desde hacía dos años se venían presentando casos clínicos sospechosos de Paratuberculosis ó Enfermedad de John. además las condiciones higiénicas deficientes (alimento y agua contaminados con heces) y la presencia de una serie de factores predisponentes (periodos de penuria alimenticia, partos, lactancia e instalaciones deficientes) permitirían sospechar de que se podría tratar de la Enf. de John.

Con la finalidad de comprobar lo anterior y como primera etapa de este estudio, se procedió al diagnóstico de la enfermedad mediante las siguientes pruebas:

- 1.2.a. Pruebas serológicas.
- 1.2.b. Necropsia para el estudio de las lesiones macro y microscópicas.
- 1.2.c. Improntas de la mucosa intestinal para la identificación del microorganismo.

1.2.a. Pruebas serológicas:

A la totalidad de hembras adultas y sementales del rebaño (140), se obtuvieron por medio de punción yugular aproximadamente 7 ml. de sangre en tubos vacuotainer, éstos eran centrifugados a 1500 rpm. durante 5 minutos para la obtención de suero, el cual fué congelado a -10°C para llevar a cabo posteriormente las pruebas serológicas de Contraelectroforesis (CIEF) y Doble inmunodifusión en gel (DIDG), de acuerdo al método propuesto

por Cervantes 1983 (Anexo 1).

1.2.b. Necropsia:

Los animales que presentaron cuadro clínico de paratuberculosis en el rebaño y serología positiva a CIEF Y DIDG se sacrificaban con el fin de realizar el estudio macro y microscópico a nivel de aparato digestivo (intestinos) y nódulos linfáticos mesentéricos. Para el estudio histológico, las muestras fueron cortadas y teñidas mediante la técnica de Hematoxilina-Eosina, con objeto de observar las lesiones.

1.2.c. Identificación del agente:

De los animales sacrificados para su estudio macro y microscópico, se realizaron improntas de mucosa intestinal las cuales fueron teñidas con la técnica de Ziehl-Neelsen para tratar de identificar al agente etiológico de la enfermedad.

ETAPA II. Determinar la eficacia de la vacunación subcutánea en la explotación.

II.1 Material:

1.a. Animales:

De las corderas nacidas en la explotación en los meses de octubre a diciembre de 1985 y de enero a junio de 1986, se seleccionaron 40 en buen estado de salud, a las cuales se les identificó por medio de a) placa metálica grabada con un número al cuello, b) tatuaje en la oreja, c) arete de plástico en la oreja contraria al tatuaje. La edad de las corderas osciló entre uno y treinta días.

1.b. Biológicos:

- Antígeno protoplasmático de Mycobacterium paratuberculosis.
- Bacterina para aplicación subcutánea, muerta por calor suspendida en aceite mineral como adyuvante, conteniendo 50 mg de materia seca del Mycobacterium paratuberculosis por ml.
- Tuberculina mamífera.

II. 2. Metodología:

II.2.a. Diseño experimental:

De las 40 corderas seleccionadas, se formaron al azar dos grupos experimentales, de 20 animales cada uno.

El primer grupo representó los animales control, los cuáles no fueron vacunados.

El segundo grupo de corderas fué vacunado por vía subcutánea en la región axilar con 1 ml. de bacterina muerta por calor, suspendida en aceite mineral como vehículo y adyuvante, conteniendo 50 mg. de materia seca de Mycobacterium paratuberculosis.

Nota: No se pudo apoyar con análisis estadístico, por el bajo número de observaciones.

II.2.b. Seguimiento serológico:

Con la finalidad de establecer el estado inmunológico de las 40 corderas de ambos grupos, previo al inicio de la vacunación, se realizó la toma de muestra sanguínea por medio de punción yugular, para la obtención de suero, utilizando éstos posteriormente para realizar las pruebas serológicas de ID₆ y CIEF, de acuerdo al método propuesto por Cervantes, R. A. (1983) (Anexo I).

Posterior a éste primer muestreo, se aplicó la bacterina, al segundo grupo de corderas (n=20) y se procedió a continuar los muestreos serológicos en ambos grupos experimentales

a los 30, 90, 120, 180 y 360 días, para realizar las pruebas antes mencionadas a todos los sueros de todos los diferentes muestreos.

II.2.c. Seguimiento Clínico:

Las corderas de cada grupo (vacunadas y controles), fueron vigiladas clínicamente cada ocho días hasta los dos años postvacunales, para determinar si alguna de ellas desarrollaba el cuadro clínico sugerente de la Enfermedad de Johne, ante el desafío natural que representó el convivir con todo el rebaño bajo las mismas condiciones de manejo.

II.2.d. Prueba de la Tuberculina Mamífera:

A 10 corderas del grupo control (no vacunadas) y a 10 del grupo experimental (vacunadas), a los tres años de edad, se les efectuó la prueba de la tuberculina mamífera, para ello se aplicó 0.1 ml. de la tuberculina por vía intradérmica en el pliegue anal izquierdo, previa lectura del grosor de la piel del pliegue anal derecho el cuál fué tomado como control negativo. A las 72 hrs. después de la aplicación de la tuberculina, se efectuó la lectura dando como positivo aquella reacción que tuviera el doble de tamaño con respecto a su control negativo.

II.2.e. Estudio a la Necropsia:

A una borrega de cada grupo experimental, que resultó positiva a la prueba de la tuberculina, se le realizó la necrop

sia, con la finalidad de determinar si existían lesiones características de la Enfermedad de Johne, a nivel macro y microscópico.

Dentro del estudio microscópico, se efectuaron cortes de intestino grueso y se tiñeron con Hematoxilina-Eosina y con Ziehl-Neelsen para determinar la presencia del bacilo de la paratuberculosis.

II.2.f. Cultivos Bacteriológicos:

Con la finalidad de establecer el diagnóstico diferencial con otras enfermedades, se intentó el aislamiento de bacterias del género Corynebacterium de muestras de tejidos como riñón, intestino, nódulos linfáticos así como del exudado procedente de la lesión granulomatosa de la hembra vacunada, dichas muestras procedieron de las borregas que se sacrificaron para el estudio a la necropsia.

IV. RESULTADOS

ETAPA I. Diagnóstico inicial de la enfermedad en la explotación.

I.2.a. Pruebas serológicas al rebaño:

De los 140 sueros que fueron evaluados del total de las hembras adultas y sementales del rebaño, 13 de ellos, el 9.28% resultaron positivos a las pruebas serológicas de Doble inmunodifusión en gel (DIDG) y Contraelectroforesis (CIEF). (figuras 1 y 2).

Las pruebas serológicas fueron realizadas en tres ocasiones presentando los mismos resultados para todos los sueros. (figura 3).

Dentro de los 13 sueros que resultaron positivos de los animales adultos, solo tres de ellos pertenecieron a ovejas que presentaban cuadro clínico característico de paratuberculosis en el momento de efectuar el muestreo serológico en la explotación, estos animales fueron sacrificados para su estudio postmortem.

I.2.b. Necropsia:

Tres ovejas adultas de los 13 animales que resultaron positivas serológicamente a DIDG y CIEF, mostraron un cuadro clínico de debilidad marcada, pérdida de peso progresiva, constantes fisiológicas inalteradas, desprendimiento de lana

con facilidad, diarrea, una de ellas presentó edema submandibular, caquexia y apetito inalterado. (Figuras 4, 5, 6a y 6b).

Estos animales fueron sacrificados en el laboratorio del Centro Nacional de Referencia en Salud Animal, en Santa Ana "Tecamac", Edo. de México, donde se realizó el estudio macro y microscópico donde se incluyeron improntas de la mucosa intestinal, siendo los resultados los siguientes:

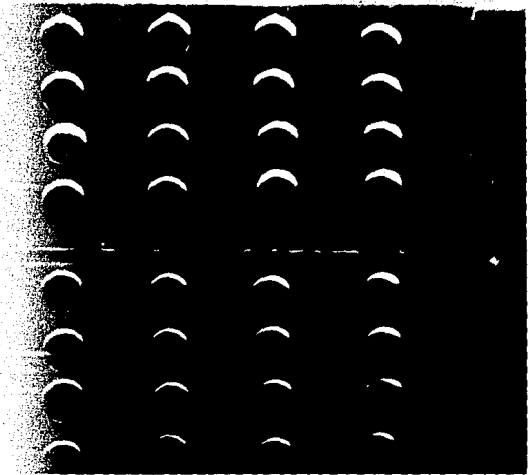
- Las canales presentaron pobre estado de carnes, sangre acuosa, ascitis, hidrotórax, dilatación cardiaca derecha, atrofia serosa, heces blandas, ausencia de parásitos gastrointestinales, engrosamiento de la mucosa del ileon y yeyuno los nódulos linfáticos mesentéricos se encontraron agrandados de tamaño y presentaban edema. (Figuras 7, 8 y 9).
- Los hallazgos del estudio histopatológico, indicaron en la porción del intestino grueso enteritis granulomatosa con proliferación e infiltración de células gigantes que al ser observado con la tinción de Ziehl-Neelsen, permitió la identificación de organismos ácido resistentes y a nivel de nódulos linfáticos se encontró hiperplasia linfoide.

El diagnóstico proporcionado en forma oficial por el laboratorio referido fué de infección por Mycobacterium paratuberculosis.

FIGURA 1.



FIGURA 2.



PRUEBAS SEROLOGICAS

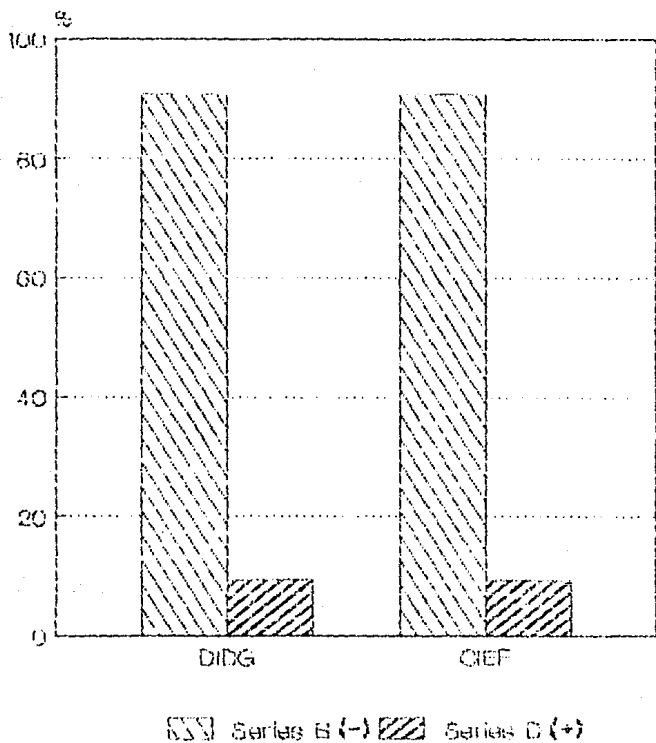


FIGURA 4.



FIGURA 5.



FIGURA 6a.



FIGURA 6b.



FIGURA 7.



FIGURA 8.



FIGURA 9.



ETAPA II. Determinar la eficacia de la vacunación subcutánea en la explotación.

II.2.b. Seguimiento serológico:

En el muestreo sanguíneo inicial, antes de aplicar la bacterina, las 40 corderas dieron resultados negativos al correr los sueros con las técnicas serológicas de DIDG y CIEF.

En los siguientes muestreos tanto del grupo control como del grupo de corderas a las que se les aplicó la bacterina por vía subcutánea, efectuados a los 30, 90, 120, 180 y 360 días posteriores a la fecha de vacunación, sólo en el grupo de corderas vacunadas se detectaron siete animales que con diferencias en los muestreos, presentaron resultados positivos a la técnica DIDG. (Cuadro 3).

Con la técnica de CIEF, no se obtuvieron resultados positivos en ninguno de los dos grupos experimentales y en ninguna de las fases del muestreo.

II.2.c. Seguimiento Clínico:

En 19 corderas de las 20 del grupo experimental de vacunación subcutánea, en el sitio de aplicación de la bacterina (área axilar), se presentaron lesiones granulomatosas a partir de los ocho días postvacunación, dichos granulomas presentaron un tamaño variable encontrándose desde 1 cm. de ancho por 1 cm. de largo, hasta 11 cm. de largo por 8 cm. de ancho, con un promedio general de 4 cm. de ancho por 6 cm. de largo. (Figuras 10a, 10b y 11).

En algunas corderas dichas formaciones debrideron, eliminando un exudado caseoso blanquecino del cual no se efectuó cultivo bacteriológico.

En una cordera el granuloma desapareció a los 10 meses postvacunales y en las 10 corderas que permanecieron en la explotación a los dos años continuaron presentando dichos granulomas.

Solo en una cordera del grupo experimental vacunado no se desarrolló el granuloma.

Una cordera de las 20 del grupo vacunado, a los dos años de edad desarrolló cuadro clínico característico de la Enfermedad de John, y serología positiva a ambas pruebas serológicas (RIDG y CIEF). al efectuar la necropsia en la explotación, se encontraron lesiones intestinales y en nódulos linfáticos mesentéricos sugerentes de paratuberculosis, no se pudo realizar el estudio histopatológico.

En la región axilar donde se aplicó la vacuna, a nivel de tejido subcutáneo se detectó una amplia zona de necrosis con presencia de exudado color blanco. (Figura 12).

Una cordera perteneciente al grupo control, a los dos años de edad, desarrolló el cuadro clínico y serología positiva en ambas pruebas serológicas (RIDG y CIEF). al realizar la necropsia a nivel de campo (en la explotación), solo presentó a nivel intestinal (ileon y colon), una corrugación leve, no tan aparente como en otros animales, en este caso tampoco se

pudo realizar histopatología, por lo que la muerte del animal pudo deberse a complicaciones crónicas ajenas al Mycobacterium paratuberculosis.

II.2.d. Prueba de la Tuberculina Mamífera:

De las 10 corderas del grupo control (no vacunado), tres resultaron positivas a la prueba de la tuberculina, la cual se realizó a los tres años de edad. En el grupo de corderas vacunadas, los 10 animales dieron reacción positiva a la prueba de la tuberculina mamífera. (Cuadro 4, Figuras 13a y 13b).

II.2.e. Estudio a la Necropsia:

Al efectuar la necropsia de una borrega del grupo control y de una borrega del grupo vacunado que dieron una reacción positiva a la tuberculina, las lesiones que se presentaron en ambas borregas fueron similares, encontrando una congestión leve de la mucosa intestinal y en los nódulos linfáticos mesentéricos hiperplasia linfoide.

Los resultados de la histopatología sólo reportan una enteritis granulomatosa leve e hiperplasia linfoide.

II.2.f. Cultivos bacteriológicos:

El cultivo de tejidos (bazo, hígado, nódulos linfáticos, riñón) y del exudado procedente del granuloma (en el caso de la borrega perteneciente al grupo de vacunadas), resultaron negativos a microorganismos del género Corynebacterium.

CUADRO 3.

RESULTADOS DEL MUESTREO SEROLOGICO TECNICA (DIDG)
GRUPO EXPERIMENTAL DE VACUNACION SUBCUTANEA.

No. de cordera	Ser. muestreo (control)	Días postvacunación				
		30	90	120	180	360
1	-	+	-	-	-	-
2	-	+	+	+	-	-
3	-	-	+	+	-	-
4	-	-	+	+	-	-
5	-	-	+	+	+	-
6	-	-	+	+	+	-
7	-	-	+	+	+	-
8	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	*
16	-	-	-	-	-	*
17	-	-	-	-	-	*
18	-	-	-	-	-	*
19	-	-	-	-	-	*
20	-	-	-	-	-	*
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
100%	0%	10%	30%	30%	15%	0%

* No se tiene dato por venta de 4 animales y muerte de 2 por timpanismo.

CUADRO 4.

RESULTADOS DE LA PRUEBA DE LA TUBERCULINA MAMIFERA.

BOBREGAS

VACUNADAS		NO VACUNADAS	
<u>Grosor del pliegue anal en mm.</u>		<u>Grosor del pliegue anal en mm.</u>	
Testigo	Control	Testigo	Control
* 18	2	4	3
* 9	3	2	2
* 15	4	* 5	2
* 14	3	* 11	3
* 6	2	4	3
* 20	3	4	3
* 13	3	* 13	3
* 14	2	3	2
* 8	2	5	3
* 7	2	5	3

* Animales positivos

FIGURA 10a.



FIGURE 10b.



FIGURA 11.



FIGURA 12.

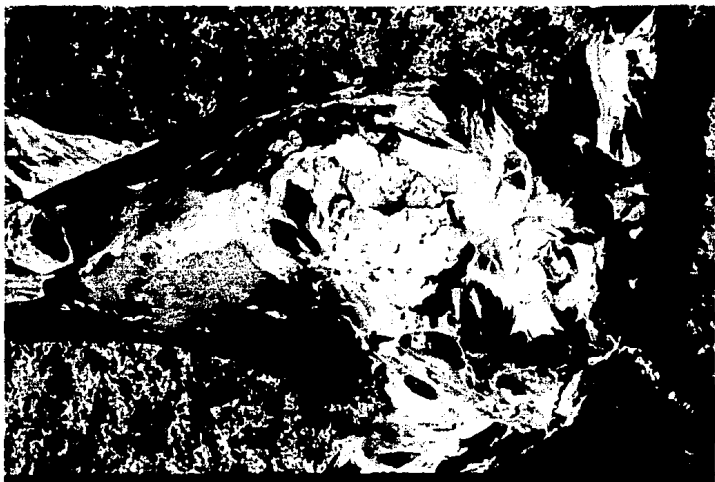


FIGURA 13a.



FIGURA 13b.



V. DISCUSION

ETAPA I. Diagnóstico inicial de la enfermedad en la explotación.

En diferentes países la enfermedad ha sido reportada por varios autores, la prevalencia de la misma oscila en rangos entre un 2% hasta un 21% y esta depende de los diferentes factores que intervienen para la presentación de la enfermedad en los rebaños Hole y MacLay. (1959); Fernández y col., (1981) y Merkal. (1984). La prevalencia serológica de 9.28% que fué encontrada en la explotación comercial donde se realizó el presente trabajo, es indicativa de que la enfermedad de Johne se encuentra presente en el rebaño no pudiendo establecer comparaciones con algunos datos de autores extranjeros ó nacionales, ya que las condiciones en que se reportan son experimentales y las condiciones en las que se trabajó son naturales.

Con respecto a la información nacional, solo se han realizado prevalencias serológicas a nivel de rastro, lo cuál no puede ser comparado pues al rastro concurren animales de diferentes explotaciones y con ello hay gran variedad de factores que influyen en ese tipo de datos, lo importante que podría concluirse, es que la enfermedad está difundida en el País, tal como lo reportan en su trabajo Bustamente y Faribay. (1974) así como Praxedis y col. (1983).

En las pruebas serológicas utilizadas en el presente trabajo (DIDG y CIEF), para establecer el diagnóstico inicial de la enfermedad en el rebaño, tomando muestras de los animales adultos, mostraron los mismos resultados después de que los sueros problema fueron corridos varias veces con ambas técnicas. Muhammed y col. (1978), encontraron que la CIEF es más sensible que la DIDG, además de tener la ventaja de ser más rápida porque los resultados se obtienen a los 45 minutos, con respecto a este reporte, la CIEF siempre reportó los resultados en menor tiempo que la DIDG, ya que la lectura de ésta última prueba se realizaba a las 24 hrs. comparando con la primera lectura de la CIEF realizada a los 45 minutos y en el aspecto de sensibilidad, no se encontraron diferencias entre ambas pruebas.

Una desventaja que se encontró a la CIEF, es que requiere de equipo más especializado y el gasto de antígeno es mayor que en la DIDG.

Moser (1982) indica que el diagnóstico de la paratuberculosis por solo pruebas serológicas tiene la desventaja de que no se puede diferenciar entre animales inmunes y animales infectados, de tal manera que si se intentara el control de la enfermedad eliminando a los animales positivos serológicamente, se corre el riesgo de eliminar animales resistentes, por ello la utilización de éstas técnicas serológicas, si bien permite determinar en una forma rápida en un rebaño si la paratuberculosis está presente, no pueden ser utilizadas como

Único criterio para establecer un programa de control ó erradicación de la enfermedad dentro de las explotaciones, siendo necesario complementar los resultados de dichas técnicas con otras técnicas de diagnóstico, tal y como lo recomienda Merkal. (1984), que es necesario efectuar un mínimo de tres cultivos bacteriológicos de los animales adultos además de las pruebas serológicas de RIDG, CIEF ó ELISA, para poder eliminar a un animal ó para poder establecer que un individuo está libre de la enfermedad.

En cuanto al 9.26% de prevalencia serológica encontrada en el rebaño corresponde a 13 animales adultos, de éstos 13 solo tres de ellos presentaban cuadro clínico sugerente a paratuberculosis, y los 10 animales restantes positivos a las pruebas serológicas, no desarrollaron cuadro clínico durante el tiempo en que se realizó el trabajo experimental. la explicación a éste hecho se fundamenta en lo que indican Larsen, (1973) y Brugère. (1987), los cuales mencionan que en toda explotación afectada por Mycobacterium paratuberculosis se pueden identificar cuatro categorías de animales:

- 1.- Animales Clínicamente Enfermos, que eliminan bacilos en las heces y que pueden ser detectados por el cuadro clínico, por pruebas serológicas ó por aislamiento a partir de cultivo de heces. En esta categoría podríamos clasificar a las tres hembras que además de mostrar serología positiva, desarrollaron el cuadro clínico.

- 2.- Animales Infectados Asintóticamente, éstos eliminan bacilos en las heces en forma constante o intermitente de tal manera que a pesar de no mostrar cuadro clínico pueden ser detectados por serología o por cultivo de heces, éste podría ser el caso de los 10 animales que dieron serología positiva y no desarrollaron cuadro clínico característico de la enfermedad, pero también cabe la posibilidad que este grupo de 10 animales entren dentro de la cuarta categoría propuesta por Larsen. (1973) y Brugère. (1987), descrita más adelante.
- 3.- Animales Infectados Asintomáticos No Excretores, no presentan cuadro clínico, ni eliminan bacilos en heces.
- 4.- Animales No Infectados, no presentan cuadro clínico, negativos al cultivo de heces y tejidos que eventualmente pueden reaccionar en forma positiva a pruebas intradérmicas o serológicas, existiendo la posibilidad de que sean reagentes recuperados de una leve infección.

En el presente trabajo no se realizó el cultivo de heces para intentar el aislamiento del bacilo, lo que impide establecer a que categoría de animales pertenecen las 10 borregas que presentaron serología positiva y ausencia de cuadro clínico.

En cuanto a las lesiones patológicas macroscópicas y microscópicas encontradas en las tres borregas adultas que fueron sacrificadas para realizar la necropsia a nivel laboratorio, que presentaron serología positiva y además desarrolla-

ron cuadro clínico, concuerdan con las reportadas por Rafiy y Entessar (1961); Rajya y Singh (1961), Nakamatsu y col. (1968) Fodstad y Gunnarsson, (1979); Newholme y Fletcher (1981); Prusvi-Reddy y col. (1984), si bien muchas de las lesiones no son definitivas para el diagnóstico de la enfermedad ya que pueden presentarse en otros transtornos patológicos otras lesiones como la corrugación y engrosamiento de la mucosa intestinal con tinciones positivas de Ziehl-Neelsen, aumento de tamaño de los nódulos linfáticos mesentéricos, son características de la enfermedad de Johnne, por lo que los animales sacrificados indicaron presentar paratuberculosis, sin embargo por limitantes de infraestructura no fué posible realizar el aislamiento del bacilo de tejidos ó heces fecales, pero los reportes de algunos autores sobre esta técnica, indican que solo detecta a los animales excretadores con o sin cuadro clínico que eliminan más de 100 bacilos por gramo de heces y que se requiere de tres meses mínimo para poder confirmar la lectura del cultivo lo que hace que la técnica sea un método largo y costoso además de que un resultado negativo a un cultivo no es de significancia diagnóstica ya que el bacilo suele ser eliminado en forma intermitente según lo propuesto por Hole y Maclay, (1959), Brugère (1987) y Koh y col. en (1988).

ETAPA II. Eficacia de la bacterina subcutánea en condiciones de la explotación.

La utilización de la bacterina subcutánea para la Enfermedad de Johne ha sido realizada en varios países desde hace ya bastante tiempo, los resultados en la mayoría de los trabajos son positivos, por ejemplo Allison (1960) y Crowther y col. (1976), recomiendan su uso ya que reportan porcentajes altos de seguridad lo que ayuda al control de la enfermedad, por otra parte Sherman, (1980) y Merkal, (1985) mencionan que las únicas limitantes de la vacunación subcutánea, son la de dar reacción cruzada con tuberculina y causar una reacción sévera (granuloma) en el sitio de inoculación.

En el presente trabajo en las corderas a las cuáles se les aplicó la bacterina subcutánea y que fueron monitoreadas serológicamente mediante las técnicas de DIDG y CIEF, para determinar su respuesta inmunológica a la vacunación, sólo siete animales de los vacunados (n=20), y ninguno de los controles presentaron reacción positiva, la cuál fué solo detectada por la técnica de DIDG, y en ningún caso con la técnica de CIEF, una posible explicación de estos resultados se fundamenta en lo que Trigo (1979) y Brugère (1987) indican, que un animal infectado con paratuberculosis ó vacunado pasa primero por una fase de hipersensibilidad retardada, la cual puede ser detectada con pruebas de inmunidad celular, tales como la joh_nina ó la tuberculina correspondiendo a la fase preclínica de

la enfermedad, cuando el animal infectado comienza a manifestar la fase clínica, se produce una respuesta humoral principalmente, estas dos fases pueden entremezclarse en algunos animales vacunados ó infectados; siendo factible la demostración de pruebas de inmunidad celular y humoral durante todo el curso de la infección, de ahí que algunos animales presentaran respuesta serológica positiva después de ser vacunados.

El estudio clínico realizado en las corderas, reveló en 19 de las vacunadas (19:20), presencia de granulomas en el sitio de aplicación de la bacterina a partir de los ocho días postvacunales, dichos granulomas se presentaron con gran variación en su tamaño. éste hallazgo ha sido reportado por varios autores (Larsen y col., (1964); O'Brien y col., (1972); Larsen (1973); Sherman (1980) y Merkai y col., (1985) donde reportan una reacción local en la piel con la vacuna subcutánea identificado como granuloma, que mide de 5 a 6 pulgadas de diámetro que permanece varios años en el individuo y que algunos de ellos llegan a drenar para dejar solo la cicatriz de la lesión además reportan haber podido aislar del exudado bacilos ácido-resistentes.

En este trabajo, las corderas que desarrollaron el granuloma lo tuvieron presente hasta por dos años en que se efectuó el seguimiento clínico, debridando algunos de ellos, eliminando un exudado color blanquecino del cuál no se aislaron bacterias.

Una cordera de este grupo, no desarrolló granuloma después de haber sido vacunada, al respecto Rafy y Entessar (1961) mencionan que dichos nódulos se forman en aquellas hembras que no han estado infectadas hasta antes de la vacunación y no se desarrollan en aquellas hembras que presentan con anterioridad la infección, de tal manera que existe la posibilidad de que dicha cordera que no desarrolló el granuloma después de habérsele aplicado la bacterina, haya estado ya infectada antes de ser vacunada, ya que desde el nacimiento, las corderas convivieron con todo el rebaño.

En esta investigación, también se reporta que una cordera del grupo vacunado y una cordera del grupo control, a los dos años de edad, desarrollaron el cuadro clínico sugestivo de la Enfermedad de Johne, sin embargo no se efectuó el aislamiento del bacilo, en este sentido Gilmour (1976) y Moser (1982) indican que la vacuna no previene la infección, pero reduce la incidencia de casos clínicos y la eliminación de microorganismos en las heces, de esto se desprende que en un rebaño con la presencia de la paratuberculosis, a pesar de aplicar la vacuna existe la posibilidad de que se sigan presentando animales con cuadro clínico, sin embargo Merkal y col., (1985) indican que los animales vacunados vía subcutánea, rara vez desarrollan cuadro clínico, mencionan que solo en 0.05% se desarrolló el cuadro clínico, por lo tanto también cabe la posibilidad de que la cordera que desarrolló cuadro clínico haya estado ya infectada antes de haber sido vacunada, Huite-

ma (1968) menciona que la vacuna protege al animal pero en algunos casos la resistencia es insuficiente para evitar el desarrollo del cuadro clínico.

En cuanto a la cordera del grupo control (no vacunada) que desarrolló el cuadro clínico y además presentó serología positiva y lesiones a la necropsia que indicaron la posible infección por M. paratuberculosis, reafirma, que la enfermedad continuaba presente en la explotación y que los animales vacunados estaban ante un constante desafío natural.

Sin embargo el encontrar el mismo número de animales que desarrollaron el cuadro clínico en los grupos experimentales, no permitió confirmar la eficacia de la bacterina utilizada. en animales desafiados en forma natural, lo que difiere de lo reportado por Merkai y col., (1985) donde encontraron que muy rara vez los animales vacunados via s.c. desarrollaban cuadro clínico desafiados en forma experimental.

La información que se desprende de la prueba de la tuberculina que fué realizada en 10 animales de cada grupo experimental, a los tres años de edad, la respuesta del 100% en el grupo vacunado y sólo en un 30% en el grupo control, permite presumir que la inmunidad desarrollada por este tipo de vacunación es principalmente de tipo celular y confirma lo propuesto por Hole y McClay (1959) en el sentido de que animales vacunados dan reacción inmunológica celular por ello existe el inconveniente de observar reacciones cruzadas con otras pruebas alérgicas, por ejemplo la tuberculina, de ahí que la

práctica de vacunación para problemas de paratuberculosis en el ganado bovino haya caído en desuso sobretodo en lugares donde está presente la tuberculosis y además existan campañas de erradicación de la misma. Para efectos de éste trabajo, la vacuna subcutánea presumiblemente indujo una respuesta inmuneológica de tipo celular, la cuál parece no ser suficiente para prevenir el desarrollo del cuadro clínico característico de la enfermedad. Por otra parte el hecho de haber detectado animales con reacción positiva a la tuberculina en el grupo control (no vacunadas), indica que éstos animales adquirieron la infección en forma natural y desarrollaron una respuesta inmunológica de tipo celular.

En cuanto a las dos borregas (una del grupo vacunado y otra del grupo control), que presentaron reacción positiva a la tuberculina mamífera, y que fueron sacrificadas para su estudio macro y microscópico, revelaron lesiones que no permitieron establecer que los animales tenían la enfermedad de Johne y las lesiones que se reportaron en los resultados pueden ser atribuidas a otros procesos patológicos padecidos con anterioridad.

VI. CONCLUSIONES.

1. Considerando la historia clínica, el desarrollo del cuadro clínico, los resultados serológicos y los hallazgos a la necropsia, junto con el estudio histopatológico que se efectuó en los animales adultos de la explotación se concluye que la paratuberculosis está presente en los animales del rebaño.
2. Con respecto a los métodos serológicos utilizados en este trabajo (Contrainmunolectroforesis CIEF y la Dobleinmuno-difusión en gel DIDG), la primera mostró mayor rapidez para proporcionar los resultados, pero el gasto de antígeno así como la infraestructura para llevarla a cabo son mayores comparadas con la técnica de DIDG.
En particular para la detección de anticuerpos postvacunales, la prueba de DIDG, resultó ser más sensible que la de CIEF.
3. Para poder llegar a un diagnóstico confirmativo de la infección por Mycobacterium paratuberculosis en un rebaño ovino, basta apoyarse en un adecuado estudio clínico y uno a la necropsia, ya que éste último confiere confiabilidad por lo significativo de las lesiones macro y microscópicas y sin estar sujeto a falsos negativos ó falsos positivos, considerando por ello que las técnicas serológicas y/o

alérgicas solo brindan apoyo para el diagnóstico, y no se puede recomendar en forma única para establecer un programa de control.

4. La vacunación utilizando la vía subcutánea, dió origen a la formación de nódulos fibrocaseosos (granulomas), de tamaño variable, los cuáles estuvieron presentes por lo menos dos años en que se efectuó el seguimiento clínico de los animales.

La presentación, desarrollo y permanencia por largo tiempo de los granulomas en los animales vacunados, ocasionó rechazo de los propietarios del rebaño para futuras vacunaciones.

5. El encontrar que un animal del grupo experimental "vacunados" y otro del grupo experimental "control" desarrollaran a los dos años de edad el cuadro clínico característico de la Enfermedad de Johnes, además de que presentarían esos animales serología positiva en DIDG y CIEF, y al estudio post mortem encontrar lesiones sugerentes a la infección de paratuberculosis, no permitió concluir sobre la adecuada ó inadecuada protección que brinda la bacterina utilizada ante el desafío natural al que estuvieron expuestos.

6. El encontrar a los tres años postvacunales una respuesta positiva a la prueba de la tuberculina en el 100% de los

animales vacunados, y sólo en el 30% de los controles, (no vacunados). indicó que la respuesta inmunológica de tipo celular es la más importante en la Enfermedad de Johnne. sobretodo en animales adultos infectados en forma natural o adultos que se les haya vacunado via s.c. desafiados naturalmente.

VII. BIBLIOGRAFIA

- AJEY KUMAR, A.; Sharma.S.N.; Sharma.K.N.; and Vyas.C.P. (1982) Studies on paratuberculosis in Russian Merino Sheep comparasion of four Diagnostic Test. Indian Vet.J.: 59; 352-357.
- ALEMÓN, R.S. (1988). Estudios de paratuberculosis (Mycobacterium paratuberculosis) en una explotación ovina comercial en el Municipio de Visitación, México. Tesis de Licenciatura. FES-C UNAM.
- ALLEN, W.M. and Patersson, D.S. (1974). A biochemical study of experimental John's Disease. III Protein metabolism in Sheep and Mice: J. Comp. Path.: 84; 391-399
- ALLSON, B. (1960). A killed vaccine against Tuberculosis (John's Disease) in sheep. J.Vet.Reg.: 21; 54-67.
- BECH-NIELSEN, S.; Furienek. L.L.; Spangler, E.; Heider, L.E.; Hoffsis, G.F. and Dorn, R.C. (1985). Characterization of Mycobacterium paratuberculosis antigenic proteins. Am. J. Vet. Res. Vol. 46; No. 11, 2418-2420.
- BENDIMEN, P.H. (1977). Application of the direct leukocyte migration agarose test in cattle naturally infected with Mycobacterium paratuberculosis: Am. J. Vet. Res.: 38: 2027-2028.
- BENEDECTUS, G. and Bosna, J. (1985). Paratuberculosis: A surgical method of diagnosis in practice.: Veterinary

Quarterly; 7: 217-221.

- BENEDECTUS, G.; Dijkhuizen, A.A. and Stelwagen, J. (1987). Economic losses due to paratuberculosis in dairy cattle. Vet.Rec.; 121: 142-146.
- BRAUN, W.F. (1982). Johne's Disease: Dairy Goat J.; 60:530-531
- BRIG, M.Z.; Khan, S.Q.Q. and Hug, M.N. (1962). Johne's Disease in Pakistan. Bull.off Int. Epiz.; 58: 7-10.
- BRUGERE, P.J. (1987). Le diagnostic de la paratuberculose chez les ruminants. Rec.Méd.Vét.; 163 (5):539-546.
- 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.; UNAM. México.
- CAMPHAUSEN, T.R.; Jones, L.R.; and Brennan, J.P. and Zito, J. (1985). Mycobacterium paratuberculosis glycolipid antigens: Identification and diagnostic applications. Amer. Assn. Veterinary Laboratory Diagnosticians. 28th Annual Proceedings. 247-256.
- CAMPHAUSEN, T.R.; Jones, L. R. and Brennan, J.P. (1988). Antigenic relationship between Mycobacterium paratuberculosis and Mycobacterium avium; Am.J.Vet.Res. 48 (8): 1307-1310.
- CERVANTES, O.R. (1983). Studies on antigens of Aspergillus: Their use in Veterinary Micology. Tesis doctorado. Fac. Med. Vet. of Glaslow. Departament of Vet. Pathology. University of Glaslow.

- COLLINS, P. and Davies, D.C. (1984). Mycobacterial infection in goats: Diagnosis and Pathogenicity of the Organism: Br. Vet. J.: 140: 196-201.
- CROWTHER, R.W.; Polydorou, K., Nitti, S. and Phyrilla, A. (1976). Johne's disease in sheep in Cyprus, Vet. Rec.: 98: 463.
- DAVIDSON, M. (1979). Diagnosis and control of Johne's Disease New Zealand Vet. J.: 27: 48.
- DELISLE, W.G. (1979). A brief Review of the Johne's Bacillus, New Zealand Vet. J.: 27: 50.
- DENT, C. H. R. (1935). Complications in field diagnosis of Johne's Diseases in sheep, Aus. Vet. J.: 62 (5): 171.
- DE LUCAS, T. J. (1984). Comparación de cuatro formas de diagnóstico de la paratuberculosis en caprinos. tesis Licenciatura. FES-C UNAM. México.
- EAST, N.E.; M.D.V.:P.V.M. (1983). Chronic weight loss en adult dairy goats, Dairy Goat J.: 61: 278 y 360.
- ELSKEN, L.A. and Nonnecke, B.J. (1986). In vitro transformation of lymphocytes from blood and milk of cows -- with subclinical paratuberculosis. Am. J. Vet Res. Vol. 47, No. 7: 1513-1516.
- FERNANDEZ, D.M.; Allen, G:J:M: y Alvarez, M:N: (1981). Prevalencia de la infección en un foco de paratuberculosis ovina. Anales de la Facultad de Leon-España: 27: 131-136.
- FODSTAD, F.H. and Gunnarsson, E. (1979). Postmortem examina-

- tion en the diagnosis of Johne's Diseases in goats. Acta Vet. Scand.; 20: 157-167.
- GARIBAY, V.M. (1974). Prueba doble comparativa intradérmica a la tuberculina aviaria y mamifera para la identificación de reactivos a Mycobacterium paratuberculosis en un hato de ovinos. Tesis de Licenciatura; Facultad de Med. Vet. y Zoot. UNAM. México.
- GILMOUR, N.J.; Halhead, W. A. and Brotherston, J.G. (1965). Studies of Immunity to Mycobacterium johnei in sheep. J. Comp. Path.; 75: 165-173.
- GILMOUR, N.J. (1966). Studies of the effect of the rimino phenazine B 663 (G. 30320) on Mycobacterium johnei. Br. Vet. J.; 122: 517-521.
- GILMOUR, N.J. (1966). Further studies on immunity to Mycobacterium johnei in sheep. J. Comp. Path.; 76: 341-349.
- GILMOUR, N.J. and Gardiner, A.C. (1968). Detection of antibodies to Mycobacterium johnei by immunofluorescence. J. Comp. Path.; 78: 107-113.
- GILMOUR, N.J. and Angus, K.W. (1973). Effect of revaccination on Mycobacterium johnei infection in sheep. J. Comp. Path.; 83: 437-445.
- GILMOUR, N.J. and Angus, K.W. (1974). Absence of immunogenicity of oral vaccine against Mycobacterium johnei in sheep. Res. Vet. Sci.; 16: 269-270.
- GILMOUR, N.J. (1976). The pathogenesis, diagnosis and control of Johne's disease. Vet. Res.; 99: 433-434.

- GOUDSWAARD, J.; Gilmour, N.J.; Dijkstra, R.G. and Van Beek, J.J. (1976). Diagnosis of Johne's Disease in cattle a comparison of five serological test under field conditions; Vet. Rec.; 98: 461-462.
- GRUMBELL, B. (1979). Johne's disease in sheep and other animals. New Zealand Vet. J.; 27: 48.
- GUNNARSSON, E. and Fodstad, F.M. (1979). Analysis of antigens in Mycobacterium paratuberculosis. Acta. Vet. Scandi.; 20: 200-215.
- HOLE, N.H. and McClay, M.H. (1959). The diagnosis of Johne's disease in cattle and the identification of Mycobacterium johnei infection. Vet. Rec.; 71: 1145-1149
- HUITEMA, H. (1968). Johne's disease in cattle and vaccination. Neth. J. Vet. Sci.; I: 189-196.
- HUTCHINSON, L.J.; Whitlock, R.W. and Glickman, L.T. (1986). Johne's Disease. What we know, what we need to know. Animal Health & Nutrition, May-Jun. 24-28.
- JULIAN, R.J. (1976). A short review and some observations on Johne's disease with recommendations for control. Can. Vet. J.; 16: 33-43.
- KLUGE, J.P.; Merkai, R.S.; Monlux, W.S.; Larsen, A.B.; Kopecky, K.E.; Ramsey, F.K. and Lehmann, R.P. (1968). Experimental paratuberculosis in sheep after oral, intratracheal, or intravenous inoculation; lesions and demonstration of etiologic agent. Am. J. Vet. Res.; 29: 953-962.

- KOH, S.H.; Dobson, K.J. and Tomasovic, A. (1988). Diagnostic test. Aus. Vet. J.; 65 (5); 160-161.
- KRISHNAPPA, G.; Jagannath, C. and Rao, B.V. (1989). The specificity of antibody response in experimental and natural bovine paratuberculosis studied by crossed immunoelectrophoresis with intermediate gel. Vet. Microbiology.; 21: 67-78.
- KUMAR, R.; Frasad, M.C. and Paliwal, O.P. (1988). Paratuberculosis in goats. A retrospect study. In. Vet. J.; 65: 582-584.
- LARSEN, A.B.; Hawkins, W.W. and Merkal, R.S. (1964). Experimental vaccination of sheep against Johne's disease. Am. J. Vet. Res.; 25: 974-976.
- LARSEN, A.B. (1973). Johne's disease immunization and diagnosis. JAVMA; 163: 902-903.
- LEPPER, A.W.D. and Wilks, C.R. (1988). Intracellular iron storage and pathogenesis of paratuberculosis comparative studies with other mycobacterial parasitic on infectious of veterinary importance. J. Comp. Path.; 98: 31-51.
- LEPPER, A.W.D.; Wilks, C.R.; Kotiw, M.; Whitehead, J.T. and Swart, K.S. (1989). Sequential bacteriological observations in relation to cell-mediated and humoral antibody responses of cattle infected with Mycobacterium paratuberculosis and maintained on normal or high iron intake. Aus. Vet. J.; 66 (2): 50-51.

- MANKTELOW, B. and Hellstrom, J. (1979). The history of Johne's disease. New Zealand Vet. J.; 27: 48.
- MC CALLOUGH, W.G. and Merkai, R.S. (1982). Structure of mycobactin "J": Current Microbiology; 7: 337-341.
- MC KEE, T.J. and Mc Coy, C.F. (1988). How to diagnose Johne's disease. Vet. Med. 301-306.
- MERKAL, R.S.; Kopecky, K.E.; Larsen, A.B. and Thurston, J.R. (1964). Improvements in the techniques for primary cultivations of Mycobacterium paratuberculosis. Am. J. Vet. Res.; 25: 1290-1293.
- MERKAL, R.S. (1970). Diagnostic methods for detection of paratuberculosis (Johne's disease). Proceedings of 74th annual meeting U.S. Animal Health Association.
- MERKAL, R.S.; Kopecky, K.E.; Larsen, A.B. and Nesk, R.D. (1970). Immunologic mechanism in bovine paratuberculosis. Am. Vet. Res.; 31: 475-485.
- MERKAL, R.S. and Curran, B.J. (1974). Growth and metabolic characteristics of Mycobacterium paratuberculosis. Applied Microbiology; 28: 276-279.
- MERKAL, R.S.; McCallough, W.G. and Takayama, K. (1981). Mycobactins, the state of art. Bull. de L'Institut Pasteur; 79: 251-259.
- MERKAL, R.S. and Mc Callough, W.C. (1982). A new mycobactin "J" from Mycobacterium paratuberculosis. Current Microbiology; 7: 333-335.
- MERKAL, R.S. (1984) Paratuberculosis: Advances in cultural,

- serologic and vaccination methods. J. A. Vet. Med. Ass.; 184: 939-943.
- MERKAL, R.S.; Hurley, S. and Hoffsis, G. (1985). Can you find the five animals which have Johne's disease. Dairy Goat J.; 63: 15-17.
- MOMOTANI, E. and Yoshino, T. (1985). Caseous Granulomas in Bovine Paratuberculosis. Jpn. J. Vet. Sci. 47 (3): 487-491.
- MORIN, M. (1982). Johne's disease (Paratuberculosis) in goat. A report of eight cases in Quebec. Can.Vet. J.; 23 55-58.
- MOSER, C.L. (1982). Johne's disease (Paratuberculosis) in goat. Can Vet. J.; 33: 63-66.
- MUHAMMED, S.I.; Todayon, R.A. and Cheema, A.H. (1978). Detection of antibodies to Mycobacterium johnei by counter-immunoelectrophoresis. Vet. Rec.; 102: 401-403.
- MUHAMMED, S.I. and Eliasson, E.C. (1979). The prevalence of antibodies to Mycobacterium johnei in colostrum deprived lambs. Vet. Rec.; 103: 11-12.
- NAKAMATSU, M.; Fujimoto, Y. and Satoh, H. (1968). The pathological study of paratuberculosis in goats, centered around the formation of remote lesions. Jap. J. Vet. Rec.; 16: 103-118.
- NEWSHOLME, S.J. and Pletcherz A. (1981). A micobacteriosis in a sheep resembling paratuberculosis (Johne's disease). J. of the South African Vet. Ass.; 52: 143-145.

- O'BRIEN, J.J.; Baskerville, A. and McClelland, T.G. (1972).
Johne's disease in sheep in Northern Ireland. Br. Vet. J.: 128: 359-365.
- PALIWAL, G.P.; Rayja, B.S. and Krishna, S.G. (1984). Comparative evaluation of diagnostic test for paratuberculosis in goats. Indian J. Anim. Sci.:54 (7); 657-659.
- PALSSON, A.P. (1962). Paratuberculosis in Icelandic sheep and its control by vaccination. Bull off Epiz.58: 65.
- PATTERSON, Ch.J.; La Venture, M.M. and Hurley, S.S. (1988). Accidental self inoculation with Mycobacterium paratuberculosis bacterium (Johne's bacterium) by veterinarians in Wisconsin. JAVMA: 192: 9.
- PEMBERTON, D.H. (1979). Diagnosis of Johne's disease in cattle using mesenteric lymph node biopsy; accuracy in clinical suspects. Aus.Vet.J.: 55: 217-219.
- PEPIN, M.; Marly, J. and Pardon, P. (1987). Corynebacterium pseudotuberculosis infection in sheep and the complement fixation test for paratuberculosis. Vet. Rec.: 120: 236.
- PODDOUBSKY, I.V. (1962). Etiologie et epizootologie de la paratuberculosis en U.R.S.S. Bull.off Int.Epiz: 58 11-23.
- PRAKEDIS, M.J.; Cervantes, R.A. y Ramirez, P.C. (1983). Detección de la prevalencia de paratuberculosis en caprinos y ovinos sacrificados en cuatro rastros pe

riféricos al Distrito Federal. Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias. 353-355.

PRUDVI REDDY, K.; Sriraman, P.K. and Rama Rao, P. (1982). Haematological and biochemical changes in sheep in Johne's disease. Ind. Vet. J.: 59: 498-502.

PRUDVI REDDY, K.; Sriraman, P.K.; Gopalnaidu, N.R. and Rama Rao, P. (1984). Pathology of Johne's disease in sheep. Indian Vet. J.: 61: 179-184.

PURAN CHAND, V.D.; Roa, P.; Carg, S.K.; Singh, I.P. and Chandra, R. (1985). Counter-immunoelectrophoresis for rapid diagnosis of sheep pox. Br. Vet. J.: 141: 124-128.

RAFYI and Entessar (1961). Paratuberculosis (Johne's disease) Bull. off Int. Epi.: 55: 1177-1203.

RAYJA, B.S. and Singh, C.M. (1961). Pathologic Changes in sheep with naturally occurring infections of paratuberculosis. Am. J. Vet. Rec.: 22: 189-203.

RAMIREZ, P.C.; Trigo, T.E.; Suárez, G.F. y Merkai, R.S. (1979). Aislamiento e identificación de Mycobacterium paratuberculosis en México. Téc. Pec. Méx.: 36: 74-76.

RAMIREZ, P.C.; Tenorio, G.V.; Valero, E.G.; Ramirez, C.C.; Trigo, T.E. y Merkai, R.S. (1982). Presencia de anticuerpos contra Mycobacterium paratuberculosis en ovinos y caprinos. Inst. Nal. de Invest. Pec. 177-180.

- RIS, D.R. (1987) Can sheep become infected by grazing pasture contaminated by cattle with Johne's disease. N.Z. Vet. J.: 35: 137.
- SAXEGAARD, F. (1985). Isolation of Mycobacterium paratuberculosis from Intestinal Mucosa and Mesenteric Lymph Nodes of goats by use of selective Dubos Medium. Journal of Clinical Microbiology, Vol. 22, No. 2; p. 312-313.
- SHERMAN, D.M. (1980). Johne's disease in dairy goats. Dairy Goat J.: 14-16.
- SHERMAN, D.M. and Gezon. H.M. (1980). Comparison of agar gel immunodiffusion and fecal culture for identification of goats with paratuberculosis. JAVMA; 177 1208-1211.
- SLOCOMBE, R.F. (1982). Combined streptomycin-isoniazid-rifampin therapy in the treatment of Johne's disease in a goat. Can. Vet. J.: 23: 160-163.
- SOMVANSHI, R.; Koul, G.L. and Biswas. J.C. (1986). Assessment of intravenous Johnin test in diagnosis of paratuberculosis in goats. Ind. J. of A. Sci.: 57 (9): 974-976.
- STRAUBE, E.F. and McGregor. B.A. (1982). Johne's disease in goats. Aus. Vet. J.: 59: 62-65.
- TAMARIN, R.N. (1959). Paratuberculosis (Johne's disease) of sheep in Israel II. Ibid : 163-168.
- TAYLOR, T.K.; Wilks. C.R. and McQueen. D.S. (1981). Isolation

- of Mycobacterium paratuberculosis from the milk of a cow with Johne's disease. Vet. Rec.; **109**: 532-533.
- THOEN, C.O. and Muscoplat, C.C. (1974). Recent developments in diagnosis of paratuberculosis (Johne's disease). JAVMA; **174**: 838-840.
- THOEN, C.O. and Baum, K. H. (1988). Current knowledge on para tuberculosis. JAVMA; **192**(II): 1602-1611.
- THOREL, M.F. and Valette, L. (1979). Stude de Mycobacterium paratuberculosis origine ovine et bovine. Revue Méd. Vet.; **130**: 1623-1633.
- THOREL, M.F. (1980). Tuberculose de la Chèvre; diagnostic biologique. Ann. Rech. Vet. **II** (3): 251-257.
- TRIGO, F.J. (1979). Diagnóstico de la paratuberculosis (Enfermedad de Johne). Vet. Méx.; **10**: 239-245.
- TRUE, C.K. and Roussel, A.J. (1987). Paratuberculosis: a review. The Southwestern Vet.; **36** (I): 25-34.
- UNZUETA, R.J. (1936). Contribución al estudio de la enteritis paratuberculosa bovina en México. Tesis de Licenciatura, Fac. de Med. Vet. y Zoot. UNAM México.
- ULLRICH, N.A.; Grumbein, S. and Coles, B. (1982). Paratuberculosis (Johne's disease) in goats. Vet. Med. Small Anim. Clinical.; 1101-1104.
- VAN AMSTEL, S.R. (1984). Observations on the symptomatology and diagnosis of clinical cases of Johne's disease. J. South African Vet. Ass.; **55**: 45-46.
- WHIPPLE, D.L.; Kaple, P.A. and Andrews, R.E. (1989). Analysis

of restriction endonuclease fragment patterns of DNA from Mycobacterium paratuberculosis. Vet. Microbiology.; 189-194.

WILLIAMS, E.S. and Spraker, T.R. (1979). Paratuberculosis (John's disease) in Bighorn sheep and Rocky mountain goat in Colorado. J. off Wildlife Disease.; 15: 221-227.

WILLIAMS, E.S.; Snyder, S.P. and Martin, K.L. (1983). Pathology of spontaneous and experimental infection of North American wild ruminants with Mycobacterium paratuberculosis. Vet. Pathol.; 20: 274-291.

WILLIAMS, E.S.; De Martini, S.C. and Snyder, S.P. (1985). Lymphocyte blastogenesis, complement fixation and fecal culture as diagnostic test for paratuberculosis in North America wild ruminants and domestic sheep. Am. J. Vet. Res.; 46: 2317-2321.

YOKOMIZO, Y.; Merkal, R. S. and Lyle, P.A. (1983). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of bovine immunoglobulin G antibody to a protoplasmic antigen of Mycobacterium paratuberculosis. AJUR. 2-11

ANEXO I

I. TECNICA DE CONTRAINMUNELECTROFORESIS (CIEF)

I.I. MATERIAL Y REACTIVOS.

I.I.a. Material:

1. Aparato de electroforesis.
2. Placa de acrilico para electroforesis.
3. Cámara de electroforesis.
4. Potenciómetro.
5. Balanza analítica.
6. Horador.
7. Micropipetas.
8. Laminillas y cristaleria.

I.I.b. Reactivos:

1. Agar noble purificado ó agarosa, al 1%.
2. Buffer de boratos pH=8.6
3. Buffer de veronal pH=8.6
4. Agua destilada.
5. Sueros controles positivos y negativos.
6. Antígeno protoplasmático de Mycobacterium para-
tuberculosis 10mg./ml.

I.II DESARROLLO DE LA TECNICA:

Se preparan en primer término los buffers (boratos ó veronal) a pH = 8.6. colocamos en la cámara de electroforesis 1.100 lts. de cualquiera de los dos reactivos anteriores. en 100 ml de buffer se agrega 1 g de agar purificado, el cuál se coloca en una estufa a 5 lbs. de presión durante 10 minutos para que se disuelva la agarosa.

En la placa de acrilico. para electroforesis. se ponen 5 ml. de agarosa ya disuelta. de tal manera que cubra toda la superficie de la placa con una capa delgada. sobre ésta se colocan ocho laminillas (portaobjetos) y sobre ellos se ponen 45 ml. de agarosa (5.5 ml./laminilla). dejamos a temperatura ambiente ó podemos meter la placa a una cámara fría para que la agarosa solidifique. después de lo cuál con el horadador se hacen los pocitos que contendrán el antígeno. los sueros control positivos. negativos y los problema.

Los pocitos tienen 3mm. de diámetro y 5 mm. de altura. la distancia vertical entre pozo y pozo es de 5 mm. y entre pozo de una hilera con la otra es de 10 mm.. en cada portaobjetos ó laminilla se establecen tres series de pozos de cuatro pares cada una de tal manera que en cada laminilla. hay un total de 24 pocitos y en toda la placa 192 pocitos.

En todos los pozos de las filas de la izquierda. se coloca el antígeno. y en los pozos de la derecha los sueros controles positivos. negativos y los problema.

La cantidad de suero control y suero problema es de 35 y la cantidad de antígeno que se coloca en cada pocito es de 17 μ l., el total de sueros que se pueden correr en la placa de electroforesis es de 96.

Una vez preparada la placa de electroforesis (es decir ya con los sueros y antígeno), se conecta al aparato de electroforesis el cual le pasará una corriente de 200 volts (2.5 ma/laminilla) durante 45 minutos, tiempo después se toma lectura de los resultados observando las líneas de precipitación formadas a la mitad del trayecto entre los pocitos de la fila derecha con los de la izquierda, las laminillas se retiran de la placa de electroforesis, colocandolas en una cámara húmeda para realizar dos lecturas posteriores, una a las 12 hrs. y la última a las 24 hrs. de haberse colocado en el aparato de electroforesis, posterior a esto se pueden lavar con el reactivo PBS y teñirlas.

II. TECNICA DE DOBLEINMUNODIFUSION EN GEL (DIDG)

II.1 MATERIAL Y REACTIVOS

II.1.a. Material:

1. Cajas de petri.
2. Cristaleria.

II.1.b. Reactivos:

1. Agar noble purificado ó agarosa.
2. Buffer de boratos pH=8.6
3. Agua destilada.
4. Sueros controles positivos y negativos.
5. Antigeno protoplasmático de Mycobacterium para-
tuberculosis.

II.2 DESARROLLO DE LA TECNICA.

Se mezcla 1 g. de agarosa en 50 ml. de agua destilada, para disolverla se coloca en una estufa durante 10 minutos a 5 lbs de presión, al sacarla se le agrega 50 ml. de buffer de boratos a pH = 8.6, se mezcla perfectamente, y en cada caja de petri de 50 mm. de diámetro se colocan 6 ml. del agar dejando que solidifique a temperatura ambiente ó bien en una cámara fría, después de ésto en cada caja se perforan dos series de 6 pocitos con uno al centro. Cada pocito tiene 3mm.

de diámetro y 5 mm. de altura, la distancia entre ellos es de 5 mm. en el pozo central se coloca 35 μ l. de antígeno y en los pocitos que están a su alrededor, la misma cantidad de suero control positivo, negativo y los problemas, la interpretación de los resultados se realiza a las 3, 24 y 48 hrs. dan dose como positivos aquellos que presenten líneas de precipitación.