



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
División de Estudios Profesionales

“HALLAZGOS ANATOMOPATOLOGICOS TEMPRANOS EN CABRITOS INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE POR VIA ORAL CON Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis”

T E S I S
Que para obtener el título de MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA presenta:

ERIKA TORRES RAMOS

Asesor: Dr. Gilberto Chávez Gris



México, D. F., 2001

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta Tesis forma parte del Proyecto de Investigación:

CONACyT 25395-B

“Evaluación inmunológica post-vacunal, efecto sobre la producción y la diferenciación de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en caprinos”

Esta Tesis forma parte del Proyecto de Investigación:

PAPIIT IN-221999

“Estudio inmunopatológico y polimórfico de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en animales y en pacientes con Enfermedad de Crohn”

DEDICATORIA

A mis padres y a mi hermana porque gracias a todos los momentos buenos y malos que hemos tenido que vivir he aprendido a no dejarme vencer ante los obstáculos y ha luchar siempre por mis ideales. Espero que nos demos una nueva oportunidad de estar juntos como familia.

A mi abuelita Celia por tu gran cariño y por consentirme tanto. Te quiero mucho.

A todos mis tíos y primos, en especial a Hilda, Paco, Pepe y Alicia porque siempre han estado a mi lado apoyándome; a Juan y Laura por enseñarme que Dios siempre nos da una nueva oportunidad para corregir el camino y valorar todo lo que la vida nos ofrece incluyendo a la gente que nos quiere.

A mis amigos Israel, Alberto, Leticia, Lirio, Nancy, Diana y Guillermo (q.e.p.d) por haber sido más que compañeros de clase mis mejores amigos enseñándome el valor de la amistad en los buenos y malos momentos. Siempre los recuerdo con cariño.

A la familia López Enríquez, por darme su cariño y hacerme sentir como parte de su familia, en especial a Beto por tu cariño y apoyo incondicional siempre que lo necesito. Siempre ocuparán un lugar muy especial en mi mente y mi corazón. Mil gracias.

A la familia Solano Trujillo por todo el apoyo que me brindaron en los momentos difíciles, sin su apoyo no lo hubiera logrado.

A Alberto Tejeda, Anne Sisto y Elisa Flores por estar siempre dispuestos a escucharme y por todos sus consejos. Los quiero mucho.

A Manuel Alcalá, Jorge Arias, César Gómez y Toñito por su amistad y por brindarme su apoyo en todo momento.

A mis queridos gatos Peckhet, Bodoque y Pelitos por ser siempre mi compañía, sobre todo en las noches de desvelo; a mis perros Max, Foxi, Pinky y Pequitas (q.e.p.d) por ser quienes me inspiraron a lo largo de la carrera para ser cada día mejor.

A los cabritos que formaron parte este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor y amigo MVZ, Dr. Gilberto Chávez Gris por todo lo que he aprendido y sobre todo por tu apoyo y paciencia durante la elaboración de este trabajo. Espero seguir trabajando y aprendiendo a tu lado.

Al Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por las facilidades otorgadas para el desarrollo de este trabajo.

Al Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (C.E.P.I.P.S.A) por las facilidades otorgadas para la estancia y el manejo de los cabritos que formaron parte de este trabajo.

A PRONABIVE (Productora Nacional de Biológicos Veterinarios) por su apoyo en la donación de los derivados proteicos aviar y bovino.

Al Dr. Jorge Estefanell y al Laboratorio CZ Veterinaria, S.L., (Pontevedra, España) por proporcionar la bacterina utilizada en el presente trabajo.

Al Dr. Marcelo de las Heras Guillamón. Profesor de Patología Veterinaria de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza, España., por todos sus consejos para el desarrollo de la técnica de inmunohistoquímica.

A todos mis profesores de la licenciatura, por compartir gran parte de sus conocimientos y experiencia, con especial cariño a MVZ. Anne Sisto, MVZ. Andrés Ducoing, MVZ. Dulce Ma. Brousset, MVZ. Alberto Tejeda, MVZ, M en C. Francisco Basurto y MVZ, Dr. Salvador Romo.

A los técnicos de Histología del Depto. de Patología, Luis Antonio Morales, Guadalupe Juárez J. y Eduardo Miranda L., por ayudarme y enseñarme el procedimiento para la preparación de los cortes histológicos y las tinciones.

A los MVZ's Adriana Alarcón, Abel Trujillo, Isabel Estévez y Ma. De la Cruz Domínguez por toda su ayuda y su compañía.

A Don Aureliano y a Don Benito por la ayuda que me brindaron en la sala de necropsias.

A Jaime Eugenio Córdova por su apoyo en la elaboración del material fotográfico.

Al MVZ. Adolfo K. Yabuta por tu apoyo y tiempo dedicado en la elaboración de las fotografías y presentación de este trabajo.

A Emma, Carmelita, Don Toño, Gisela R., Xóchitl y Fausto por hacer mi estancia más placentera en el Depto. de Patología.

A mi H. Jurado MVZ. Nuria de Buen de A., MVZ, Ph.D. Francisco Trigo Tavera, MVZ. M en C. Alicia Soberón Mobarak, MVZ. Aldo Alberti y MVZ, Dr. Gilberto Chávez Gris. Por las correcciones, observaciones y sugerencias para mejorar la calidad y presentación de este trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia un especial agradecimiento por ser más que mi casa de estudios, mi segundo hogar.

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
1.0 DESCRIPCIÓN Y ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE LA ENFERMEDAD....	2
1.1 INCIDENCIA DE LA ENFERMEDAD E IMPORTANCIA ECONÓMICA.....	4
1.2 INFECCIÓN EXPERIMENTAL.....	6
1.3 CARACTERÍSTICAS DEL AGENTE CAUSAL.....	10
1.4 ASPECTOS INMUNOLÓGICOS.....	11
1.5 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS	17
1.6 PATOGENIA Y LESIONES.....	18
1.7 CLASIFICACIÓN DE LAS LESIONES.....	21
JUSTIFICACIÓN.....	25
HIPÓTESIS.....	25
OBJETIVO.....	25
MATERIAL Y MÉTODOS.....	26
2.0. UNIDAD EXPERIMENTAL.....	26
2.1. PREPARACIÓN DEL INÓCULO.....	26
2.2. INOCULACIÓN EXPERIMENTAL.....	27
2.3. INMUNIZACIÓN.....	27
2.4. ESTUDIO SEROLÓGICO.....	27
2.5. INTRADERMORREACCIÓN.....	28
2.6. ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO.....	28
2.7. TOMA DE MUESTRAS.....	28
2.8. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.....	29

2.9. INMUNOHISTOQUÍMICA.....	29
2.10 ANALISIS ESTADÍSTICO.....	29
RESULTADOS.....	30
DISCUSIÓN.....	41
LITERATURA CITADA.....	47
CUADROS.....	51
FIGURAS.....	54

RESUMEN

TORRES RAMOS, ERIKA. "Hallazgos anatomopatológicos tempranos en cabritos inoculados experimentalmente por vía oral con *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*". Bajo la dirección del Dr. Gilberto Chávez Gris.

La paratuberculosis es una enfermedad que afecta a los rumiantes domésticos y silvestres, la cual es considerada como una enfermedad contagiosa y de curso crónico que afecta principalmente a animales adultos en su etapa clínica, aunque los animales jóvenes son más susceptibles a la infección. En este experimento se realizó la evaluación de las lesiones anatomopatológicas presentes en etapas tempranas de una infección experimental con *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) de origen caprino y ovino, así como su respuesta inmune celular y humoral. Para este experimento se utilizaron 29 cabritos al destete, de diferentes razas, procedentes de un rebaño libre de paratuberculosis; dividiéndose en tres grupos: el grupo A con 9 cabritos infectados con Map de origen caprino, el grupo B con 9 cabritos infectados con Map de origen ovino y el grupo C con 11 cabritos siendo el grupo testigo. Los animales fueron inmunizados a los 13 días post-infección (dpi), quedando para los grupos A y B un total de 5 animales inmunizados y 4 no inmunizados, para el grupo C 6 animales inmunizados y 5 no inmunizados. Se realizó la evaluación de la respuesta inmune humoral y celular utilizando las pruebas de Inmuno Difusión en Gel Agar (IDGA) e Intradermorreacción (IDR) utilizando para ésta última prueba PPD-aviar y PPD-bovino a diferentes periodos; también se realizó la evaluación anatomopatológica. Los resultados serológicos (IDGA) en los tres grupos mostraron un comportamiento similar de la respuesta inmune humoral, mostrando positividad a los 29 dpi y disminuyendo a los 182 dpi, la respuesta positiva fue más evidente en los animales inmunizados con relación a los no inmunizados, sugiriendo que dicha respuesta es generada por efecto tanto de la inmunización como de la infección. Mediante la IDR se detectó una respuesta similar para ambos antígenos (PPDa y PPDb) en los animales inmunizados que incluso superó a la respuesta generada en los animales infectados de los grupos A y B, aunque en éste último solo se observó respuesta al PPDb. Al realizar la evaluación anatomopatológica se pudieron apreciar lesiones granulomatosas focales en válvula ileocecal como en íleon en los animales sacrificados de los grupos A y B, tanto en los inmunizados como en no inmunizados siendo similares en grado de afección y distribución a los 120 dpi; mientras que a los 188 dpi las lesiones fueron más severas que las anteriormente descritas, incluso llegando a tener una extensión mayor involucrando porciones del yeyuno. En este trabajo se destaca la posibilidad de infección de Map, entre la misma especie (Map de origen caprino) como interespecie (Map de origen ovino). Así mismo, el efecto de la inmunización sobre el desarrollo de las lesiones al menos en etapas tempranas no parece mostrar diferencias con respecto a los animales infectados, contrastando con la respuesta inmune tanto humoral como celular, las cuales parecen mostrar una respuesta mayor en los cabritos inmunizados.

INTRODUCCIÓN

1.0. DESCRIPCIÓN Y ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE LA ENFERMEDAD

La primera descripción de la enfermedad se realizó en 1826 por d'Aroval el cual menciona una forma de enteritis la cual ocurría en ganado vacuno con diarrea crónica. Hansen y Nielsen en 1881, observaron un engrosamiento y corrugación de la mucosa intestinal en bovinos que agonizaban por una forma especial de enteritis, y fue hasta 1895 cuando Johnne y Frothingham describieron la enfermedad y demostraron la presencia de bacilos en algunas secciones de intestino de animales enfermos. La presencia de estos bacilos indistinguibles del bacilo tuberculoso hicieron pensar a estos investigadores que se trataba de una presentación inusual de tuberculosis. En el año de 1906 Bang, hizo una reevaluación de la enfermedad y determinó que no se trataba de tuberculosis, por lo que la nombró enteritis pseudotuberculosa o enfermedad de Johnne. Entre 1902 y 1908 la enteritis pseudotuberculosa de los bovinos fue descrita en países como Dinamarca, Alemania, Francia, Noruega, Holanda, Bélgica, Suiza y Estados Unidos. Para 1910 Twort pudo realizar el aislamiento del organismo causante y lo nombró *Mycobacterium enteriditis chronicae pseudotuberculosis bovis johnne*. Esta enfermedad posteriormente se conoció como paratuberculosis o enfermedad de Johnne y su agente causal como *Mycobacterium paratuberculosis*. El nombre de *Mycobacterium johnei* también fue utilizado como sinónimo de *Mycobacterium paratuberculosis*.⁽¹⁾ En México, en 1936 se diagnosticó por primera vez la enfermedad en bovinos lecheros, utilizando como método diagnóstico la aplicación de Johnina y tuberculina aviar, así como la observación de bacilos en el microscopio.⁽²⁾ En 1974 se realizaron otros estudios en nuestro país, los cuales se centraron en la utilización de técnicas inmunológicas para el diagnóstico de la paratuberculosis en ovinos; pero fue hasta 1979 que se pudo llevar a cabo el primer aislamiento de *Mycobacterium paratuberculosis* en México.⁽²⁾ Actualmente se sabe que la paratuberculosis o enfermedad de Johnne es un proceso bacteriano de curso crónico, el cual es producido por *Mycobacterium avium* subsp

paratuberculosis (Map), que afecta a rumiantes domésticos y silvestres como bovinos, ovinos, caprinos, venados así como camellos entre otros en los cuales produce lesiones granulomatosas en intestino y linfonodos mesentéricos principalmente.^(3,4,5,6) Aunque comúnmente la infección produce un cuadro clínico digestivo, en ocasiones puede tener difusión a otros órganos como el hígado, en donde también se genera una respuesta de tipo granulomatoso tanto en cabras como en bovinos, aunque en estos últimos también se puede apreciar la calcificación del endocardio y la aorta.⁽⁷⁾

El curso de la enfermedad es lento, desarrollándose el proceso en varias semanas o meses y con periodos de estabilización e incluso de ligeras recuperaciones, pero conduciendo inevitablemente a la muerte del animal, en donde al realizar la necropsia se puede apreciar una marcada atrofia serosa de los depósitos de grasa principalmente en el surco coronario, mesenterio y pelvis renal.⁽⁸⁾ Es considerada una enfermedad de curso crónico, que se desarrolla lentamente afectando principalmente a animales adultos en su etapa clínica, sin embargo los animales jóvenes son los más susceptibles a la infección, debido a que la infección puede ocurrir durante las etapas tempranas de vida, antes de los cuatro meses de edad y tiene un periodo de incubación variable, que puede ir desde 6 meses hasta 5 años.^(1,6,9,10) Debido a que su periodo de incubación suele ser muy largo, se hace realmente difícil la identificación de animales con signos clínicos poco aparentes y los portadores asintomáticos.⁽¹⁾

Mediante estudios epidemiológicos en la infección natural se ha determinado que los animales más susceptibles de infectarse y que posteriormente desarrollan la enfermedad, son animales jóvenes de menos de un año de edad, aumentando el riesgo de la enfermedad en los animales más jóvenes. Se ha estimado que en grupos de animales jóvenes expuestos al bacilo solo un tercio de ellos desarrollan una infección de tipo crónico; si bien no en todo caso, ya que esto depende del número de bacilos ingeridos y de los mecanismos de defensa del huésped. Aunque la ingestión de más organismos y los mecanismos de defensa del huésped pueden tener una adecuada respuesta es muy factible que resulte la infección.

Los animales adultos también pueden infectarse y desarrollar lesiones menos pronunciadas y contener pocos bacilos, por lo cual las posibilidades de que desarrollen la enfermedad son mucho menores, pero sin embargo pueden actuar como eliminadores del bacilo.⁽¹⁾ Por lo que los eventos tempranos que ocurren en el huésped determinan el resultado final del seguimiento de la respuesta inmune y no en todo caso ya que la infección puede progresar o puede ser resuelta, ya que esto no solo depende del número de exposiciones, de la dosis infectante; sino también del número de focos infecciosos establecidos y de la proporción de reinfecciones de origen tanto exógeno como endógeno, en conjunto con la manera en que los antígenos son presentados a las poblaciones de células T y la habilidad del huésped para agrupar las poblaciones celulares adecuadas al sitio de la inflamación.⁽¹¹⁾ Pese a que la infección tiene lugar generalmente en las primeras semanas o meses de vida, en los bovinos los primeros síntomas de la enfermedad no se manifiestan antes del año de edad como ocurre en cabras y ovejas.⁽¹²⁾ La presentación clínica de la enfermedad es el estadio terminal de una lenta infección crónica subclínica y esta puede ser precipitada por factores de estrés como el parto, un bajo nivel de nutrición, producción láctea intensiva, infecciones parasitarias y pastoreo en suelos con deficiencias de minerales por mencionar algunas.⁽¹⁾

1.1. INCIDENCIA DE LA ENFERMEDAD E IMPORTANCIA ECONÓMICA

La paratuberculosis se encuentra ampliamente distribuida a nivel mundial, incluyendo a México.⁽²⁾ En estudios realizados en rastros de nuestro país se han determinado prevalencias de 1.2 a 8.4 % para ganado caprino y de 0.8 a 4.4% en el caso del ganado ovino (Praxedis, 1985 citado por Vélez, 1998).⁽¹³⁾

Esto es realmente relevante ya que las pérdidas que provoca en la ganadería son debidas principalmente a la muerte o desecho de los animales, así como a la disminución de la productividad; ⁽¹⁴⁾ además de causar problemas reproductivos y predisposición a otras enfermedades debidas a una mayor susceptibilidad a otras infecciones, disminución en la producción y costos elevados por diagnóstico.^(1,3,9,15) Es por ello que el impacto económico que tiene esta enfermedad es muy importante,

ya que en países como Estados Unidos se han estimado pérdidas por 1.5 billones de dólares anualmente en la industria lechera,⁽¹⁶⁾ sin embargo es poco lo que se ha estudiado de acuerdo a las pérdidas en ganado de carne y especies menores como los ovinos y caprinos.^(17,18) Los animales afectados por paratuberculosis presentan signos clínicos a partir de los dos años de edad en el caso de las ovejas y desde los tres años en bovinos y caprinos. El principal signo que se observa siempre de forma constante es el adelgazamiento progresivo de los animales, con pérdida muy manifiesta de la condición corporal, llegando hasta la caquexia la cual suele acompañarse por diarreas acuosas crónicas o intermitentes, signo variable dependiendo de la especie.⁽¹⁾ Este tipo de diarrea suele presentarse de modo intermitente pudiendo prolongarse por meses y no cede a tratamientos, estas diarreas a su vez generan cuadros severos de anemia y ocasionalmente fiebre, edema intermandibular por hipoproteïnemia secundaria a la mala absorción, alopecia, presencia de heces pastosas como en el caso de los ovinos y caprinos. En estas especies la diarrea usualmente es ausente, pero se manifiesta una notable pérdida de peso de manera crónica y un desgaste generalizado siendo las características clínicas de estos animales. Los bovinos no muestran disminución en su consumo diario de alimento, pero es evidente que la ganancia de peso se ve mermada, lo cual repercute directamente en los parámetros productivos como disminución en la producción láctea e intervalo entre partos por mencionar algunos, además de presentarse ocasionalmente casos de aborto debido a que durante la infección puede presentarse anergia lo cual genera que el bacilo a menudo forme agregados dentro de los cotiledones de la placenta causando placentitis y aborto, sin que el bacilo afecte directamente al feto.^(1,3,7,19,20,21)

Si ocurre la infección intrauterina ésta puede ser dentro del primer o segundo trimestre de la gestación y el feto puede desarrollar tolerancia a los antígenos de Map, ya que puede reconocerlos como propios y por lo tanto es incapaz de limitar la infección con el subsecuente desarrollo de la paratuberculosis y este suceso jamás ha sido documentado.⁽¹⁾

Otro de los problemas importantes a mencionar en las infecciones por Map, es el hecho de que al parecer existen diferencias en la patogenicidad al afectar a

diferentes especies de rumiantes, lo cual contribuye a la presencia de diferentes patrones epizootiológicos, tal y como lo sugiere Saxegaard (1990),⁽²²⁾ al apreciar infección en caprinos y en bovinos inoculados con Map obtenido directamente de la mucosa de bovinos positivos a paratuberculosis.

1.2. INFECCIÓN EXPERIMENTAL

Experimentalmente se han logrado infectar con micobacterias especies que no son el huésped natural, sino también en otras especies animales utilizados como modelo experimental tales como ratas, ratones, gatos, conejos, hámsters, cuyes, embriones de pollo, pollos, jerbos, palomas y en algunas especies no utilizadas como animales de laboratorio como los caballos y los cerdos, ya que el bacilo puede replicarse dentro de algunos de estos huéspedes, pero usualmente la presentación clínica de la enfermedad no siempre se desarrolla, pero si se producen en algunos de ellos lesiones similares a las encontradas en infecciones naturales después de periodos prolongados a la exposición de la micobacteria.^(1,4) Estas consisten en una enteritis y linfadenitis granulomatosa; las lesiones intestinales varían de pequeños granulomas localizados en las placas de Peyer con pocas o ninguna bacteria observable con la tinción de Ziehl-Neelsen, hasta la presencia de múltiples granulomas bien organizados, con formación incluso de células gigantes, que provocan distensión de las vellosidades intestinales y engrosamiento macroscópico de la mucosa intestinal.⁽²³⁾ En estudios realizados en pollos se ha determinado que Map si es capaz de infectarlos al ser inoculados por vía endovenosa, oral e intraperitoneal⁽²⁴⁾ obteniendo una persistencia del bacilo en los tejidos afectados como son hígado, pulmón, bazo, bolsa de Fabricio y lámina propia intestinal en los cuales genera la formación de granulomas, conformados por células gigantes con un área central de necrosis caseosa y ocasionalmente con mineralización en un período relativamente corto de tiempo, alrededor de los 60 y 80 días post-inoculación, con una persistencia y progreso de la infección a nivel intestinal hasta por 240 días post-inoculación, sin presentar evidencia clínica de la enfermedad.⁽²⁵⁾

Se ha comprobado que la infección por Map puede ser mucho más severa en el caso de que los pollos que experimentalmente se someten a inmunodepresión utilizando productos como la ciclofosfamida por lo que al ser inoculados con micobacterias por vía oral se puede apreciar inicialmente la pérdida de peso y la presencia de lesiones histológicas en un período de 1 mes post-inoculación, éstas lesiones se encuentran principalmente a nivel intestinal y de la bolsa de Fabricio; sin embargo en hamsters también sometidos a inmunodepresión utilizando dexametasona e inoculados con Map se ha observado que no desarrollan signos clínicos, pero si se aprecian lesiones a nivel histológico ya que macroscópicamente no son detectables (Larsen y Miller (1977), citados por Valente, et al, 1997).⁽²⁶⁾ En estudios utilizando simultáneamente hamsters y conejos jóvenes inoculados por vía oral, intraperitoneal y endovenosa se ha observado que aparentemente los hamsters son más susceptibles que los conejos a desarrollar lesiones a nivel histológico, las cuales son imperceptibles a nivel macroscópico, confirmando que una de las propiedades características de Map es su habilidad para permanecer viable en el tracto intestinal de los animales de laboratorio y de rumiantes por largos periodos, sin afectar aparentemente la salud de los animales.⁽²⁷⁾

En estudios más recientes en conejos se ha podido determinar que hay cierta resistencia a la infección con relación a la edad en la que se tiene contacto con la micobacteria, siendo más susceptibles los animales más jóvenes, tal como ocurre en los rumiantes; para poder determinar de una mejor manera el desarrollo de la enfermedad se ha inoculado a conejos por vía oral, semejando la ruta de entrada natural, ya que en los experimentos anteriores al inocular por otras vías como la subcutánea, endovenosa e intraperitoneal la infección afecta a otros órganos complicando el estudio de la infección a nivel intestinal. El resultado obtenido en este estudio reflejó la presencia de signos clínicos de la enfermedad, en la cual se observa la presencia de diarreas a partir de los cuatro meses post-inoculación, siendo estas diarreas de curso intermitente y de consistencia variable, sin que estas pudieran ser controladas de manera natural.⁽²⁸⁾

Se ha realizado una gran variedad de estudios tomando en cuenta su importancia al afectar a rumiantes domésticos realizando la infección de modo experimental,

determinando así en algunos casos los periodos en los cuales la micobacteria es capaz de generar lesiones a nivel histológico en etapas tempranas posteriores a la inoculación experimental, así como el desarrollo del cuadro clínico de la enfermedad, para lo cual se han realizado inoculaciones por diferentes vías como la oral, intratraqueal y endovenosa de micobacterias viables en ovinos de tres semanas de edad, en los que se ha demostrado que en periodos de 1 y 16 meses posteriores a la inoculación se ha encontrado evidencia de la infección a nivel histológico, sin importar la ruta de inoculación se ha determinado que la presencia de micobacterias suele ser más numerosa en el tracto intestinal hasta que gradualmente alcanza un nivel máximo entre el primero y cuarto mes posterior a la inoculación, ya que después de éste periodo sufre un decremento gradual en el número de micobacterias, excepto en el caso de la inoculación oral en la cual se pueden tener ya animales subclínicamente enfermos en los cuales suelen presentarse alteraciones histológicas que inicialmente consisten en la acumulación de neutrófilos próximos a la presencia de micobacterias, seguidos de infiltración con macrófagos, linfocitos y por hiperplasia de fibroblastos. En las lesiones a nivel central de éstas se presenta necrosis y frecuentemente mineralización.⁽²⁹⁾

La inoculación oral de micobacterias a diferentes concentraciones en ovinos han demostrado también que producen una mínima respuesta celular en la mucosa intestinal al utilizar una dosis baja y una dosis intermedia, pero sí se produce una respuesta severa en el caso de la dosificación a alta concentración e incluso en algunos casos puede presentarse el cuadro clínico de la enfermedad, determinando así al realizar la necropsia que las lesiones primarias ocurren en los folículos linfoides y la pared intestinal.⁽³⁰⁾ En experimentos también realizados en ovinos con inoculación oral, pero con periodos de observación más prolongados de aproximadamente dos años se ha podido apreciar la presencia de diarreas por periodos intermitentes, así como la disminución en el consumo de alimento y por consecuencia una pérdida de peso constante, depresión, respiración acelerada e incluso en algunos animales casos de ataxia y muerte repentina.⁽³¹⁾ También se han realizado inoculaciones experimentales en bovinos de tres semanas de edad por vía oral, vía endovenosa y subcutánea, presentando en algunos animales signos de

diarrea ligera a los 120 días post-inoculación endovenosa, aunque a los 150 días post-inoculación mediante la necropsia se ha determinado que en el caso de la inoculación subcutánea y la endovenosa se desarrolla un engrosamiento moderado del último tercio del intestino delgado y alargamiento de los linfonodos mesentéricos. Los cambios histopatológicos consisten en áreas de inflamación granulomatosa caracterizadas por focos de células epitelioides y pocas células gigantes multinucleadas a nivel de linfonodos mesentéricos y tejido linfoide del intestino delgado.⁽³²⁾

Al intentar infectar bovinos de 2 años de edad aproximadamente se ha observado que hay cierta resistencia a la micobacteria, ya que se pudo realizar el aislamiento de la micobacteria de la mucosa del íleon, pero no se obtuvo la evidencia histológica de la penetración de microorganismos más allá de la mucosa, además de que el microorganismo no pudo ser aislado de los linfonodos. Por lo cual se tiene la teoría de que las micobacterias se encontraban adheridas a la superficie mucosa en el momento que los animales fueron sacrificados, ya que esto ocurrió al día 28 post-inoculación, por lo que se concluye que para determinar la presencia de la infección y el desarrollo de lesiones a nivel histológico se requiere del aislamiento de los animales y su constante monitoreo por periodos prolongados que pueden ser inclusive de años.⁽³³⁾

Sin embargo en un estudio anterior se logró infectar a bovinos de diferentes edades siendo todos animales menores a los siete meses de edad, esto se realizó por vía oral y endovenosa, con lo que se obtuvo evidencia de la infección en los animales que fueron inoculados a más temprana edad es decir del nacimiento a los tres meses de edad, en los cuales se apreció en un periodo de 12 a 18 meses post-inoculación la presencia de signos clínicos como la diarrea de curso insidioso y la pérdida de condición corporal constante ocasionando incluso la muerte de un animal. Los demás animales fueron sacrificados y sometidos a estudios post-mortem, en los cuales se apreciaron lesiones macroscópicas solo en los animales que fueron inoculados antes de los cuatro meses de edad, lo cual indica nuevamente que a mayor edad es mayor la resistencia generada contra la micobacteria.⁽³⁴⁾

Debido a la duda de las infecciones interespecie se realizó otro experimento en donde se inoculó a bovinos con micobacterias aisladas de ovinos, observándose los signos clínicos de la enfermedad a los 15 y a los 18 meses post-infección mostrando emaciación y diarrea profusa, demostrando la presencia de acúmulos de bacilos en las heces a los 12 y 13 meses post-infección; realizando la necropsia a los 16 y 18 meses posteriores a la inoculación encontrando las lesiones características de la enfermedad de Johne.⁽³⁵⁾

Cabe mencionar que este bacilo utilizado por Wilson no produjo infección en jerbos y conejos pero al ser inoculados en bovinos de 1 mes de edad por vía endovenosa si produjo signos de infección en un periodo entre los 7 y 10 meses post-infección generando también cuadros de diarrea y microscópicamente lesiones características de la enfermedad, por el contrario al inocular a bovinos de tres años de edad no se obtuvo evidencia clínica de la enfermedad ya que los animales se encontraban físicamente en excelente condición, aunque histológicamente al sacrificio si se encontró evidencia de la infección.^(36,37)

1.3. CARACTERÍSTICAS DEL AGENTE CAUSAL

La paratuberculosis es provocada por el bacilo *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (Map) , el cual es una micobacteria perteneciente al grupo CNM (géneros *Corynebacterium*, *Nocardia* y *Mycobacterium*)⁽³⁸⁾ siendo considerada como facultativa intracelular,⁽⁷⁾ capaz de permanecer viable fuera del organismo por largos periodos bajo condiciones adversas como congelación⁽³⁹⁾ por un periodo mayor a un año, en agua de río por 163 días, en agua estancada por 270 días, 7 días en orina y 11 meses tanto en heces de bovino como en suelo.⁽¹⁾

Es una micobacteria patógena dependiente de la micobactina, la cual es considerada como un agente quelante del hierro,⁽¹⁾ ésta es producida por todas las micobacterias, pero en el caso de Map se sabe que en ocasiones no la produce o lo hace en poca cantidad, por lo que se requiere de su adición para su crecimiento in vitro, en medios clásicos de yema de huevo, como el Herrold o el Lowestein-Jensen a razón de 2µg/ ml, en los cuales forma pequeñas colonias de 1-5 mm, firmes,

brillantes, rugosas, no pigmentadas, aunque inusualmente pueden ocurrir algunas variaciones extrañas como la producción de pigmentos rojos o amarillos principalmente en organismos recuperados de borregos, aunque también en algunos casos de bovinos,⁽¹⁾ se considera de crecimiento lento, el cual es de cuatro meses en promedio,⁽⁴⁰⁾ sin embargo el uso de micobactina exógena (micobactina J) en el medio para el aislamiento primario incrementa la velocidad de crecimiento por lo que una extensión de colonias visibles pueden desarrollarse en un lapso de 4 a 8 semanas, disminuyendo los periodos de incubación y de diagnóstico por 2 a 6 semanas.⁽¹⁾ Es un microorganismo Gram positivo, ácido alcohol resistente, que mide 0.5 a 1.5 μm ⁽⁴⁾ y que puede encontrarse en masas o en acúmulos en donde se encuentran enredados entre si, debido a una red de filamentos intracelulares que poseen estos bacilos.⁽¹⁾

Esta bacteria además posee características morfológicas que le confieren diversos grados de virulencia entre los cuales podemos mencionar a la pared celular la cual contiene glicolípidos como el lipoarabinomano (LAM) el cual es un componente que al parecer juega un papel importante en la unión e internalización de la micobacteria hacia los macrófagos y posiblemente a las células epiteliales, ya que una vez dentro de la célula blanco la maduración del fagolisosoma es abatida posiblemente mediante la inhibición de la bomba de ATPasa la cual normalmente acidifica el fagosoma; además de estar asociado a la inducción de la respuesta inmune celular.⁽⁴¹⁾

1.4. ASPECTOS INMUNOLÓGICOS

La infección por *M. paratuberculosis* tiene lugar por vía oral, a partir de las heces de animales excretoras ya que estas conforman la ruta primaria de infección debido a que impregnan las ubres, agua, alimentos u otros objetos, la ingestión de los bacilos ocurre comúnmente cuando los animales jóvenes se amamantan y los pezones se encuentran contaminados con heces,^(1,42) estas bacterias suelen entrar al animal encapsuladas en pequeñas gotas lipídicas de la leche lo cual permite su inmediata penetración a la superficie mucosa del tracto gastrointestinal en donde son

endocitadas por las células M las cuales son células altamente especializadas solo en el transporte de antígenos, estas se encuentran en el epitelio que recubre al tejido linfoide asociado a la mucosa del intestino (GALT),⁽¹⁾ el cual se divide en tres compartimentos linfoides distintos los cuales son: a) el tejido linfoide intraepitelial el cual presenta una población conformada en un 95% por células T dentro de las cuales del 70 al 90% son supresoras, b) la lámina propia conformada en un 40% por células B y 60% por células T y por c) las placas de Peyer conformada en un 80% por células B y 20% por células T, siendo este último compartimento el que sirve como puerta de entrada,⁽¹¹⁾ principalmente las placas de Peyer del íleon caracterizadas por ser de tipo continuo, así como las del yeyuno caracterizadas por ser de tipo discontinuo en los rumiantes,^(4,12,43,44) para posteriormente ser transportadas intactas o degradadas en vacuolas a los macrófagos en el tejido sub e intraepitelial de las Placas de Peyer y la lámina propia adyacente, una vez dentro de estas células la bacteria permanece viable y protegida de los factores humorales siendo capaz de multiplicarse con facilidad y ser transportada hacia los linfonodos.^(1,44)

La presentación de la inmunidad celular que permite la destrucción de bacilos es debida a la acumulación y activación de los macrófagos por influencia de los mediadores solubles liberados por la activación de las células T; ya que de no ser así los macrófagos no activados no son capaces de destruir al bacilo y por lo cual puede proporcionar un medio adecuado para su crecimiento. La activación de los macrófagos se considera un evento crítico en la expresión de la inmunidad del huésped, ya que esta activación es más común dentro de granulomas u otras lesiones inflamatorias inducidas por mecanismos dependientes de las células T. Los macrófagos cercanos al centro de una lesión granulomatosa al parecer son ricos en enzimas lisosomales y tienen un alto grado de habilidad destructiva, sin embargo aún se desconoce el mecanismo por el cual algunos macrófagos mueren en lesiones tempranas, ya que la micobacteria intacta no tiene efectos tóxicos; pero se cree que esto puede ser un mecanismo necesario para la disponibilidad de bacilos para el evento de fagocitosis mediada por macrófagos activados, por lo que se supone que

éste evento tal vez es mediado por células T citotóxicas o por el factor citotóxico de monocitos.⁽¹⁾

Los macrófagos también tienen función como células accesorias para la proliferación de linfocitos T, así como para la inducción de células T auxiliares mediante la presentación de antígenos y la liberación de una variedad de citocinas. Posteriormente los antígenos son fagocitados por los macrófagos para ser degradados a péptidos por las células presentadoras de antígenos para en orden poder ser expresados en la superficie celular en conjunto con el Complejo principal de histocompatibilidad (MHC) para ser reconocidos por las células T.

Sin embargo cuando los antígenos provienen del exterior o de la superficie celular, como en el caso de las bacterias, estos son procesados por vía exógena y son presentados por moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase II, mientras que los antígenos provenientes del interior de las células como en el caso de los virus, son procesados por vía endógena y son expresados por moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I. Por lo cual las diferentes subpoblaciones de linfocitos T y fagocitos mononucleares están interconectados para formar circuitos regulatorios que determinan la calidad, extensión y duración de la respuesta inmune.⁽¹¹⁾

Aunque se sabe que durante los estadios terminales de la enfermedad se desarrolla anergia y los macrófagos infectados migran causando bacteremia; esta migración al parecer es debida a la pérdida de los factores de inhibición de la migración.⁽¹⁾

En las infecciones micobacterianas se ha demostrado el desarrollo de actividad supresora, la cual puede ser de dos tipos la tolerancia y la anergia. La tolerancia se refiere a una característica reducción de la habilidad del huésped para responder a los cambios iniciales y subsecuentes con el antígeno; mientras que la anergia es la pérdida de la sensibilidad o la desensibilización preexistente al antígeno.

En la mayoría de los casos la supresión observada en las infecciones micobacterianas es en forma de anergia la cual se encuentra asociada a la presencia de una gran cantidad de micobacterias.⁽¹¹⁾

Además se sabe que Map tiene diversos mecanismos de resistencia y evasión de la fagocitosis como son su pared compuesta por una capa rica en lípidos, la producción

de sulfatos que evitan la fusión fagosoma-lisosoma, el escape del fagosoma al citoplasma, inhibición del óxido nítrico por medio de glicolípidos y otros. Una vez infectados los macrófagos pueden procesar algunos productos bacterianos y presentarlos a los linfocitos T mediante la vía del Complejo principal de histocompatibilidad (CMH) clase II, aunque también puede ocurrir por la vía del CMH clase I, cuando Map es capaz de escapar al citoplasma, al ser activados los linfocitos T estos se incrementan significativamente cuando la micobacteria tiene contacto luminal convirtiéndose en los responsables de la resistencia, debido a que los linfocitos cuentan con receptores altamente específicos que reconocen a los antígenos en asociación con glicoproteínas de las membranas de los macrófagos, con la subsecuente síntesis y liberación de interleucina 1 (IL-1) por parte de los macrófagos. Posteriormente la IL-1 estimula a los linfocitos T para producir IL-2, la cual es responsable de la proliferación de estos linfocitos. Una vez que los linfocitos T se han activado, se facilita la actividad y diferenciación de los macrófagos por parte de otras interleucinas, como el γ -interferón (IFN).⁽⁴⁵⁾

Para lograr una respuesta inmune efectiva contra los organismos intracelulares, las células T deben de ser capaces de generar la presencia de células apropiadas, así como la oportuna liberación de citocinas para el desarrollo de un granuloma discreto para contener la infección y maximizar la actividad bactericida.⁽¹⁾

Para que se lleve a cabo el desencadenamiento de los mecanismos para la formación del granuloma, es indispensable la presencia de un antígeno insoluble como lo son las fracciones celulares micobacterianas, debido a que estas inducen una inflamación de tipo granulomatosa ya que su persistencia puede ser por largos periodos. Además de la solubilidad y persistencia del antígeno, la presencia de macrófagos activados así como la manera en que estas células presentan el antígeno a los linfocitos y/o la predominancia de antígenos solubles pueden afectar enormemente la formación inicial y el curso del granuloma, por lo que estos mecanismos no son suficientes para controlar la infección. De igual manera los antígenos estimuladores de linfocitos y sus factores solubles no tienen efecto directo sobre el bacilo intracelular, sin embargo el desarrollo de estos eventos son necesarios para el desempeño de una eficaz inmunidad mediada por células. Las

manifestaciones de inmunidad mediada por células (IMC), la hipersensibilidad de tipo tardío o tipo IV, la formación de granulomas, así como la muerte y eliminación de los bacilos paratuberculosos representan el resultado final de una compleja interacción de células. Estas interacciones celulares están controladas directamente por mediadores solubles o señales comúnmente conocidas como interleucinas, linfocinas y/o citocinas. Aunque se cree que las lesiones tempranas son probablemente controladas únicamente por GALT, con o sin estimulación de la inmunidad periférica; en una respuesta inmune efectiva lograda dentro de los focos infecciosos primarios y secundarios la respuesta puede ser probablemente a causa de los linfocitos T cooperadores tipo 1 (Th1), con la liberación de IFN- γ , IL-2, Factor de necrosis tumoral (TNF) y una variedad de otras citocinas asociadas con la regresión y resolución de la infección, ocurriendo estos eventos dentro de los compartimentos de GALT con poca evidencia periférica de infección.⁽¹¹⁾

En la paratuberculosis se reconocen dos formas histopatológicas de la enfermedad, la tuberculoide y la lepromatosa las cuales dependen directamente del tipo de respuesta inmune que este predominando. En el tipo tuberculoide la respuesta es principalmente con linfocitos T cooperadores tipo 1 ya que existe una fuerte respuesta inmune celular con una pobre respuesta inmune humoral, ya que ésta última no tiene un adecuado nivel de protección, y en realidad los anticuerpos humorales contra el patógeno al parecer son tardíos en el curso de la infección hasta que el animal se aproxima a la etapa clínica de la enfermedad, como sucede con otras micobacterias o patógenos intracelulares en general, por lo que se piensa que la respuesta inmune mediada por células es necesaria para el control del progreso de la paratuberculosis. Específicamente el papel que juegan los linfocitos T cooperadores CD4+ en la activación de macrófagos para destruir a los organismos intracelulares,⁽⁴⁵⁾ en este caso los niveles de γ -IFN e IL-2 son altos. Por el contrario, en el tipo lepromatoso, predominan los linfocitos T cooperadores tipo 1 por lo que la respuesta inmune celular es baja, mientras que la respuesta inmune humoral es alta. En este caso, los niveles tanto de γ -IFN como los de IL-2 son bajos.⁽⁴⁾

Esto explica el hecho de que la inmunidad humoral generalmente implica un incremento en la proliferación bacteriana y una disminución de la respuesta inmune

mediada por células, por lo que se puede decir que existe una relación inversa entre ambas respuestas. Este incremento en la respuesta inmune humoral genera la deposición de complejos inmunes en el tracto intestinal del ganado vacuno infectado por Map de manera crónica, lo cual puede resultar de una reacción de hipersensibilidad de tipo tardío o tipo IV, la cual causa algunos de los signos clínicos como glomerulonefritis e infartos renales ocasionales en estadios muy avanzados de la enfermedad.⁽¹¹⁾

Sin embargo en los ovinos el progreso de la paratuberculosis se encuentra influenciada por el tipo de respuesta de los linfocitos T cooperadores, debido a que en la presentación clínica de la paratuberculosis en ovinos se han reconocido dos formas histológicas distintas de la enfermedad, las cuales se denominan como paratuberculosis lepromatosa o multibacilar, cuyas lesiones se caracterizan por la infiltración de macrófagos y un alto número de bacilos ácido alcohol resistentes presentes; mientras que en la paratuberculosis tuberculoide o paucibacilar esta formada por la infiltración de linfocitos y un bajo número de bacilos ácido alcohol resistentes presentes, mostrando así la evidencia de que la respuesta inmune mediada por células en la presentación paucibacilar esta basada en Th1, mientras que en la presentación multibacilar se tiene una respuesta inmune típica de Th2.^(4,41) Desafortunadamente, existe una gran deficiencia en el entendimiento de los eventos que ocurren entre el estadio de infección temprana y la fase clínica, ya que ésta cuestión ha sido creada por: 1) la inhabilidad para detectar o identificar a los animales en este periodo, 2) la concentración de la mayoría de los estudios basados en la evaluación de las pruebas diagnósticas en lugar del entendimiento de los eventos inmunológicos y 3) la interpretación de resultados como grupo en vez de hacerlo de modo individual. Esto se relaciona en base a que cada animal infectado responde de modo diferente a las pruebas diagnósticas por lo que conviene que los datos obtenidos sean analizados como población y no tratar de entender el progreso individual.⁽¹¹⁾

1.5. MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

La realización del diagnóstico de la paratuberculosis suele ser problemática debido a las características antigénicas de la micobacteria, al espectro inmunológico que se desarrolla, a la presentación de lesiones que no siempre son detectadas macroscópicamente, así como a la dificultad de observar lesiones histológicas dentro de las fases iniciales de la micobacteriosis. Debido a lo anterior, es necesaria la realización de una gran variedad de pruebas que ayuden a detectar la presencia de la micobacteria, mediante cultivos de íleon y linfonodos mesentéricos de los animales afectados ya muertos, cultivo fecal, biopsia de linfonodos y mucosa intestinal, pruebas de johnina intradérmica, así como también la realización de otras técnicas como la prueba de ELISA, Radioinmunoensayo, Anticuerpos fluorescentes, Transformación linfocitaria, Inhibición de la migración, Migración leucocitaria, Inmunoperoxidasa, Hemoaglutinación, Inmunodifusión en Gel de Agar (IDGA),⁽¹⁾ Fijación de Complemento (FC) o pruebas de detección de DNA como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y métodos radiométricos las cuales son altamente sensibles.⁽¹²⁾ Ya que algunos de los resultados falsos positivos se deben a una reacción cruzada como consecuencia de una infección con otras especies de *Mycobacterium spp*, *Actinomyces spp*, *Dermatophilus spp*, *Nocardia spp*, *Streptomyces spp*, así como *Corynebacterium spp*. Los antígenos de Map comúnmente usados en los métodos inmunológicos y serológicos como los protoplásmicos y los PPD's son preparaciones crudas que contienen antígenos comunes del orden de los Actinomycetales. En contraste los resultados falsos negativos ocurren como resultado de tolerancia, anergia o factores antigénicos ocultos o enmascarados.⁽¹⁾

Sin embargo el conjunto de varias pruebas puede orientarnos a un mejor diagnóstico tal es el caso de los estudios anatomopatológicos, estos se basan principalmente en la realización del estudio de las lesiones macroscópicas halladas en la necropsia, observando minuciosamente el intestino delgado, especialmente el yeyuno y el íleon junto con los nódulos y vasos linfáticos asociados a los mismos, así como la evaluación microscópica de lesiones a nivel histológico.⁽¹²⁾

1.6. PATOGENIA Y LESIONES

Es aceptado que la infección natural por ésta micobacteria tiene lugar por vía oral, aunque se ha podido comprobar que la inoculación por vía endovenosa y respiratoria conducen también al desarrollo de lesiones y enfermedad intestinal similar a la desarrollada por infecciones de origen oral. Las lesiones histopatológicas tempranas de paratuberculosis suelen ser de tipo multifocal, las cuales se localizan por debajo del revestimiento epitelial, pero algunas de ellas pueden encontrarse muy dentro de la lamina propia y la submucosa, sugiriendo una ruta distinta de la penetración epitelial directa, por lo cual pudiera asociarse a una vía de entrada hematológica. En infecciones experimentales en ganado bovino se ha mencionado que la difusión hematológica y la invasión del antígeno dentro de las diferentes capas histológicas del intestino se considera que pueden ser el factor desencadenante de la respuesta inmune temprana mediada por GALT la cual es fuertemente sugerida por la activación temporal de la sensibilidad inmune humoral.⁽¹²⁾ En los bovinos las lesiones están caracterizadas por cambios granulomatosos difusos, sin necrosis, hiperemia o fibrosis. En los ovinos y caprinos estas lesiones pueden mostrar necrosis caseosa, calcificación y fibrosis semejando cuadros de tuberculosis. Los animales enfermos se encuentran emaciados, con atrofia serosa de los depósitos de grasa, edema intermandibular y efusión serosa abundante dentro de las cavidades corporales, afectando principalmente la peritoneal, pericárdica y la pleural.⁽⁴⁷⁾ En la paratuberculosis de los bovinos no se aprecia en las lesiones el desarrollo de necrosis caseosa, calcificación y el incremento en la vascularidad; por el contrario alrededor del 25% de los ovinos y caprinos infectados presentan necrosis caseosa de la mucosa intestinal, la cual se cree que es debida a la compresión y bloqueo mecánico generado por la atrofia de los vasos linfáticos; con menor frecuencia ocurre la calcificación de los granulomas presentes en la mucosa, submucosa y serosa del intestino, vasos linfáticos, linfonodos e hígado. En el hígado los granulomas focales presentan múltiples células gigantes tipo Langhans.⁽⁴⁷⁾ En caprinos se ha descrito la presencia de depósitos fibrinoides y amiloides de los pequeños vasos de los linfonodos, adrenales, ubre y particularmente el glomérulo

renal. Sin embargo las lesiones primarias están limitadas al tracto gastrointestinal y a los linfonodos regionales. La superficie intestinal se encuentra engrosada, algunas veces edematosa, los pliegues de la mucosa pueden estar enrojecidos por congestión o ulceración. En casos menos severos la mucosa intestinal puede tener apariencia granular o difusamente opaca. El total de cambios tempranos reconocibles son un engrosamiento marcado y aterciopelado de la mucosa intestinal, estos cambios son más comunes en ovinos y caprinos.⁽¹⁾

Las lesiones suelen extenderse de forma gradual, involucrando en un principio pequeñas porciones del duodeno, yeyuno e íleon, progresando la infección hasta afectar grandes porciones del intestino delgado en estadios avanzados de la enfermedad conteniendo en estas porciones algunos bacilos.⁽⁴⁷⁾

Las principales lesiones macroscópicas y microscópicas por paratuberculosis se localizan en el intestino delgado y nódulos mesentéricos las cuales se caracterizan por un engrosamiento de la mucosa,⁽⁴⁸⁾ la cual se aprecia como un plegamiento rugoso transversal y edema de la serosa, esta característica macroscópica suele ser menos aparente en caprinos que en ovinos,⁽⁸⁾ ya que en los ovinos es más aparente la reacción inflamatoria de tipo granulomatosa a nivel del íleon, involucrando también la capa muscular acompañada por descamación del epitelio y una necrosis coagulativa en la porción superficial de la mucosa.⁽⁴⁷⁾

Por lo que se considera que estas lesiones corresponden a una enteritis y linfadenitis granulomatosa caracterizadas por la presencia de pequeños granulomas, localizados en la zona interfolicular de las placas de Peyer de la válvula ileocecal y de las placas yeyunales, en los que contradictoriamente la presencia de bacilos ácido alcohol resistentes es esporádica o generalmente nula, apreciándose también un infiltrado inflamatorio compuesto principalmente por macrófagos de citoplasma espumoso y abundante bien diferenciados, linfocitos, células plasmáticas, ocasionales células gigantes las cuales algunas veces forman parte de una reacción de hipersensibilidad de tipo tardío o tipo IV,⁽¹⁾ así como por células epitelioides que ocupan la lámina propia de amplias zonas de la mucosa del íleon y del yeyuno, en el citoplasma de los macrófagos en ocasiones es posible apreciar un número elevado de bacilos.⁽⁸⁾

Experimentalmente las lesiones histológicas tempranas observadas en bovinos son la presencia focal de células gigantes en las placas de Peyer y en la punta de las vellosidades intestinales. Debido a la presencia de este infiltrado celular, las vellosidades intestinales pueden aparecer en ocasiones tumefactas y distorsionadas semejando la forma de un trébol, en algunas secciones las vellosidades suelen presentar cambios degenerativos y contener extracelularmente bacilos ácido alcohol resistentes,⁽¹⁾ en las criptas intestinales se hace evidente la reducción de estas por atrofia y cambios degenerativos,⁽⁴⁷⁾ igualmente la submucosa también puede presentar un infiltrado compuesto por macrófagos, linfocitos y células plasmáticas, pudiéndose hallar afectados los vasos linfáticos, los cuales pueden aparecer dilatados y mostrar perilinfangitis, endolinfangitis trombóticas o ambas. Esto mismo puede observarse en la serosa, donde es frecuente observar linfangitis y linfangiectasias pudiendo detectar la presencia de micobacterias en trombos en la luz de dichos vasos. En ovinos se ha observado que de acuerdo a la etapa de infección se presentan diferentes tipos de lesiones ya que en animales en etapas avanzadas el infiltrado celular se extiende en la capa muscular, mucosa y submucosa del íleon y esta compuesto por células epitelioides, células gigantes y macrófagos con escaso número de linfocitos y células plasmáticas, mientras que en estadios tempranos se aprecian predominantemente linfocitos y células plasmáticas con pocos macrófagos presentes. Por lo cual se sugiere que al encontrarse afectadas la mucosa y submucosa, con proporciones variables de células epitelioides, macrófagos, células plasmáticas y linfocitos ocurre una diferenciación de las lesiones en estadios tempranos y avanzados de la enfermedad. Aunque en adición a lo anterior se pueden sumar otros factores como la cepa de la micobacteria y la susceptibilidad del huésped a la misma, los cuales pueden jugar un papel importante en la variación de la presentación de las lesiones.⁽⁴⁷⁾

En cuanto a los linfonodos mesentéricos macroscópicamente se puede observar edema, incremento de tamaño, palidez y poca distinción corticomedular, siendo mas severamente afectados los asociados a la región ileocecal. En los ovinos y caprinos los vasos linfáticos pueden estar acordonados, así como con aspecto granular debido a los granulomas focales. Microscópicamente es posible apreciar un aumento

en el número de macrófagos, formando acúmulos granulomatosos, en la zona pericortical e infiltrándose en las áreas interfoliculares de la cortical, a lo largo de los senos subcapsulares y peritrabeculares,^(1,48) además de células epitelioides tanto en la corteza como en la médula conteniendo o no bacilos ácido alcohol resistentes.⁽⁸⁾

1.7. CLASIFICACION DE LAS LESIONES

Para facilitar la clasificación de lesiones desarrolladas por paratuberculosis, de acuerdo a lo descrito por Pérez⁽⁴⁹⁾ se deben de tomar en cuenta los siguientes parámetros: 1.Presencia de lesiones granulomatosas, 2.Asociación del granuloma con las placas de Peyer de la región ileocecal, 3.Localización del granuloma en la mucosa adyacente a las placas de Peyer, 4.Presencia de lesiones en áreas de la mucosa intestinal no relacionadas a las Placas de Peyer, 5.Intensidad y distribución (focal o difusa) de las lesiones; 6. Tipo de células presentes en las lesiones y 7. Presencia y número de micobacterias en las lesiones.

Lesión tipo I. Estas se caracterizan por ser lesiones focales, localizadas en el área interfolicular de las placas de Peyer, las lesiones están formadas por pequeños granulomas compuestos por células epitelioides y en algunos casos pequeños grupos de células con apariencia de macrófagos (con núcleo claro y alargado, con nucleolo evidente y citoplasma espumoso abundante, ligeramente teñido por H-E y algunas veces con vacuolas evidentes) las cuales son observadas en relación a los pequeños vasos de la submucosa asociada a las placas de Peyer, mostrando lesiones semejantes a vasculitis (en estas lesiones no se aprecia la presencia de bacilos). Los granulomas siempre son observados exclusivamente en tejido linfoide, siempre con relación a las placas de Peyer y ocasionalmente en los linfonodos regionales, principalmente en los linfonodos de la región ileocecal afectando la zona paracortical o interfolicular.

Lesión tipo II. Estas lesiones también son focales e involucran la zona basal de la lámina propia y las vellosidades, pero solo en áreas adyacentes a las placas de Peyer. Son lesiones bien delineadas de forma redonda y en número variable, nunca en número suficiente como para causar una enteritis difusa.

Estas lesiones no se observan en la mucosa cuando el tejido linfoide es ausente, aunque en ocasiones aparecen lesiones involucrando la mucosa aparentemente no relacionadas a tejido linfoide, sin embargo estas están estrechamente relacionadas con los límites de las placas de Peyer.

Los granulomas presentes en los linfonodos son muy parecidos a los encontrados en la lesión tipo I, pero son menos frecuentes en este sitio que en las placas de Peyer y siempre son de tamaño pequeño (no apreciándose en éstas lesiones la presencia de bacilos).

Lesión tipo III. Incluye a todas las lesiones granulomatosas extendidas en el intestino, independientemente del grado de la diseminación fuera del tejido linfoide y de la mucosa adyacente. Aquí se divide en tres subtipos:

Subtipo III a. Son lesiones granulomatosas multifocales siempre observadas en el íleon y menos constantemente en el yeyuno presentes en diferentes áreas de la lámina propia similares a las descritas en el tipo I y II, en el área basal de las vellosidades en las que ocasiona distensión de las mismas; las lesiones no están relacionadas al tejido linfoide principalmente con placas de Peyer (éstas son lesiones granulomatosas esporádicas). En la submucosa y serosa se observan focos con escasas células inflamatorias, algunos linfocitos y macrófagos, los cuales también se observan alrededor de los vasos sanguíneos adyacentes a éstas zonas. Los linfonodos afectados por éstas lesiones son principalmente los linfonodos caudales mesentéricos y en menor proporción los linfonodos ileocecales.

Subtipo III b. A este grupo pertenecen las lesiones granulomatosas difusas, con un gran número de macrófagos y células epitelioides amontonadas en la lámina propia, causando alargamiento y fusión de las vellosidades; esto genera que la mucosa tenga apariencia de mosaico. En la mucosa (relacionada o no relacionada a las placas de Peyer) se caracteriza por la presencia de una enteritis granulomatosa difusa, formada por un mosaico de macrófagos que le dan esta apariencia, por lo que la severidad de las lesiones es variable, pero en todos los casos la inflamación causa cambios en la morfología de las vellosidades intestinales y el área basal de la lámina propia. Las vellosidades intestinales se encuentran notablemente aumentadas y engrosadas y sus ápices tienen apariencia aplanada y ancha; en

algunas ocasiones las vellosidades pueden estar fusionadas. Estas lesiones contienen un gran número de bacilos en el citoplasma de los macrófagos; los macrófagos pueden involucrar la submucosa aumentando marcadamente su grosor, debido a la variación de la reacción de los agregados de éstas células, aunque también se pueden apreciar infiltrados compuestos por linfocitos y células plasmáticas. Cuando las células inflamatorias son escasas, éstas presentan distribución perivascular; cuando son abundantes los infiltrados celulares se extienden hasta la capa muscular. En las placas de Peyer afectadas por granulomas en el área interfolicular, tanto en los folículos como en los domos, ocurre una notable modificación de la estructura normal.

Los vasos linfáticos usualmente se encuentran afectados. En la serosa los linfáticos pueden presentar linfangitis y trombos, lo cual puede ser considerado como una lesión clásica de paratuberculosis. Los linfonodos mesentéricos e ileocecales pueden presentar linfadenitis granulomatosa difusa o focal con pérdida de su histología normal. Los senos subcapsulares usualmente se encuentran ocupados por un gran número de macrófagos.

Subtipo III c. Son lesiones granulomatosas difusas formadas por granulomas focales, células epitelioides y gran número de linfocitos y células plasmáticas alrededor de éste. En las placas de Peyer las lesiones son similares al subtipo II pero el tipo de células dentro del granuloma es diferente, ya que en este caso está compuesto por macrófagos picnóticos y células gigantes. En la mucosa intestinal (relacionada o no a placas de Peyer) se aprecia una enteritis difusa, siendo las células inflamatorias predominantes los linfocitos infiltrando el total de la lámina propia, las vellosidades y el área basal. Cuando los linfocitos y macrófagos se encuentran dispersos formando, o bien delineando un pequeño granuloma este puede contener de 20 a 25 células, aunque también puede haber muy pocas células plasmáticas. En la submucosa frecuentemente puede presentarse edema, con un variable número de linfocitos y células plasmáticas formando grupos. En la serosa los vasos linfáticos pueden presentar linfangitis y trombos, lo cual puede ser considerado como una lesión clásica de paratuberculosis.

Los linfonodos mesentéricos e ileocecales pueden presentar linfadenitis granulomatosa difusa o focal con pérdida de su histología normal.

Los senos subcapsulares usualmente se encuentran ocupados por un gran número de macrófagos. En los linfonodos se aprecian granulomas en el área interfolicular y paracortical. En este tipo de lesiones puede ser característica la presencia de células gigantes y algunas pueden contener más de 30 núcleos. En los granulomas, se pueden observar pequeños focos necróticos con o sin calcificación, éstos focos al parecer pueden estar asociados con necrosis de células gigantes. La presencia de bacilos en éstas lesiones pueden ser en pequeñas cantidades. Las lesiones macroscópicas suelen ser similares a las descritas en la lesión subtipo IIIb , pero en éste caso es más evidente el engrosamiento de la pared intestinal.⁽⁴⁹⁾

JUSTIFICACIÓN

Se ha especulado que la infección por Map en los rumiantes se produce primordialmente entre micobacterias procedentes de la misma especie animal. No obstante, algunos autores sugieren la posibilidad de infección interespecie de Map en aquellos lugares en donde dos o más especies de rumiantes llegan a compartir áreas comunes que faciliten su infección. El presente trabajo pretende establecer evidencia de la posible infección de Map origen caprino y ovino en cabritos, así como su evaluación lesional en fases tempranas.

HIPÓTESIS

Los cabritos inoculados con Map de origen caprino generan lesiones granulomatosas más severas con respecto a los cabritos infectados con Map de origen ovino.

OBJETIVO

Describir los hallazgos anatomopatológicos tempranos mediante la infección experimental de cabritos inoculados con Map de origen ovino y caprino.

JUSTIFICACIÓN

Se ha especulado que la infección por Map en los rumiantes se produce primordialmente entre micobacterias procedentes de la misma especie animal. No obstante, algunos autores sugieren la posibilidad de infección interespecie de Map en aquellos lugares en donde dos o más especies de rumiantes llegan a compartir áreas comunes que faciliten su infección. El presente trabajo pretende establecer evidencia de la posible infección de Map origen caprino y ovino en cabritos, así como su evaluación lesional en fases tempranas.

HIPÓTESIS

Los cabritos inoculados con Map de origen caprino generan lesiones granulomatosas más severas con respecto a los cabritos infectados con Map de origen ovino.

OBJETIVO

Describir los hallazgos anatomopatológicos tempranos mediante la infección experimental de cabritos inoculados con Map de origen ovino y caprino.

JUSTIFICACIÓN

Se ha especulado que la infección por Map en los rumiantes se produce primordialmente entre micobacterias procedentes de la misma especie animal. No obstante, algunos autores sugieren la posibilidad de infección interespecie de Map en aquellos lugares en donde dos o más especies de rumiantes llegan a compartir áreas comunes que faciliten su infección. El presente trabajo pretende establecer evidencia de la posible infección de Map origen caprino y ovino en cabritos, así como su evaluación lesional en fases tempranas.

HIPÓTESIS

Los cabritos inoculados con Map de origen caprino generan lesiones granulomatosas más severas con respecto a los cabritos infectados con Map de origen ovino.

OBJETIVO

Describir los hallazgos anatomopatológicos tempranos mediante la infección experimental de cabritos inoculados con Map de origen ovino y caprino.

MATERIAL Y METODOS.

2.0. Unidad Experimental.

Se utilizaron 28 cabritos machos destetados de 1 mes de edad, de las razas Saanen, Alpina y Toggenburg, provenientes de un rebaño (Celaya, Guanajuato) considerado libre de paratuberculosis, al no mostrar signos clínicos y presentar resultados negativos serológicos a IDGA.

Los animales fueron alojados en el CEPIPSA (Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal), perteneciente a la FMVZ, UNAM ubicado en Topilejo, D.F.

Los cabritos fueron colocados en dos corrales para posteriormente ser identificados y distribuidos en 3 grupos:

- Grupo A. 9 cabritos inoculados con micobacterias de origen caprino.
- Grupo B. 9 cabritos inoculados con micobacterias de origen ovino.
- Grupo C. 11 cabritos no inoculados, este fue el grupo testigo.

2.1. Preparación del inóculo.

A partir de rebaños ovinos y caprinos con sospecha clínica de paratuberculosis se realizaron pruebas serológicas de IDGA, dichos ovinos y caprino pertenecían al CEIEGT (Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical) y al CEPIPSA (Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal) (FMVZ-UNAM) respectivamente.

A partir de los casos seropositivos se procedió a realizar la necropsia para obtener muestras de intestinos con lesiones macroscópicas evidentes y sugestivas de la enfermedad y realizar estudios histopatológicos, empleando tinciones de hematoxilina-eosina (H-E) así como para la detección de bacilos ácido-alcohol resistentes (ZN). Posteriormente, de aquellos casos con presencia de abundantes bacilos ácido resistentes al estudio histopatológico, se procedió a la extracción de micobacterias de acuerdo a la técnica de purificación descrita por Ratnamohan y

Spencer (1989)⁽⁵⁰⁾ y obteniéndose 6.8×10^{14} bacterias por ml de origen caprino y 7.2×10^{15} bacterias por ml de origen. Se conservaron en congelación a -20°C hasta su utilización.

2.2. Inoculación experimental.

Para la realización de la inoculación se utilizaron micobacterias de origen ovino y caprino. En el grupo A se inoculó a cada cabrito la dosis de 3.3×10^{14} micobacterias de origen caprino, mientras que en el grupo B a cada animal se le administró una dosis de 5.6×10^{14} micobacterias de origen ovino. Para la aplicación del inóculo por vía oral, dichas dosis fueron divididas en tres tomas empleándose como vehículo leche ultrapasteurizada (Alpura), considerándose los días 0, 2 y 4 postinoculación. La dosis infectante para cada animal fue administrada en una suspensión de 15 ml de leche ultrapasteurizada, de tal manera cada día se administró 5 ml de la suspensión antes mencionada, empleando una jeringa estéril para cada animal y para cada día. Al grupo control solo le fue administrado leche ultrapasteurizada en la misma cantidad que a los grupos de estudio.

2.3. Inmunización.

Se realizó a los 13 días postinfección la inmunización de 5 animales de cada grupo elegidos aleatoriamente, utilizando 1 ml de bacterina de Map (Gudair, CZ Veterinaria, S.L., Pontevedra España) por vía subcutánea en la región axilar.

2.4. Estudio serológico.

Se procedió a la obtención de sangre mediante venopunción yugular de todos los animales de cada uno de los grupos empleando tubos estériles al vacío (Vacutainer, Becton Dickinson, N.J. U.S.A.) a los días 0, 13, 29, 116 y 182 postinoculación. Posteriormente a partir de los sueros se realizaron pruebas de IDGA (Inmunodifusión

en Gel de Agar) empleando antígeno protoplasmático PPA-3 (Lab. Allied Monitor Inc. Fayette, Missouri).

2.5. Intradermorreacción.

Se realizó la prueba de intradermorreacción (IDR) en el pliegue anocaudal en todos los animales a los 117 y 185 dpi, aplicando 0.1 ml de PPD-aviar (BIVE, Productora Nacional de Biológicos Veterinarios. México, D.F.) en el lado derecho y la misma cantidad de PPD-bovino (BIVE, Productora Nacional de Biológicos Veterinarios. México, D.F.) en el pliegue izquierdo. Previamente a la aplicación del biológico se procedió a la medición del grosor de la piel empleando para esto un Vernier y la lectura de ésta prueba se realizó a las 72 hrs de su aplicación. Se consideraron como positivos aquellos animales que presentaron un incremento en el grosor de la piel igual o mayor a 2 mm con respecto a la medición inicial.

2.6. Estudio anatomopatológico.

Para la realización del estudio macroscópico se realizó la selección aleatoria de 2 animales de cada grupo a los 120 y 188 días post-inoculación para su posterior sacrificio mediante sobredosis de anestesia con pentobarbital sódico, (Lab. Tomel, México, D.F.) por vía endovenosa. Durante el estudio postmortem, se tuvo especial énfasis en la revisión del intestino delgado.

2.7. Toma de muestras.

Para realizar el estudio histopatológico se consideró la toma de muestras sistemática independientemente de que mostraran lesiones de secciones de válvula ileocecal, íleon proximal con placa y sin placa de Peyer, íleon distal con placa y sin placa de Peyer, yeyuno proximal con placa y sin placa de Peyer, yeyuno medio con placa y sin placa de Peyer y yeyuno distal con placa y sin placa de Peyer, linfonodos mesentéricos ileocecales así como mesentéricos anterior, medio y distal.

Adicionalmente se tomaron muestras de otros órganos que mostraran cambios aparentes a la necropsia.

2.8. Procesamiento de las muestras.

Las muestras obtenidas se colocaron en frascos con formalina amortiguada al 10% en donde se mantuvieron por 24 horas, para ser procesadas para su inclusión en parafina, posteriormente fueron cortadas a 4 μm de espesor y teñidas con tinción de rutina Hematoxilina-Eosina y en algunos casos con Ziehl-Neelsen, para realizar su observación al microscopio de luz para la realización de la clasificación de las mismas, de acuerdo a la técnica empleada por Chávez.⁽⁵¹⁾

2.9. Inmunohistoquímica.

Con la intención de facilitar la observación de reacciones granulomatosas incipientes, de las lesiones observadas a través de la tinción de rutina a partir de cortes seriados empleando portaobjetos tratados con poli-L-lisina al 0.1% (Sigma Diagnostics Inc. St. Louis MO, USA) se procedió a marcar macrófagos empleando como anticuerpo primario anti-lisozima (Lab. BioGenex, Ca. U.S.A.) a una dilución de 1/ 50 mediante el sistema de Avidina Biotina Peroxidasa (ABC-P, Lab. Santa Cruz, Ca.). Como controles positivos se emplearon preparaciones de linfonodos mesentéricos y en los controles negativos se suprimió la adición del anticuerpo primario en la preparación.

2.10 Análisis estadístico.

La interpretación de los resultados obtenidos se realizó mediante análisis estadístico descriptivo.

RESULTADOS

Serología. Inmunodifusión en Gel Agar (IDGA)

Grupo A.

El día de la inoculación todos los animales de este grupo resultaron seronegativos., así como a los 13 dpi. A los 29 y 116 dpi siete animales resultaron seropositivos; cinco inmunizados (1, 3, 4, 5 y 6) y dos no inmunizados (8 y 9) correspondiéndose al 100% y 50% respectivamente. A los 182 dpi cinco animales resultaron seropositivos; cuatro inmunizados (1, 3, 4, 5) (80%) y un cabrito no inmunizado (2) (25%). **(Cuadro 1, Figura 1).**

Grupo B.

El día de la inoculación todos los animales de este grupo resultaron seronegativos, así como a los 13 dpi. A los 29 dpi cuatro animales (11, 14, 15, 16) resultaron seropositivos siendo éstos inmunizados (80%). A los 116 dpi seis animales resultaron seropositivos cuatro de estos inmunizados (14,15,16 y 18) que corresponden al 80% y 2 no inmunizados (13 y17) siendo el 50%. A los 182 dpi tres animales (14, 16, 18) resultaron seropositivos todos ellos inmunizados (60%). **(Cuadro 2).**

Grupo C.

El día de la inoculación todos los animales de este grupo resultaron seronegativos., así como a los 13 dpi. A los 29 dpi dos animales (20 y 27) resultaron seropositivos correspondiéndose a los inmunizados (33.3%). A los 116 dpi cuatro animales resultaron seropositivos tres de estos inmunizados (19, 28 y 29) (50%) y un animal no inmunizado (24)(20%). A los 182 dpi dos animales (20 y 28) resultaron seropositivos correspondiéndose a los inmunizados (33.3%). **(Cuadro 3).**

IDR. (Intradermorreacción)

Grupo A.

En el grupo A a los 120 dpi se obtuvo positividad para el PPD-aviar correspondiendo el 80% para los animales inmunizados y 33% para los no inmunizados, mientras que para el PPD-bovino se obtuvo 80% siendo éste de los cabritos inmunizados, no presentando respuesta en los cabritos no inmunizados.

A los 188 dpi para el PPD-aviar se observó 75% de positividad solo para los animales inmunizados; para el PPD-bovino 50% siendo de los animales inmunizados. **(Cuadro 4).**

Grupo B.

En este grupo se observó a los 120 dpi positividad solo para los animales inmunizados tanto en PPD-aviar como en el PPD-bovino siendo de 60% y 50% respectivamente; para los 188 dpi se obtuvo 66.6% de respuesta tanto para el PPD-aviar como para el PPD-bovino en los animales inmunizados y solo un 33.3% de respuesta al PPD-bovino en los cabritos no inmunizados. **(Cuadro 5).**

Grupo C.

Para dicho grupo a los 120 dpi se obtuvo 37.5% de animales positivos a PPD-aviar y PPD-bovino correspondiéndose estos porcentajes a los animales inmunizados **(Figura 2)** y a los 188 dpi se observó 60% de reactores positivos para PPD-aviar y PPD-bovino para los cabritos inmunizados y 20% para PPD-aviar en cabritos no inmunizados. **(Cuadro 6).**

Anatomía Patológica

A continuación se describen los hallazgos más relevantes a la necropsia y al estudio histopatológico en los diferentes grupos de estudio indicándose el tiempo de sacrificio.

Grupo A

Primer sacrificio (120 dpi)

◆ Cabrito 6 (inmunizado).

***Lesiones Macroscópicas.** Se observó ligero engrosamiento a nivel de la mucosa de íleon así como en algunas porciones del yeyuno. (**Figura 3**)

***Lesiones Microscópicas.** A nivel de la zona interfolicular y en la base del tejido linfoide correspondiente a la válvula ileocecal se apreciaron varios focos de reacción granulomatosa conformados por macrófagos y linfocitos (**Figuras 4 y 5**), observándose en algunas de éstas reacciones la presencia de células gigantes. *Enteritis granulomatosa multifocal (Lesión tipo II).*

◆ Cabrito 8 (no inmunizado).

***Lesiones Macroscópicas.** En algunas porciones de la mucosa de yeyuno e íleon se observaron estructuras blanquecinas en cantidad moderada de aproximadamente 1 mm de diámetro sugestivas de coccidias. Algunos linfonodos mesentéricos presentaron ligero aumento de tamaño, así como fusión de algunos de éstos.

***Lesiones Microscópicas.** A nivel de íleon se observó en folículo linfoide un foco de reacción granulomatosa constituido por macrófagos y algunos linfocitos entremezclados. *Enteritis granulomatosa focal (Lesión tipo I).*

Segundo sacrificio (188 dpi)

◆ **Cabrito 2 (no inmunizado)**

*Lesiones Macroscópicas. Se apreció discreto engrosamiento a nivel de placas de Peyer de íleon (**Figura 6**) y yeyuno, mientras que en otras áreas la presencia de algunos focos blanquecinos de 1 mm de diámetro a nivel de íleon como los descritos anteriormente. Los linfonodos mesentéricos se observaron ligeramente aumentados de tamaño algunos de éstos en la porción caudal se encontraron fusionados.

En los pulmones se observaron pequeñas áreas de consolidación compatibles con neumonía a nivel anterior ventral y con presencia de adherencias con cavidad torácica.

*Lesiones Microscópicas En la válvula ileocecal se observó la presencia de algunos focos de macrófagos y linfocitos entremezclados en cantidad abundantes en lámina propia sin relación a placa de Peyer. *Enteritis granulomatosa focal (Lesión tipo II)*.

En íleon se observó a nivel de la base de placa de Peyer un foco de reacción granulomatosa caracterizado por macrófagos y linfocitos entremezclados; en la porción apical de la lámina propia se observó dilatación de los vasos linfáticos, principalmente en aquellos que tienen relación con placa de Peyer. *Enteritis granulomatosa focal con linfangiectasia (Lesión tipo II)*. En dos secciones de yeyuno se observó en la base de las vellosidades la presencia de focos con escasos macrófagos con linfocitos y células plasmáticas entremezclados sin relación a placa de Peyer, así como dilatación de los vasos linfáticos en la porción apical de las vellosidades. *Enteritis granulomatosa multifocal con linfangiectasia (Lesión tipo IIIa)*.

En una sección de yeyuno se observó un foco de reacción granulomatosa conformado por macrófagos en la zona interfolicular. *Enteritis granulomatosa focal (Lesión tipo I)*.

En la sección de piel correspondiente al pliegue anocaudal se observó un infiltrado perianexal y perivascular en dermis, este infiltrado se encontraba compuesto por algunos macrófagos y linfocitos. Dermatitis linfocitaria perivascular y perianexal asociada a hipersensibilidad tipo IV. (**Figura 7**)

En pulmón a nivel de algunos bronquiolos en su luz se observó infiltrado por abundantes neutrófilos y congestión moderada difusa. Bronquiolitis supurativa discreta.

◆ **Cabrito 3 (inmunizado)**

*Lesiones Macroscópicas. En el íleon se observó engrosamiento moderado de la mucosa en algunas secciones. A nivel de yeyuno se apreció linfangiectasia en la serosa y engrosamiento discreto de la mucosa con escasos focos blanquecinos como los anteriormente mencionados. En el hígado se observó engrosamiento de la cápsula de un color blanquecino con la presencia en la zona de diversos puntos blanquecinos de 1 a 2 mm de diámetro aproximadamente.

*Lesiones Microscópicas. En válvula ileocecal e íleon se observó dilatación de los vasos linfáticos en la porción apical de las vellosidades, en ésta última sección se observó una reacción granulomatosa focal en la base de las vellosidades con relación a las placas de Peyer. *Enteritis granulomatosa focal (Lesión tipo II).*

En yeyuno se apreció una reacción granulomatosa focal tanto en la zona interfolicular como en asociación a la cúpula (**Figura 8**). *Enteritis granulomatosa focal (Lesión tipo I).*

Con relación a la cápsula hepática se observó un foco de reacción granulomatosa constituido por macrófagos y células gigantes. *Perihepatitis granulomatosa focal.*

En la porción de piel correspondiente al nódulo vacunal se observó la presencia de múltiples focos conformados por macrófagos y linfocitos con centro necrótico a nivel de la dermis, así como infiltrado mononuclear perivascular y perianexal en dermis superficial y profunda. *Dermatitis granulomatosa multifocal severa con áreas de necrosis.*

Grupo B

Primer sacrificio (120dpi)

◆ Cabrito 11 (inmunizado)

*Lesiones Macroscópicas. A nivel de la válvula ileocecal como en íleon se mostró un engrosamiento discreto de la mucosa intestinal. Los linfonodos mesentéricos presentaron incremento discreto en su tamaño y algunos de éstos estaban fusionados.

*Lesiones Microscópicas. En válvula ileocecal se apreció dilatación de vasos linfáticos en la porción apical de las vellosidades. *Linfangiectasia*.

A nivel de la zona interfolicular del íleon se presentó una reacción granulomatosa focal, así como dilatación de vasos linfáticos en la submucosa. *Enteritis granulomatosa focal (Lesión tipo I)*. A nivel de un espacio periportal se observó una reacción granulomatosa focal con participación de células gigantes y eosinófilos. *Hepatitis granulomatosa focal*.

◆ Cabrito 15 (inmunizado)

*Lesiones Macroscópicas. Se observó engrosamiento en la mucosa de la válvula ileocecal, parte del íleon adyacente a la válvula y una sección del yeyuno con engrosamiento discreto. A nivel de la región axilar se observó un nódulo de aproximadamente 5 x 2 x 1.5 cms (**Figura 9**), que al corte mostraba un centro de necrosis de aspecto blanquecino. (**figura 10**)

*Lesiones Microscópicas. En válvula ileocecal se observó a nivel de la submucosa un infiltrado por células plasmáticas, eosinófilos abundantes y polimorfonucleares, acompañados de vasos de neoformación y fibroblastos (tejido de granulación).

En íleon se observó dilatación de los vasos linfáticos en la lámina propia apical. *Linfangiectasia*. (**Figura 11**). Con relación al tejido linfoide de las placas de Peyer se observó tanto en la base de uno de los folículos linfoides (**Figura 12**) como a nivel de

la cúpula la presencia de focos de reacción granulomatosa conformados principalmente por macrófagos con infiltración de mononucleares entre éstos. ***Enteritis granulomatosa multifocal (Lesión tipo II).***

En piel de nódulo vacunal se apreciaron diversos focos que presentaban un centro necrótico rodeado por abundantes macrófagos, células gigantes y linfocitos a nivel de la dermis e hipodermis; alrededor de algunos vasos sanguíneos se apreció un infiltrado de células linfoides (**Figura 13**). ***Dermatitis granulomatosa multifocal severa.***

Segundo sacrificio (188dpi)

◆ Cabrito 13 (no inmunizado)

****Lesiones Macroscópicas.*** En yeyuno se observó dilatación de los vasos linfáticos en la subserosa y en la mucosa se apreciaron engrosamiento y congestión discretos de las placas de Peyer.

****Lesiones Microscópicas.*** En la válvula ileocecal se observó la presencia de grupos de macrófagos tanto en la base de los folículos como en la zona interfolicular. ***Enteritis granulomatosa multifocal (Lesión tipo I).*** En íleon con relación a placa se encontró dilatación de algunos vasos linfáticos en la porción apical de las vellosidades y en porciones de la mucosa sin relación a tejido linfoide se observó la presencia de acúmulos de macrófagos en la base de las vellosidades. ***Enteritis granulomatosa multifocal (Lesión tipo II).*** En yeyuno con relación a placa de Peyer se observó en la base de las vellosidades un grupo de macrófagos infiltrado por linfocitos y dilatación moderada de vasos linfáticos en la porción apical de las vellosidades. ***Enteritis granulomatosa focal (Lesión tipo I).***

◆ Cabrito 18 (inmunizado)

****Lesiones Macroscópicas.*** El íleon en la mayoría de la superficie de la mucosa se encontró engrosado y congestionado. Solo en algunas porciones del íleon se

observó engrosamiento moderado sobre placa de Peyer y éstas estaban más evidentes en la placa continua. En yeyuno sólo una pequeña porción distal se observó ligeramente más engrosada.

*Lesiones Microscópicas. En válvula ileocecal se observó dilatación de vasos linfáticos en la porción apical de las vellosidades, en otras áreas de la válvula ileocecal se observó la presencia de pequeños grupos de macrófagos en la lámina propia de la mucosa relacionada a placa de Peyer. *Enteritis granulomatosa focal (Lesion tipo II).*

En mucosa ileal relacionada a placa de Peyer se observó solo dilatación de vasos linfáticos en la porción apical de las vellosidades y edema en la lámina propia de las mismas vellosidades, mientras que en íleon sin relación a placa de Peyer se observó la presencia de un foco de macrófagos en la lámina propia infiltrados por algunos linfocitos por encima de las criptas intestinales. *Enteritis granulomatosa focal (lesion tipo II).*

El nódulo vacunal mostró una reacción granulomatosa multifocal a nivel de dermis con la presencia de de necrosis central. *Dermatitis granulomatosa multifocal.*

En piel de pliegue anocaudal a nivel de la dermis se observó una reacción linfocitaria perivascular moderada. *Dermatitis perivascular moderada.*

Grupo C (Testigo)

Primer sacrificio (120 dpi)

◆Cabrito 26 (inmunizado)

*Lesiones Macroscópicas. Se observó engrosamiento de la válvula ileocecal y del íleon, mientras que a nivel de íleon y yeyuno se encontraron algunos puntos blanquecinos sugestivos a nidos de esquizoontes por coccidias. Los pulmones se encontraron congestionados ligeramente, con discretas áreas de consolidación anteroventral sugestivas de bronconeumonía.

*Lesiones Microscópicas.

En íleon se observó infiltración difusa de eosinófilos en lámina propia y edema a nivel de subserosa. *Enteritis eosinofílica discreta.*

En yeyuno también se apreciaron focos granulomatosos a nivel de la mucosa en la base de las vellosidades con presencia de macrófagos y eosinófilos con presencia de esquizoontes en los enterocitos a nivel de las puntas de las vellosidades en cantidad moderada *Enteritis granulomatosa asociada a coccidias.*

En pulmón se encontró edema discreto, colapso de los espacios alveolares con presencia de polimorfonucleares en bronquiólos. *Bronconeumonía supurativa discreta.*

♦**Cabrillo 22 (no inmunizado)**

*Lesiones Macroscópicas. Se observó engrosamiento discreto de la válvula ileocecal como de la mucosa del íleon y yeyuno con la presencia de pequeños focos blanquecinos de aproximadamente 1 mm de diámetro los cuales se consideraron lesiones sugestivas a coccidias.

*Lesiones Microscópicas. En la válvula ileocecal, íleon y yeyuno se apreció reactividad de las criptas intestinales acompañada de un infiltrado a nivel de la lámina propia compuesto por eosinófilos, algunas células plasmáticas y linfocitos; así como edema a nivel de la submucosa.

También se observaron focos discretos de necrosis en la mucosa de la válvula ileocecal infiltrados por eosinófilos, éstos últimos asociados a la presencia de coccidias. *Enteritis eosinofílica discreta asociada a coccidias.*

Segundo sacrificio (188 dpi)

♦**Cabrillo 20 (inmunizado)**

*Lesiones Macroscópicas. En íleon y yeyuno se observaron algunos puntos blanquecinos de 1 mm de diámetro sugestivos coccidias. Se apreció en la región

axilar un nódulo correspondiente al sitio de aplicación del inmunógeno de aproximadamente 5 x 2 x 8 cm.

*Lesiones Microscópicas

En la válvula ileocecal y en yeyuno solo se observó edema discreto a nivel de la submucosa. En pulmón se encontró hemorragia y edema pulmonar discretos e hiperplasia linfoide peribronquiolar severa. En el nódulo vacunal se observó reacción granulomatosa difusa a nivel de la dermis con algunos centros de necrosis rodeados por células gigantes.

◆**Cabrito 24 (no inmunizado)**

*Lesiones Macroscópicas. Dilatación discreta de vasos linfáticos en la subserosa del intestino delgado.

*Lesiones Microscópicas. . En la válvula ileocecal, íleon y yeyuno se observó edema moderado en la lámina propia. En yeyuno y algunas porciones de íleon se observó dilatación moderada de los vasos linfáticos (linfangiectasia).

Inmunohistoquímica.

De cada uno de los grupos se realizó la selección de los cortes que mostraron lesiones granulomatosas incipientes para la detección de lisozima, apreciándose en algunos casos positividad muy marcada (**Figuras 14 y 15**) y en algunos otros con menor intensidad; sin embargo no fue posible encontrar reacción positiva en todos los cortes trabajados debido a que al realizar cortes seriados de las secciones ya no se encontraron lesiones evidentes, por lo que al realizar la IHQ para la detección de lisozima éstos casos fueron negativos.

CLASIFICACIÓN DE LAS LESIONES HISTOLÓGICAS ENCONTRADAS.

Grupo	Inóculo	No. Cabrito	Dpi	Localización (Diagnóstico morfológico)	Tipo de Lesión*
A	Map (Caprino)	6	120	VIC (EGM)	II
A	Map (Caprino)	8	120	I (EGF)	I
A	Map (Caprino)	2	188	VIC (EGF) I (EGFL) Y (EGML) Y (EGM)	II II IIIa I
A	Map (Caprino)	3	188	VIC (EGF) Y (EGF)	II II
B	Map (Ovino)	11	120	VIC (EGF)	I
B	Map (Ovino)	15	120	I (EGM)	II
B	Map (Ovino)	13	188	VIC (EGM) I (EGM) Y (EGF)	I II I
B	Map (Ovino)	18	188	VIC (EGF) I (EGF)	II II
C	Testigo	26	120	I (EEed) Y (EGap)	Nc Nc
C	Testigo	22	120	VIC (EEap)	Nc
C	Testigo	20	188	VIC (e) Y (e)	Nc Nc
C	Testigo	24	188	VIC (e) I (e) Y (e)	Nc Nc Nc

* (Pérez, et al, 1996)

VIC. Válvula ileocecal.

I. Íleon.

Y. Yeyuno.

EGF. Enteritis granulomatosa focal.

EGML. Enteritis granulomatosa multifocal con linfangiectasia.

EGFL. Enteritis granulomatosa focal con linfangiectasia.

EEed. Enteritis eosinofílica discreta.

EGM. Enteritis granulomatosa multifocal.

EGap. Enteritis granulomatosa asociada a parásitos.

EEap. Enteritis eosinofílica asociada a parásitos.

e. Edema

Nc. No clasificable

DISCUSIÓN

Con relación a la evaluación de la respuesta inmune humoral a través de IDGA a los días 0 y 13 pi en ninguno de los grupos evaluados se detectó una respuesta positiva, siendo estos resultados coincidentes con los mencionados por otros estudios ya que aunque los animales estaban infectados no se detecta la respuesta inmune humoral durante las dos primeras semanas postinfección.⁽⁵²⁾ Esto es debido a que la inmunidad inicial generada en paratuberculosis está dada principalmente por los linfocitos cooperadores de tipo 1 (Th1), por lo cual básicamente se inicia con una respuesta inmune de tipo celular, mientras que la respuesta inmune humoral es inhibida por las citocinas producidas por estos linfocitos y sólo se desarrolla al progresar la infección.⁽⁵³⁾

En los muestreos realizados posteriormente se observó que en el grupo A todos los cabritos inmunizados presentaron una respuesta serológica a partir de los 29 dpi y hasta los 182 dpi, Por su parte en el grupo B, la respuesta humoral positiva se presentó primordialmente en los inmunizados correspondiendo a 4 animales (80%). En el grupo C se apreció prácticamente una respuesta humoral en los cabritos inmunizados desde los 29 dpi (33.3%) que paulatinamente fue incrementándose a los 116 (50%) y 182 dpi (33.3%). El hecho de encontrar una respuesta humoral temprana coincide con lo mencionado en trabajos similares realizados por otros autores,^(54,55) quienes detectan una respuesta humoral temprana por efecto vacunal desde los 15 días post-inmunización con tendencia a incrementarse hasta los 120 días post-inmunización. Así mismo al comparar la respuesta de los animales infectados de los grupos A y B se observó una respuesta mayor en los animales pertenecientes al grupo A, desde los 29 dpi respuesta que se mantuvo a los 116 dpi con una ligera disminución a los 182 dpi, mientras que en el grupo B solo se detectó respuesta humoral a los 116 dpi, esta respuesta se sugiere se deba al efecto de infección en ambos grupos; estos resultados son similares a los descritos por otros autores, que indican respuesta humoral temprana desde los 35 dpi⁽⁵⁶⁾ y 56 dpi⁽⁵²⁾ para posteriormente incrementarse su respuesta, en estos trabajos también se emplea como inóculo

Map extraído directamente de mucosa; a diferencia de lo anteriormente mencionado otros investigadores detectan la presencia de anticuerpos en suero a los 90 dpi⁽⁵⁴⁾ o incluso a los 168 dpi,⁽⁵⁷⁾ quienes utilizan como inóculo Map obtenido mediante cultivo en medios artificiales; posiblemente esta diferencia explique la respuesta inmune humoral más temprana, debido a que al pasar por medios artificiales de cultivo exista una atenuación de las bacterias en comparación a la respuesta de los animales infectados también experimentalmente con inóculo obtenido directamente de la mucosa.⁽⁵¹⁾

Por otra parte, la mayor respuesta de anticuerpos en los cabritos inoculados con Map de origen caprino (grupo A), pudiera deberse a que fueron infectados con Map del mismo origen animal a diferencia de los cabritos del grupo B que fueron inoculados con Map de origen ovino. Así también, el haber detectado una mayor respuesta en los animales inmunizados e infectados en los grupos A y B puede explicarse al efecto del inmunógeno como ya ha sido descrito por otros autores.⁽⁵⁴⁾

Por su parte, en aquellos cabritos del grupo C que no fueron infectados, ni inmunizados se observó serología positiva en un solo animal a los 116 dpi, este resultado puede deberse a que pudo existir la presencia en este cabrito de otras bacterias con semejanza antigénica como son *Actinomyces pyogenes*, *Nocardia* spp u otras micobacterias saprofitas.⁽⁵³⁾

En los resultados referentes a la evaluación de la respuesta inmune celular a través de intradermorreacción (IDR) utilizando Derivado Proteico Purificado Aviar (PPD-A) y Derivado Proteico Purificado Bovino (PPD-B) se observó en los grupos A y B una mayor reactividad a la prueba a los 120 dpi, siendo que para el grupo A la respuesta al PPD-aviar y al PPD-bovino fue igual en el caso de los animales inmunizados (80%), mientras que para los no inmunizados solo se obtuvo respuesta positiva al PPD-aviar (33%); mientras que en el grupo B se obtuvo una diferencia discreta entre las respuestas al PPD-aviar (60%) y el PPD-bovino (50%) para los cabritos inmunizados, siendo positivo para PPD-b para un cabrito (33%) a los 188 dpi.. Por su parte en el grupo testigo (Grupo C) solo se obtuvo respuesta en el caso de los animales inmunizados siendo igual la reacción en el caso del PPD-aviar y el PPD-bovino (100%).

Estos hallazgos muestran semejanzas con lo reportado por García Marín, et al (1999)⁽⁵⁵⁾ y Domínguez (2000)⁽⁵⁸⁾ quienes mencionan en el caso de los primeros autores que la respuesta celular de los cabritos inmunizados es mayor a los 120 dpi, con respecto a la que se observa a los 350 dpi, mientras que el otro investigador encuentra una respuesta similar al observar una respuesta inmune celular mas fuerte en fases tempranas postinmunización para posteriormente mostrar una disminución en su respuesta a partir de los 150 dpi; esto posiblemente explique que la respuesta detectada a los 188 dpi mostrara una tendencia a disminuir con respecto a la primera prueba, indicando posiblemente el descenso de la respuesta inmune celular (RIC). Sin embargo, en la prueba realizada el día 188, el número de animales con un incremento en el grosor de la piel fue menor, así como la intensidad de las respuestas, tanto en cabritos infectados e inmunizados como en los no inmunizados, lo cual de acuerdo a lo descrito anteriormente, parece ser que la respuesta se debe más al efecto de la vacuna que a la infección, pues los animales inmunizados correspondientes al grupo testigo fueron los que mayor respuesta presentaron. Gwózdź et al, (1999)⁽⁵⁹⁾ encontraron que el incremento de la respuesta celular en animales infectados experimentalmente se iniciaba de manera leve a partir de los 126 dpi, aunque otros autores como Karpinski, et al, (1975)⁽³¹⁾ detectaron reacciones discretas desde los 56 y hasta los 112 dpi manteniéndose hasta los 365 dpi, con posterior tendencia a disminuir gradualmente.

Con relación a los hallazgos anatomopatológicos en los animales de estudio se observaron lesiones en los animales infectados de los grupos A y B, se destaca que los hallazgos más relevantes fueron a nivel histológico ya que macroscópicamente no se observaron lesiones sugestivas a paratuberculosis. A partir de los 120 dpi las lesiones granulomatosas primordialmente se localizaron en íleon distal y en la válvula ileocecal, siendo muy similares en ambos grupos. El hecho de que se hayan encontrado lesiones en etapas tempranas a la infección está relacionado con lo descrito por otros autores^(29,32,54) quienes mencionan que en etapas tempranas es difícil encontrar lesiones macroscópicas evidentes, observándose solo en algunos casos un ligero aumento de tamaño de los

linfonodos mesentéricos y engrosamiento moderado de la mucosa intestinal, aunque histológicamente se pueden observar áreas de reacción granulomatosa asociadas a tejido linfoide en intestino delgado a partir de los 120 dpi independientemente de la ruta de inoculación de Map; adicionalmente se observa la presencia de macrófagos conteniendo bacilos ácido alcohol resistentes (baar) siendo éstos detectados entre los 120 y 240 dpi. En contraste con esto último, en el presente estudio no se encontraron baar en las lesiones histológicas como también se describe en otros trabajos.^(54,56)

Con respecto a la localización de las lesiones en este trabajo se apreciaron primordialmente en válvula ileocecal e íleon distal como lo describen otros autores en periodos similares post-infección.^(29,54) Sin embargo éstos hallazgos contrastan con los reportados por Chávez, et al (1992)⁽⁵⁶⁾ en donde se menciona la presencia de lesiones granulomatosas focales en la zona interfolicular de las placas de Peyer siendo más frecuentemente halladas en yeyuno que en íleon, lo cual nos hace pensar en la posibilidad de que exista diferencia debido a las dosis utilizadas, así como a otros factores como la virulencia del inóculo, origen del mismo obteniéndose por cultivo o por raspado intestinal o bien ya sea por la susceptibilidad de cada individuo. Estos hallazgos de lesiones tempranas fueron más evidentes en los cabritos inmunizados de los grupos A y B en donde se aprecia que en los inmunizados se encontraron lesiones desde los 120 dpi, siendo éstas tipo II en su mayoría mientras que en los no inmunizados se encontraron lesiones tipo I principalmente; lo cual coincide con lo descrito por Juste, et al, (1994)⁽⁵⁴⁾ en cuyo trabajo de investigación con corderos inmunizados y no inmunizados, ya que el menciona que aunque desde los 45 dpi se aprecian lesiones, es en el día 120 dpi en donde se observan lesiones granulomatosas bien definidas con mayor superficie de extensión en los animales inmunizados con relación a los no inmunizados. Al igual que Juste⁽⁵⁴⁾ otros autores como Nisbet, et al, (1962)⁽³⁰⁾ describen lesiones similares a las encontradas en este estudio a los 120 dpi donde los animales inmunizados mostraban mayores lesiones con respecto a aquellos infectados, esto podría deberse a que la inmunización incrementa la respuesta celular en estos animales facilitando el desarrollo de la

reacción inflamatoria granulomatosa, pudiendo ser esto un intento de contener el proceso infeccioso por Map. Contrariamente, a los 188 dpi en los grupos A y B se pudieron encontrar lesiones macroscópicas más evidentes de infección por Map, e histológicamente se encontraron lesiones granulomatosas más severas no solo en la válvula ileocecal e íleon con placa de Peyer, sino también con extensión a yeyuno con placa de Peyer encontrándose en éstos casos lesiones mas desarrolladas, siendo éstas lesiones más evidentes (IIIa) en el grupo A inoculado con Map de origen caprino; sin embargo para el grupo B inoculado con Map de origen ovino también se encontraron lesiones aunque menos severas, lo cual apoya la posibilidad de generación de infecciones interespecies tal y como lo sugiere Saxegard (1990).⁽²²⁾

El tipo de lesiones encontradas a los 188 dpi, coinciden con las observadas por Nisbet, et al, (1962)⁽³⁰⁾ y Juste et al (1994)⁽⁵⁴⁾ a los 220 dpi, quienes mencionan que se presentan lesiones mas graves en los animales infectados en comparación con aquellos infectados e inmunizados. Por lo cual podemos sugerir que las diferencias encontradas entre los animales inmunizados y no inmunizados podría deberse al efecto de protección de la vacuna, planteándose un mayor desarrollo de las lesiones en los animales infectados al extenderse a otras secciones del intestino delgado y en los cuales no existió una mayor estimulación de la respuesta inmune celular.

En el caso de los resultados de inmunohistoquímica se observó que en algunos casos la reacción fue claramente positiva, sobre todo en los casos de las lesiones mas desarrolladas (lesiones tipo II y IIIa) mientras que en otros casos la reacción fué incipiente lo cual puede explicarse a que la lisozima está relacionada con la madurez fagocítica de los macrófagos, por lo que en los macrófagos los gránulos lisosomales poseen una función digestiva durante la etapa de maduración celular en la cual se incrementa el número de lisosomas y por tanto las enzimas lisosomales, por lo que la lisozima se secreta de manera continua y es la encargada de regular la digestión de la pared celular de algunas bacterias; sin embargo algunas micobacterias sobreviven a la exposición de las enzimas lisosomales debido a la resistencia de su pared celular.⁽⁶⁰⁾

Lo anterior nos hace pensar en la posibilidad de que los macrófagos generan una respuesta positiva clara al encontrarse en su etapa madura y con actividad fagocítica constante, mientras que aquellos que generaron una tinción tenue posiblemente aún no se encontraban maduros o posiblemente su capacidad fagocítica y digestiva estaba en fase de declinación, sin embargo en todos éstos casos, no se pudo confirmar la presencia de baar en el interior de los macrófagos mediante la tinción de Zielh-Neelsen ya que posiblemente las micobacterias se encontraban como esferoplastos y debido a ello no presentan las características estructurales y bioquímicas de la pared para retener el colorante de la tinción, aunque esto no significa que su capacidad inmunogénica este anulada, ya que en los animales con presencia de lesiones se llegó a detectar una respuesta positiva en IDGA e IDR, aunque las micobacterias no fueran observables, esta característica defectiva de la pared celular de la micobacteria le confiere además una herramienta muy útil para generar una pobre actividad quimiotáctica y por lo tanto resistencia a la fagocitosis por largos periodos de tiempo tal y como lo menciona Chiodini et al, (1996).⁽¹¹⁾

Finalmente, si bien estos resultados corresponden a hallazgos tempranos de infección por Map, podemos destacar el hecho de que en los cabritos infectados con Map de origen caprino se observaron mayores lesiones y respuesta inmunológica que en los cabritos inoculados con Map de origen ovino sugiriendo la posibilidad de infecciones interespecies también indica que la infección de Map del mismo origen animal pudiera facilitar el desarrollo de la infección. Así mismo, la diferencia en cuanto a las lesiones entre los animales infectados con aquellos infectados e inmunizados podría deberse a diferentes fases de la regulación de la respuesta inmune celular que tuvieran como objetivo el control de las lesiones y así evitar la manifestación de los signos clínicos de la enfermedad como ha sido observado en estudios de control de paratuberculosis mediante esquemas de inmunización. Aunque estas evidencias sugieren lo anteriormente expuesto es necesario continuar con estudios similares en periodos mas largos de observación al tratarse de una enfermedad de curso crónico.

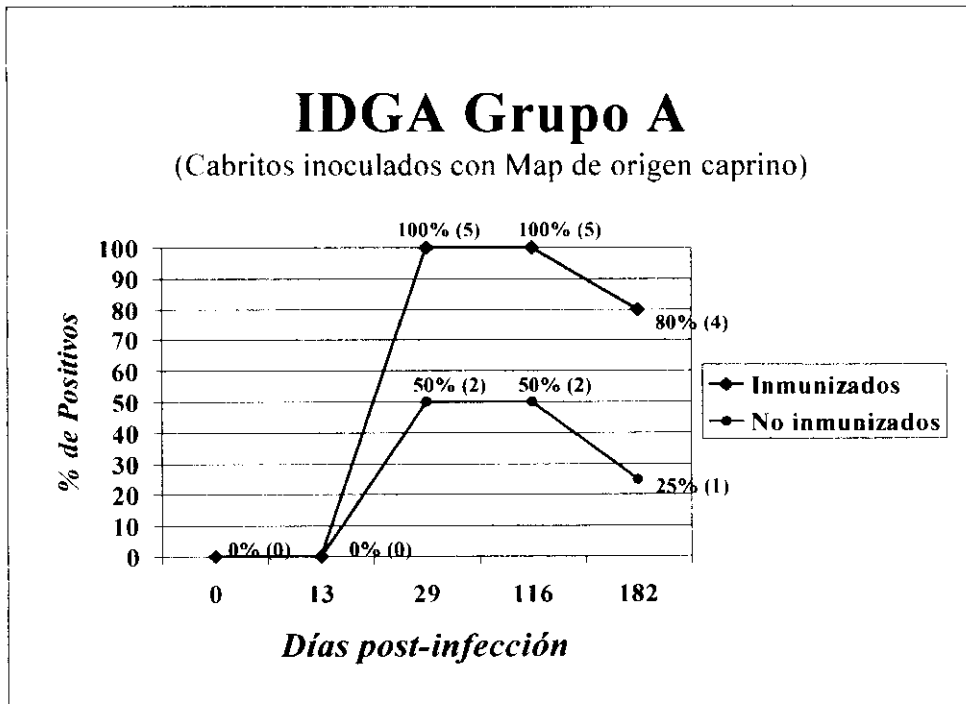
LITERATURA CITADA

1. Chiodini RJ, Van Kriuningen HJ, Merkal RS.: Ruminant paratuberculosis (Johne's disease) the current status and future prospects. *Cornell Vet* 1984; 74:218-269.
2. Ramírez C, Trigo E, Suárez F.: Aislamiento e identificación de *Mycobacterium paratuberculosis* en México. *Técnica Pecuaria México* 1979; 36: 74-75.
3. Beeman K, Huber B and Leopold H.: Johne's diseases (Paratuberculosis) in sheep. *The Compendium* 1989; 11: 1415-1422.
4. Clarke CJ.: The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminant and other species. *Journal Comp Pathol* 1994; 110: 185-194.
5. Juste RA.: Paratuberculosis: Una revisión. *Med Vet.* 1984; 197-210.
6. Seltz S, Heider L, Heston W, Bech NS, Rings M and Spanglet L.: Bovine fetal infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. *JAVMA* 1989; 194: 1423-1426.
7. Buergelt C.D, Hall C, McEntee K and Duncan J.R.: Pathological evaluation of paratuberculosis in naturally infected cattle. *Vet. Pathol* 1978; 15:196-207.
8. Bernabé A, Gómez M.A., Navarro J.A., Gómez S, Sánchez J, Sidrach J and Menchen V.: Pathological changes of spontaneous dual infection of tuberculosis and paratuberculosis in goats. *Small Animal Research.* 1991; 5: 377-390.
9. Collins M.: Clinical approach to control of bovine paratuberculosis. *JAVMA* 1994; 204: 208-210.
10. Whitelock RH and Buergelt C.: Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *Vet Clin North Am* 1996; 12: 345-356.
11. Chiodini RJ.: Immunology: Resistance to paratuberculosis. *Vet. Clin. of North Am: Food Animal Practice.* 1996;12:313-343.
12. García Marín JF, Pérez V, Luco DF, Badiola JJ.: Relationship among pathology and serology in the diagnosis and evaluation of ovine paratuberculosis. *The Paratuberculosis Newsletter* 1993; 5: 62-68.
13. Vélez Hernández M. E.: Comparación de diferentes técnicas de diagnóstico de paratuberculosis caprina. (*Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*). (Tesis de Maestría) U.N.A.M. F.M.V.Z. México, D.F. 1998.
14. Thoen C and Moore L.: Current knowledge no paratuberculosis. *JAVMA* 1988; 36: 74-75.
15. Hutchinson LJ.: Economic impact of paratuberculosis. *Vet Clin North Am* 1996; 12: 373-382.
16. Riemann HP and Abbas B.: Diagnosis and control of bovine paratuberculosis (Johne's disease). *Adv Vet Sci Comp Med* 1997; 327: 481-506.
17. Shaik van G and Kalis CH.: Cost-benefit analisis of vaccination against paratuberculosis in dairy cattle. *Vet Rec* 1996; 139: 624-627.
18. Wilson D, Rossiter CA, Han HR and Sears PM.: Financial effects of *Mycobacterium paratuberculosis* on mastitis culling and milk production in clinically normal dairy cattle. *Proceedings of the Fifth International Colloquium on Paratuberculosis* 1996 September 27- October 4 Madison USA. 1996: 119-120.

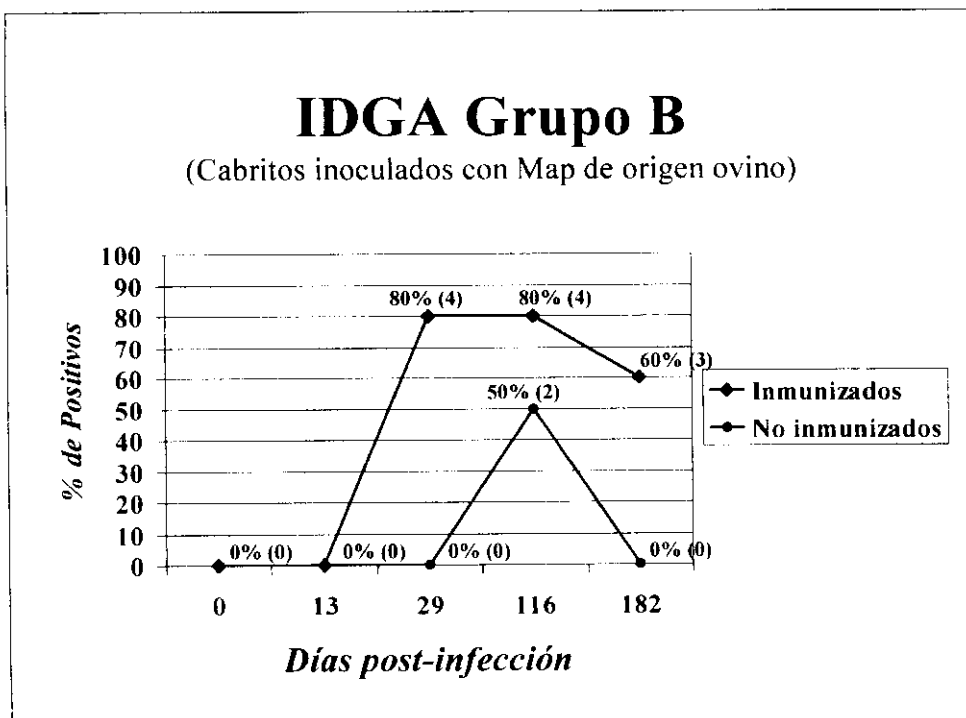
19. Colgrove G, Thoen C, Blackburn B and Murphy C.: Ruminant paratuberculosis in cattle: A comparison of three serologic tests with results of fecal culture. *Vet Microbiol* 1989; 19: 183-187.
20. Cranwell MP.: Control of Johne's disease in a flock of sheep by vaccination. *Vet Rec* 1993; 133: 219-220.
21. Thoresen O and Eversen O.: Comparison of immunochemistry acid fast staining and cultivation for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in goats. *J Vet Diag Invest* 1994; 6: 195-199.
22. Saxegaard F and Fodstad FH.: Control of paratuberculosis (Johne's disease) in goats by vaccination. *Vet Rec* 1990; 116: 439-441.
23. Pérez V, García Marín JF and Badiola JJ.: Pathological features in sheep naturally infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Med Vet* 1992; 9: 119-120.
24. Van Kruiningen HJ, Ruiz B and Gumprecht L.: Experimental disease in young chickens induced by a *Mycobacterium paratuberculosis* isolate from a patient with Crohn's disease. *Can.J.Vet.Res.* 1991; 55: 199-202.
25. Larsen Aubrey B.: Experimental *Mycobacterium paratuberculosis* infections in chickens. *Am.J.Vet.Res* 1972; 33: 1231-1235.
26. Valente C., Cuteri V., Quondam GR., Gialletti L and Franciosini MP.: Use of an experimental chicks model for paratuberculosis enteritis (Johne's disease). *Vet.Res.* 1997; 28: 239-246.
27. Hirsch Ann.: Infection of hamsters and rabbits with *Mycobacterium johnei*. *J.Comp. Path.* 1956; 66: 260-269.
28. Mokresh AH and Butler DG.: Granulomatous enteritis following oral inoculation of Newborn rabbits with *Mycobacterium paratuberculosis* of bovine origin. *Can J Vet Res* 1990; 54: 313-319.
29. Kluge J.P, Merkal R.S, Monlux W.S, Larsen A.B, Kopecky K.E, Ramsey F.K. and Lehman R.P.: Experimental paratuberculosis in sheep after oral, intratracheal, or intravenous inoculation: Lesions and demonstration of etiologic agent. *Am.J. Vet. Res.* 1968; 29: 953-963.
30. Nisbet D.I., Gilmour N.J.L. and Brotherson J.G.: Quantitative studies of *Mycobacterium johnei* in tissues of sheep. III. Intestinal histopathology. *J. Comp. Path.* 1962; 72: 80-91.
31. Karpinski T, Zorawski C.: Experimental paratuberculosis of sheep. I. Clinical, allergical, bacteriological and post-mortem examinations. *Bull.Vet. Inst. Pulawy* 1975; 19: 59-63.
32. Larsen A.B., Miller J.M. and Merkal R.S.: Subcutaneous exposure of calves to *Mycobacterium paratuberculosis* compared with intravenous and oral exposures. *Am. J. Vet. Res.* 1977; 38: 1669-1671.
33. Sweeney RW, Whitlock RH, Hamir AN, Rosenberger AE and Herr SA.: Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* after oral inoculation in uninfected cattle. *Am.J.Vet.Res.* 1992; 53; 1312-1314.
34. Wilson Taylor A.: Experimental Johne's disease in cattle. *J.Comp.Path.* 1953; 63: 355-367.
35. Wilson Taylor A.: The experimental infection of cattle with varieties of *Mycobacterium johnei* isolated from sheep. *J.Comp.Path.* 1953; 63: 368-373.

36. Rankin Deans J.: The experimental infection of cattle with *Mycobacterium johnei*. I. Calves inoculated intravenously. J.Comp.Path. 1958; 68: 331-337.
37. Rankin Deans J.: The experimental infection of cattle with *Mycobacterium johnei*. II. Adult cattle inoculated intravenously. J.Comp. Path. 1961; 71: 6-9.
38. Cocito C, Gilot P, Coene M, Dekesen M, Poupart P and Vannuffel P.: Paratuberculosis. Clin Microbiol Rev 1994; 17: 328-345.
39. Smith K.: Electron microscopic observations on *Mycobacterium johnei*. Res Vet Sci 1969; 10: 1-3.
40. Lambrecht R and Collins M.: *Mycobacterium paratuberculosis*. Factors that influence micobactin dependence. Diagn Microbiol Infect Dis 1992; 15: 239-246.
41. Sweeney RW.: Pathogenesis and Immunology of paratuberculosis. Proceedings of the Fifth International Colloquium on Paratuberculosis; 1996 September 29-October 4; Madison, USA. Chiodini R J, Hines M E, Collins M T editors, 1996: 296-298.
42. Hietela SK.: The options in diagnosing rumian paratuberculosis. Vet Med 1992; November: 1122-1139.
43. Barman N.: Gut immunology a review. Indian J. Comp. Microbiol. Immunol. Infect. Dis. 1996;17,1.
44. Momotani E, Whipple E, Thleermann A and Cheville N.: Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches in calves. Vet Path 1988; 25: 131-137.
45. Edwards D and Kirkpatrick C.: The immunology of mycobacterial diseases. Am Rev Resp Dis 1986; 134: 1062-1071.
46. Sweeney RW.: Transmission of paratuberculosis. Vet Clin North Am 1996; 12: 305-312.(a)
47. Rajya B.S, Singh CM.: Studies on the pathology of Jhone's disease in sheep. III. Pathologic changes in sheep with naturally occurring infections. Am. J. Vet. Res. March 1961; 189-202.
48. Hines S, Buergelet C, Wilson J and Bliss E.: Disseminated *Mycobacterium paratuberculosis* infection in a cow. JAVMA 1987; 15: 681-683.
49. Pérez V, García Marín JF and Badiola JJ.: Description and classification of different types of lesion associated with natural paratuberculosis infection in sheep. J. Comp. Path. 1996; 114: 107-122.
50. Ratnamohan TN, Spencer TL.: A technique for purification of *Mycobacterium paratuberculosis* from the illeal mucosa of infected cattle. Aust.Vet.J. 1985; 63: 185-187.
51. Chávez GG, García Marín JF, Aduriz G, Moreno B, Gutiérrez M and Badiola JJ.: Preliminary results of comparative study or early response to *M. avium* and *M. paratuberculosis* in experimentally infected lambs. Medicina Veterinaria 1992; 9, 16-18.
52. Merkal RS and Larsen AB.: Experimental paratuberculosis in sheep after oral, intratracheal or intravenous inoculation: Serologic and intradermal tests. Am.J.Vet. Res. 1968; 29; 5, 953-963.
53. Clarke CJ.: The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminant and other species. Journal Comp Pathol 1997; 116: 217-261.

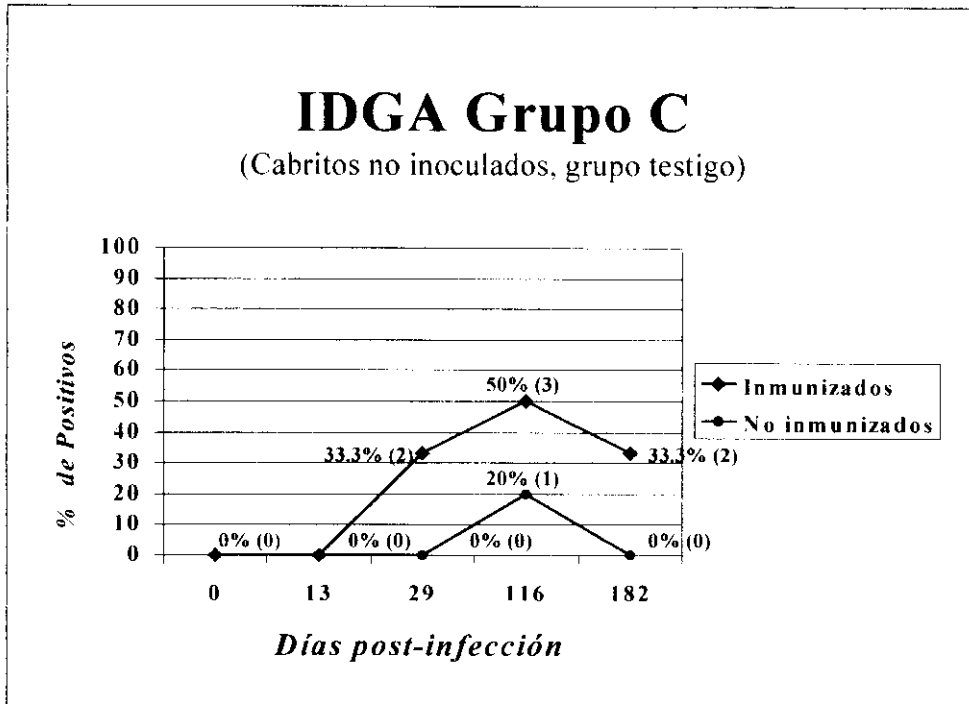
54. Juste RA, García Marín JF, Peris B, Saez de O, Badiola JJ.: Experimental infection of vaccinated and non vaccinated lambs with *Mycobacterium paratuberculosis*. *J Comp Pathol* 1994; 110: 185-194.
55. García Marín JF, Tellechea J, Gutiérrez M, Pérez V and Juste R.: Paratuberculosis vaccination in sheep modifies and limits the development of lesions. *Proceedings of the fifth International Colloquium on Paratuberculosis*. Madison, WS, USA 1999.
56. Chávez GG.: Estudio comparativo de las lesiones y de la respuesta inmunológica observada en corderos infectados experimentalmente con *Mycobacterium paratuberculosis* y *Mycobacterium avium* subsp *silvaticum*. (Tesis Doctoral). Universidad de Zaragoza 1993, Zaragoza, España.
57. Goudswaard J and Terporten-Pastors WWM.: Johne's disease in goats, comparison of serological tests. *Neth. J. Vet. Sci.* 1972; 4, 93-112.
58. Domínguez Punaro MC.: Características anatomopatológicas, hallazgos bacteriológicos y respuesta inmune posteriores a un año de la inmunización de un rebaño caprino con antecedentes de paratuberculosis (Tesis de Maestría) U.N.A.M. F.M.V.Z., México D.F. 2000.
59. Gwózdź JM, Manketlow BW, Murray A, West DM and Thompson KG.: Vaccination against paratuberculosis of lambs already infected experimentally with *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*. *Proceedings of the sixth International Colloquium on Paratuberculosis*. 1999. February 14-18, 630-632 Melbourne, Australia.
60. Lewis CE and McGee JO.: *The natural immune system. The Macrophage*. Oxford University Press 1992.



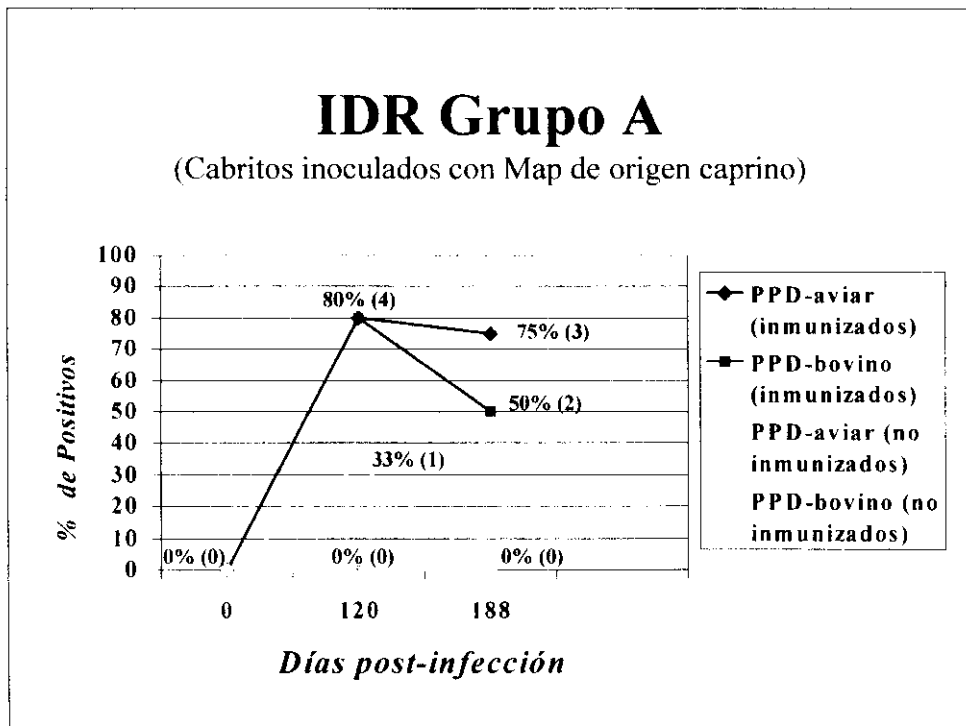
Cuadro 1. Comportamiento de la respuesta inmune humoral (RIH) del Grupo A en la prueba serológica de Inmunodifusión en Gel de Agar (IDGA), empleando el antígeno protoplásmico PPA-3.



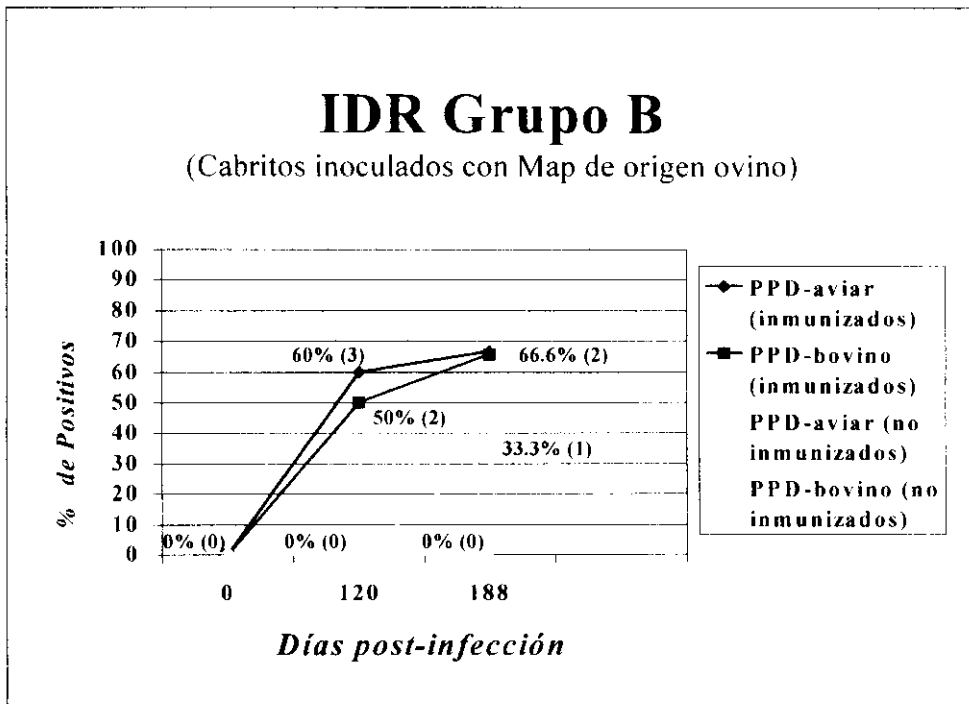
Cuadro 2. Comportamiento de la respuesta inmune humoral (RIH) del Grupo B en la prueba serológica de Inmunodifusión en Gel de Agar (IDGA), empleando el antígeno protoplásmico PPA-3.



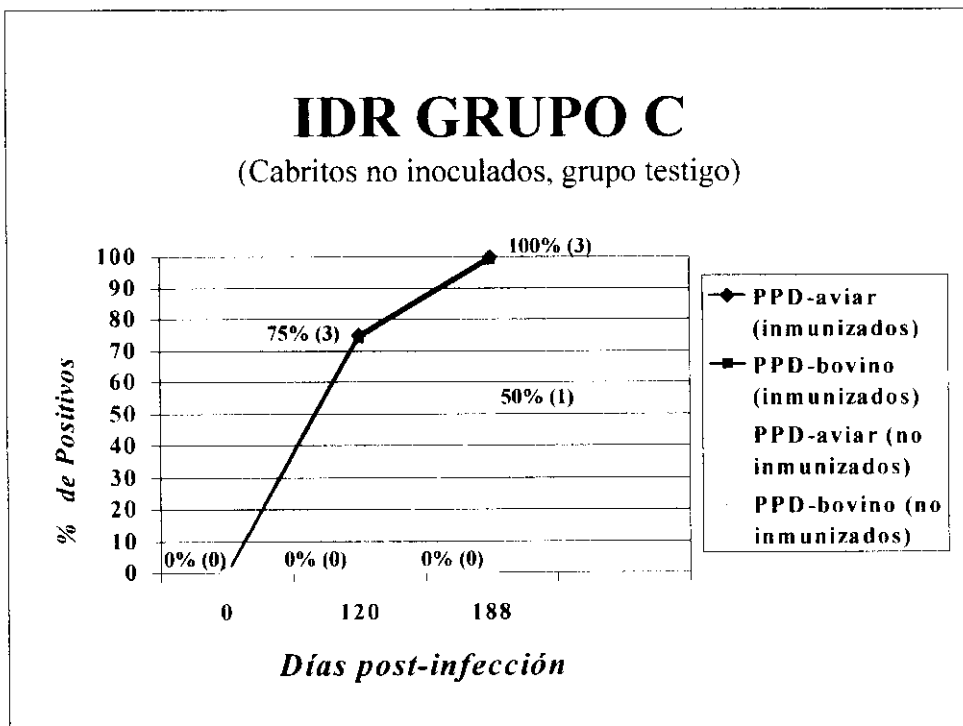
Cuadro 3. Comportamiento de la respuesta inmune humoral (RIH) del Grupo C en la prueba serológica de Inmunodifusión en Gel de Agar (IDGA), empleando el antígeno protoplásmico PPA-3.



Cuadro 4. Comportamiento de la respuesta inmune celular (RIC) del Grupo A en la prueba de intradermorreacción (IDR), empleando los Derivados Proteicos Purificados Aviar (PPD-a) y Bovino (PPD-b).



Cuadro 5. Comportamiento de la respuesta inmune celular (RIC) del Grupo B en la prueba de intradermorreacción (IDR), empleando los Derivados Proteicos Purificados Aviar (PPD-a) y Bovino (PPD-b).



Cuadro 6. Comportamiento de la respuesta inmune celular (RIC) del Grupo C en la prueba de intradermorreacción (IDR), empleando los Derivados Proteicos Purificados Aviar (PPD-a) y Bovino (PPD-b).

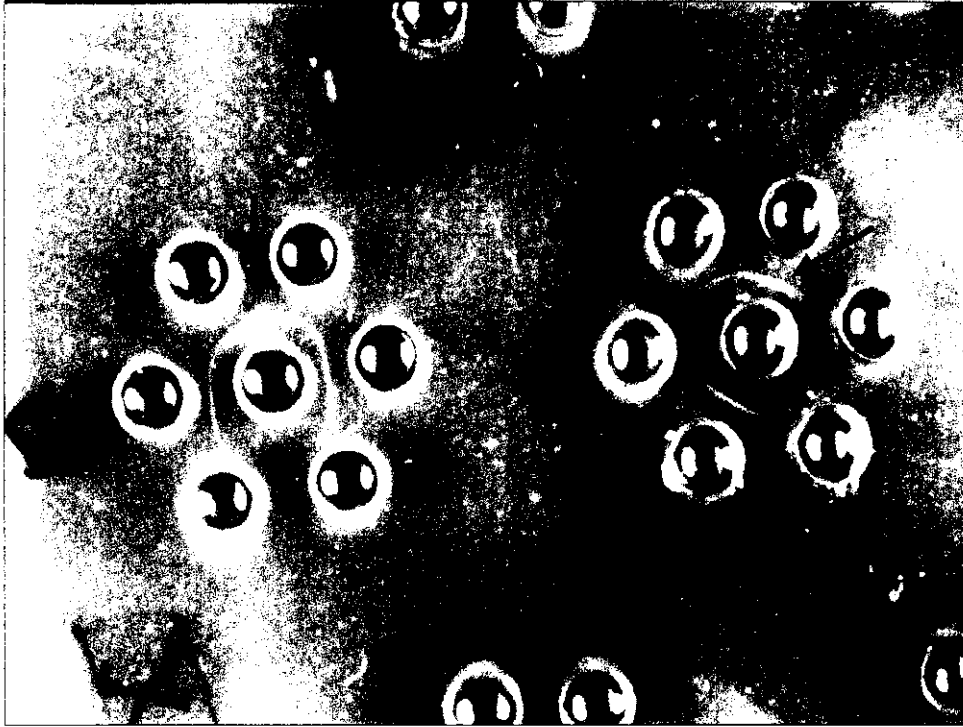


Figura 1. Bandas de inmunoprecipitación (→) indicando reacción positiva en la prueba de IDGA, empleando el antígeno PPA-3.



Figura 2. Mayor reacción a IDR en pliegue anocaudal empleando PPD-aviar comparado con PPD-bovino. Cabrito No. 20 (188 dpi)

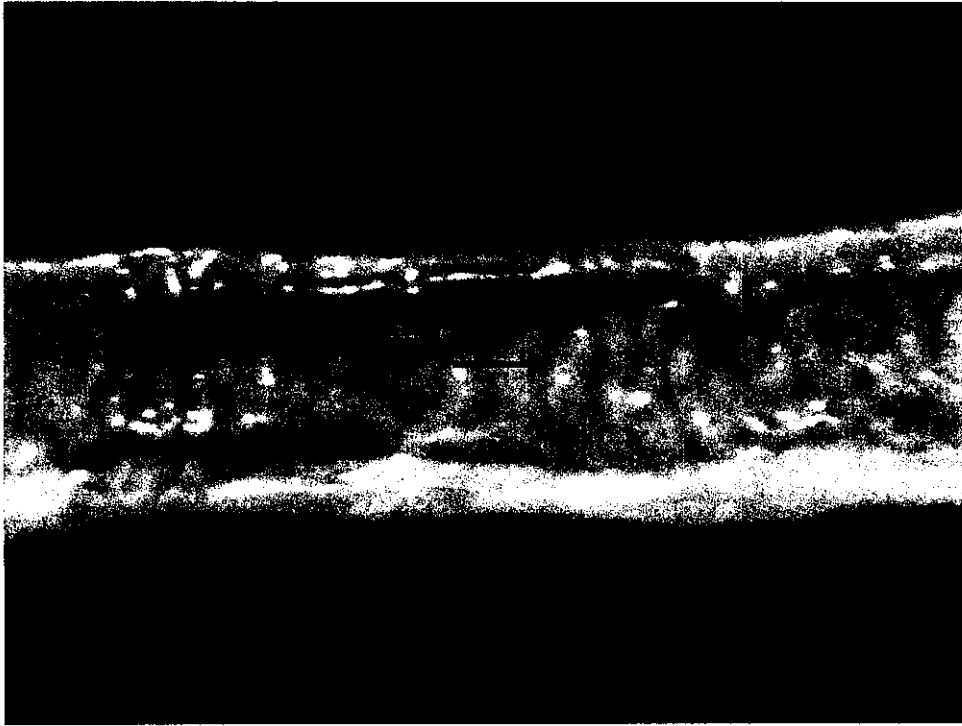


Figura 3. Sección de íleon mostrando engrosamiento discreto de la mucosa (→). Cabrito No. 6 (120 dpi)

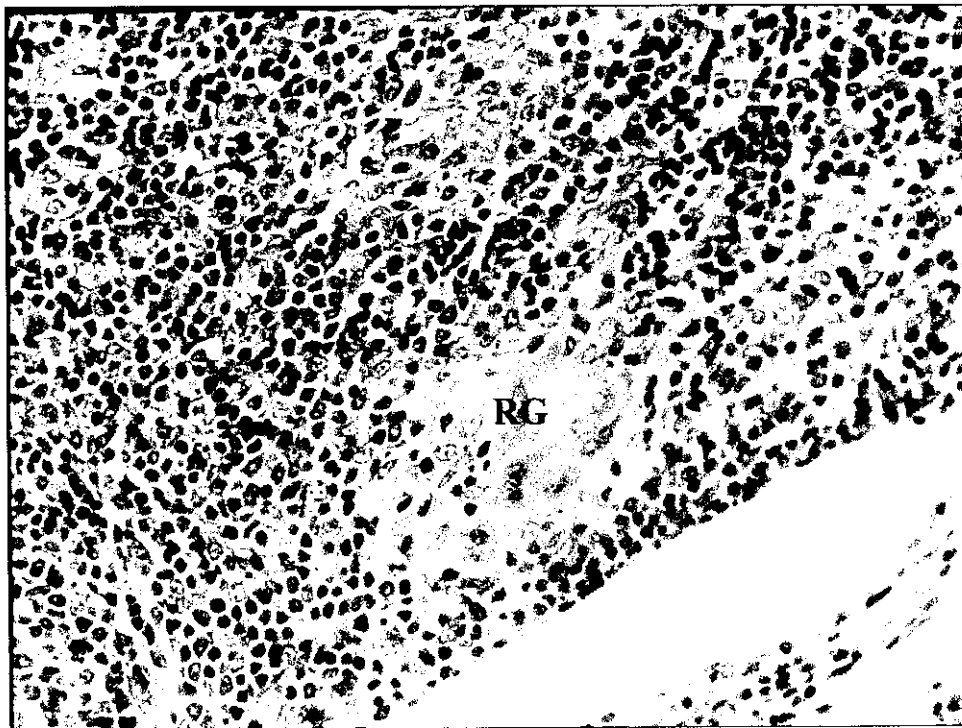


Figura 4. Reacción granulomatosa focal (RG) en zona interfolicular asociada a mucosa de íleon. Enteritis granulomatosa focal. Cabrito No.6 (120 dpi). H-E 320X



Figura 5. Reacción granulomatosa focal (RG) en zona interfolicular asociada a mucosa de íleon. Enteritis granulomatosa focal. Cabrito No. 6 (120 dpi) . H-E 400X

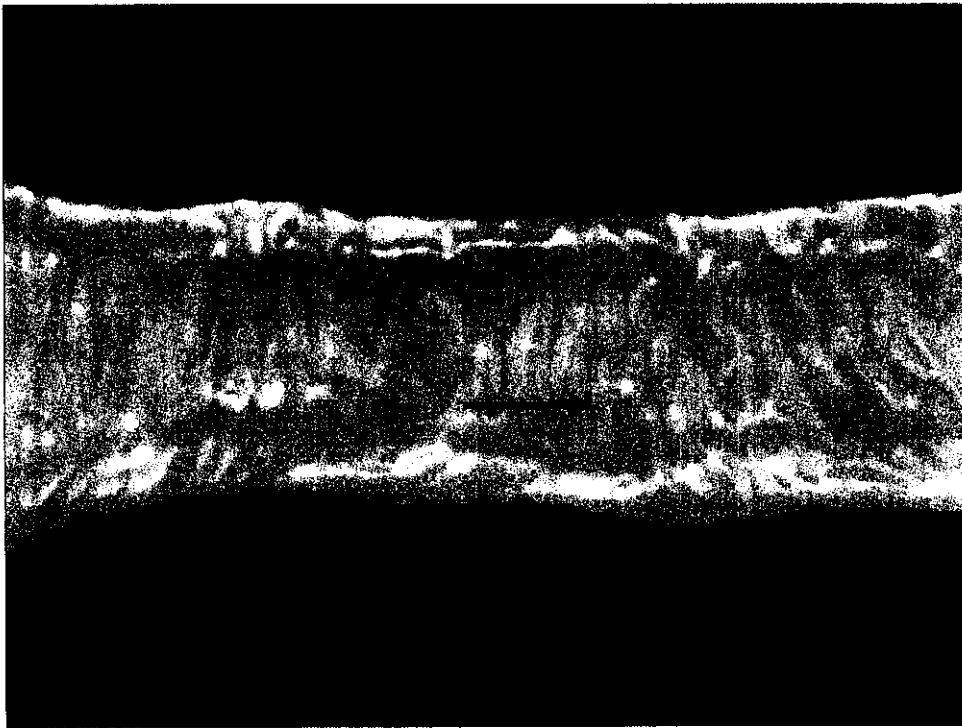


Figura 6. Sección de íleon mostrando engrosamiento discreto de la mucosa (→). Cabrito No. 2 (188 dpi).



Figura 7. Infiltración linfocitaria perivascular (IL) en dermis (D) del pliegue anocaudal positivo a PPD-aviar. Dermatitis linfocitaria perivascular. Cabrito No. 2 (120 dpi). H-E 25X



Figura 8. Acúmulo de macrófagos (RGf) asociado a la cúpula (C) en mucosa asociada a tejido linfóide de yeyuno. Reacción granulomatosa focal. Cabrito No. 3 (188 dpi). H-E 400X



Figura 9. Nódulo post-inmunización (N) en cabrito No. 18 (188 dpi).



Figura 10. Corte de nódulo post-inmunización (N) mostrando áreas de necrosis caseosa (n). Cabrito 18 (188 dpi).

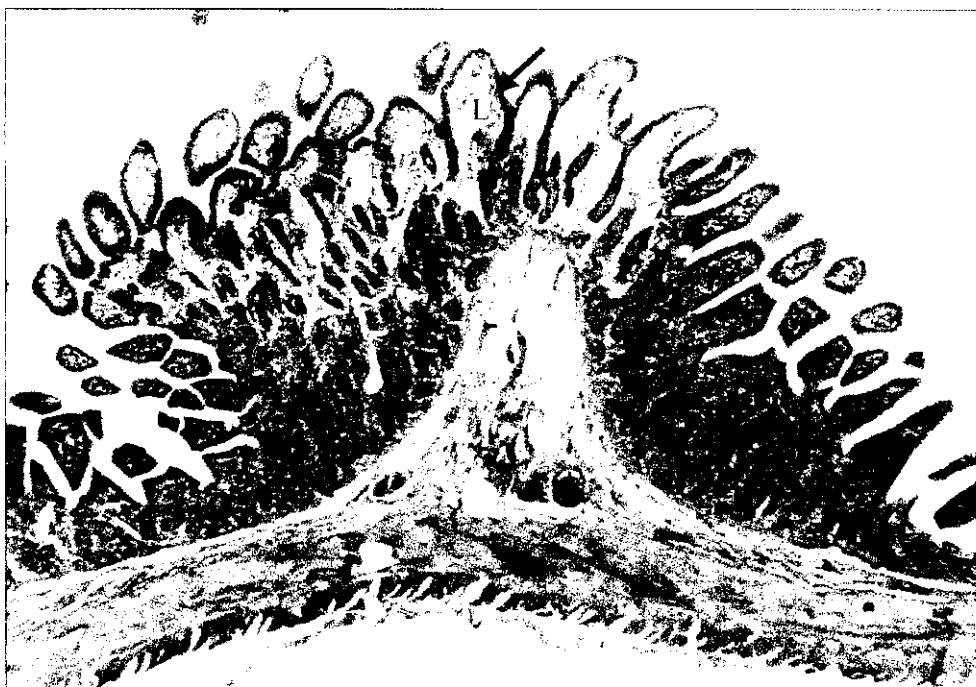


Figura 11. Dilatación de vasos linfáticos (→ L) en porción apical de la lámina propia de ileon. Linfangiectasia. Cabrito No. 15 (120 dpi). H-E 25X

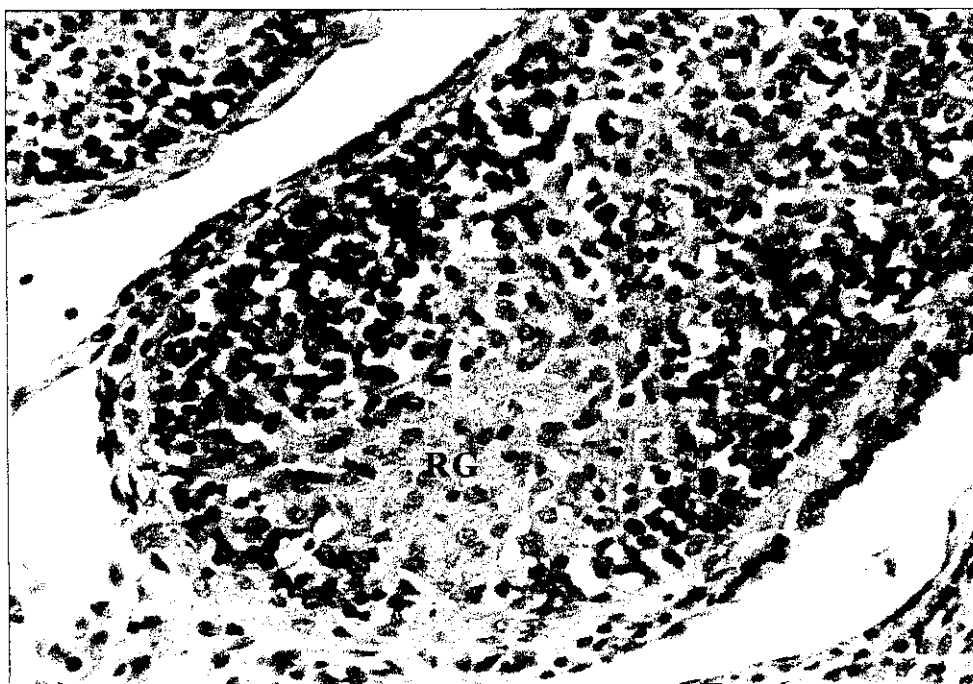


Figura 12. Reacción granulomatosa (RG) en base de folículo linfoide asociado a mucosa de íleon. Enteritis granulomatosa focal. Cabrito No. 15 (120 dpi). H-E 400X

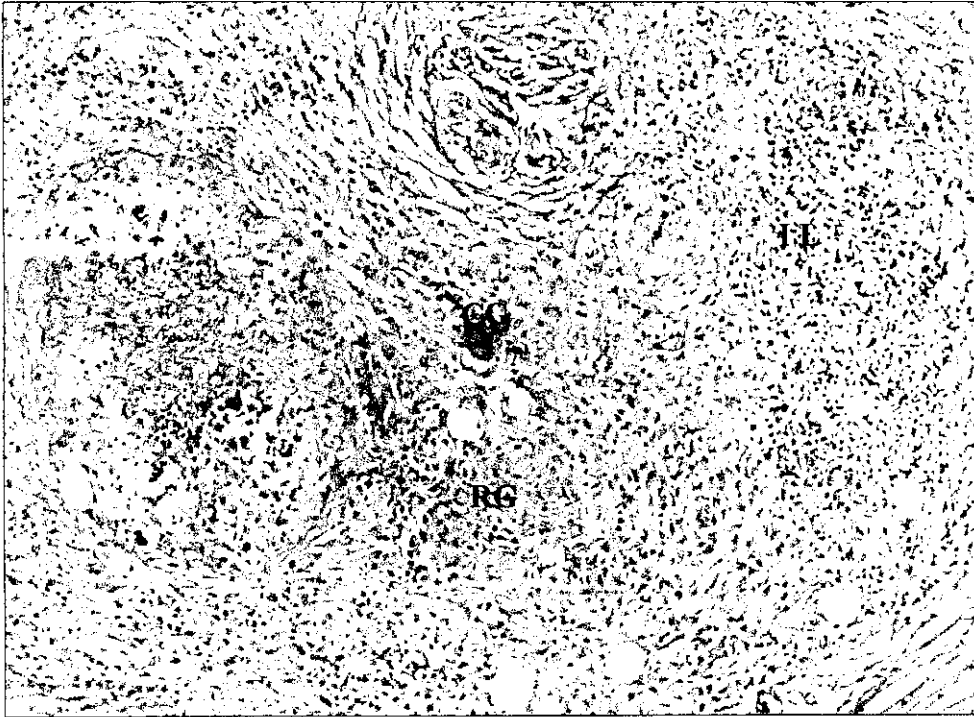


Figura 13. Reacción granulomatosa conformada por macrófagos (RG), célula gigante (CG) e infiltración linfocitaria perivascular (IL) en dermis del sitio de inmunización. Dermatitis granulomatosa. Cabrito No. 15 (188 dpi). H-E 100X.

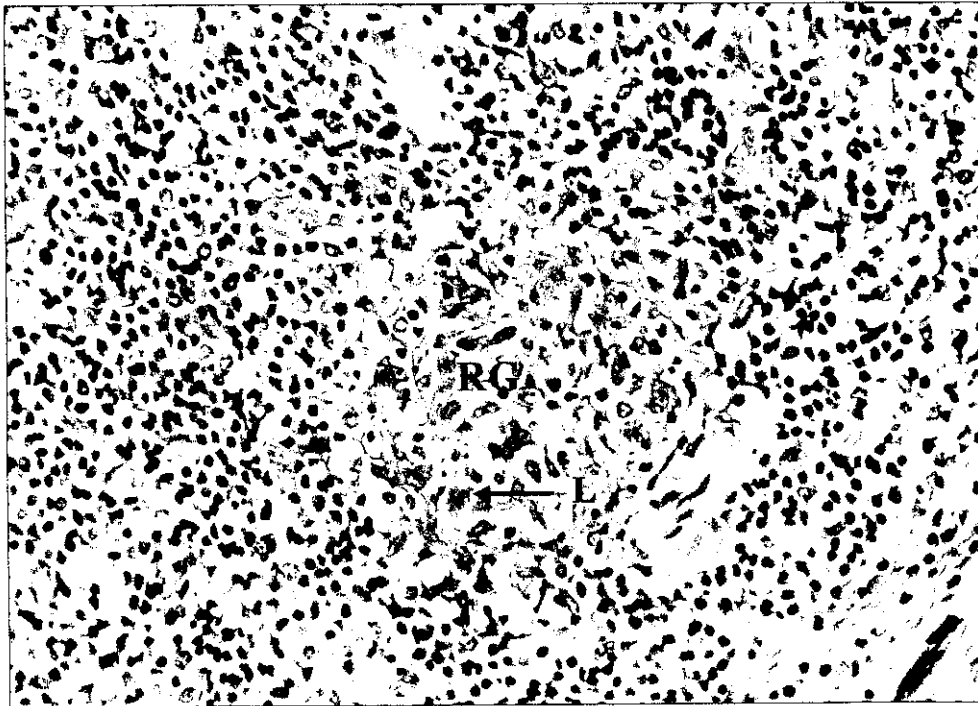


Figura 14. Reacción positiva (← L) en granuloma focal (RG) en zona interfolicular de yeyuno empleando anti-lisozima (1/50). Reacción granulomatosa focal. Cabrito No. 3 (188 dpi). ABC-P 250X

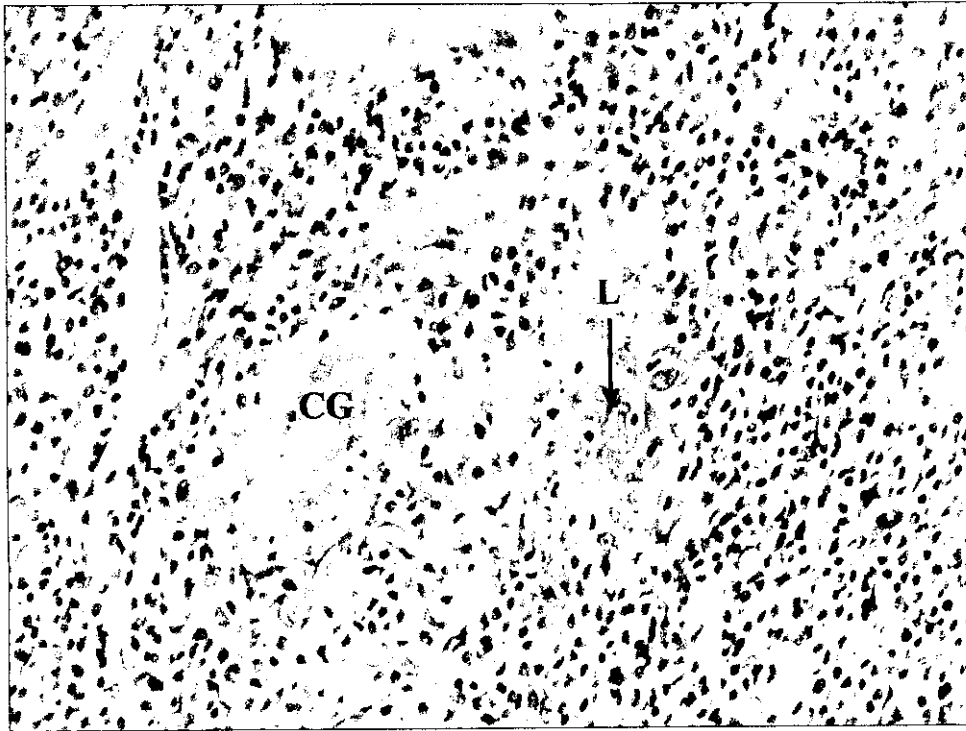


Figura 15. Reacción positiva en macrófagos (↓ L) y célula gigante (CG) en zona interfollicular de yeyuno empleando anti-lisozima (1/50). Reacción granulomatosa focal. Cabrito No. 3 (188 dpi). ABC-P 250X