

01674  
3



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE Y DESARROLLO DE  
LESIONES EN CABRITOS INMUNIZADOS Y NO INMUNIZADOS,  
INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON *Mycobacterium avium* subsp.  
*paratuberculosis* DE ORIGEN CAPRINO Y OVINO.

TESIS

para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias de la Salud y Producción Animal

Presentada por

MVZ ADRIANA LALARCÓN ABURTO

Bajo la asesoría de  
Dr. Gilberto Chávez Gris

Tutores:  
Dr. Ramón Juste Jordán  
Dr. Jorge L Tórtora Pérez



México D.F.

2002

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.

Este trabajo fue financiado parcialmente por CONACyT, proyecto 25395-B: "Evaluación Inmunológica postvacunal, efecto sobre la producción y diferenciación de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* en caprinos".

Y por PAPIIT, proyecto IN 22 1999: "Estudio inmunopatológico y polimórfico de Map en animales y pacientes con Enfermedad de Crohn"

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## DEDICATORIA

Con todo mi amor:

Para Marianita y Rafael por sufrir con paciencia y amor mis estudios y este trabajo, la mayor parte de su corta vida. **Los amo.**

Para Abel. Sin palabras para expresar mi agradecimiento y admiración. Porque este logro es principalmente tuyo, sin ti nunca lo hubiera conseguido.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnia.

Al Dr. José Luis Dávalos por su invaluable apoyo para estudiar el posgrado y por confiar en mí. Gracias

Al Dr. Andrés Ducoing W. por ser el responsable intelectual de este avance profesional y personal.

Al Dr. Gilberto Chávez G por hacerme parte de su proyecto para hacer mi tesis, por compartir los conocimientos conmigo, pero sobre todo, agradezco la amistad y los grandes momentos.

A mis tutores Dr. Jorge Tórtora P y Dr. Ramón Juste J por todo el tiempo invertido en este trabajo y por el apoyo siempre con la mayor disposición y paciencia.

A los miembros del Jurado: Dr. Roberto Cervantes O y Dr. José Angel Gutiérrez P, por el enriquecimiento de este trabajo final y allanar el camino hacia la meta.

A Maricruz Domínguez por enseñarme todas las técnicas de las pruebas realizadas con enorme paciencia, por estar siempre a mi lado ayudándome, gran parte de esta tesis es mérito tuyo.

Al Departamento de Patología y la Dra. Nuria de Buen por abrirme sus puertas, a Don Aureliano, Don Beny, Xóchitl, Fausto, Erika por la ayuda durante las necropsias, a Carmelita y a todos los que soportaron tanto tiempo mi presencia ahí. Especialmente gracias al Técnico en histología Sr. Luis Antonio Morales A, por todo el trabajo en la preparación de las laminillas que utilicé en mi tesis. Gracias.

Al Centro de Enseñanza, Producción e Investigación en Salud y Producción Animal por alojar a los cabritos durante la investigación. En especial agradezco a Don Abundio y Xolalpa y a los estudiantes que ayudaron sin que yo supiera.

Al Dr. Antonio Verdugo por el asilo en su Laboratorio de Biología Molecular, gracias a Elvia Lazo, Xóchitl Vega, Rigo, Daniel, Héctor, y todos los que me ayudaron mientras trabajé ahí y después.

Al Dr. Cervantes y Josefina del Río por prestarme el material de su laboratorio.

A Adriana Ducoing por el tiempo e interés empleados para el análisis estadístico.

A Don Chuy Ahedo por todas las facilidades para realizar los muestreos y vendernos sus valiosos cabritos para realizar mi tesis y **gracias** a éstos pues sacrificaron su vida para éste propósito.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Al laboratorio CZ Veterinaria, S.L. (Pontevedra, España) por la donación de la bacterina.

A PRONABIVE por la donación de los derivados protéicos aviar y bovino.

A mis amigos por estar siempre ahí: Adolfo, Alicia, Javier, Regina, Andrés, Ana, Maricruz, Isabel. Sólo Gracias.

A mis papás y hermanos porque he contado con su apoyo siempre y especialmente en esta etapa final.

A Ian y Cristina Campbell por toda la ayuda que me han brindado en esta última etapa tan difícil y sobre todo por su amistad.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## CONTENIDO

GLOSARIO	vi
RESUMEN	1
SUMMARY	3
1. INTRODUCCIÓN	4
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	
1.1 Reseña histórica	7
1.2 Agente etiológico	8
1.3 Epidemiología	
1.3.1 Distribución mundial	10
1.3.2 Distribución en México	11
1.3.3 Susceptibilidad a la enfermedad	12
1.3.4 Factores asociados a la enfermedad	14
1.4 Importancia económica	15
1.5 La paratuberculosis como zoonosis potencial	17
1.6 Desarrollo de la enfermedad	19
1.7 Patogenia e inmunidad del huésped	
1.7.1 Transmisión y entrada al huésped	21
1.7.2 Mecanismos de defensa de <i>Map</i>	23
1.7.3 Respuesta inmune a la infección	23
1.8 Lesiones anatomopatológicas	28
1.8.1 Lesiones macroscópicas	28
1.8.2 Lesiones microscópicas	29
1.9 Diagnóstico	31
1.9.1 Métodos para la identificación del agente	
a) Cultivo bacteriano	31
b) Examen microscópico	33
c) Histopatología	34
d) Pruebas genéticas	34

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

1.9.2	Métodos para la detección de la respuesta inmune celular	35
a)	Prueba de intradermorreacción	35
b)	Aplicación de un antígeno intravenosos	36
c)	Transformación blastoide (Linfocitaria )	37
d)	Inhibición de la migración linfocitaria	37
e)	Detección de Interferón-gamma	38
1.9.3	Métodos para la detección de anticuerpos	
a)	Fijación de complemento	39
b)	Inmunodifusión en gel de agar	39
c)	Inmunoensayo enzimático	40
d)	Containmuno electroforesis	40
1.9.4	Pruebas poco utilizadas	41
1.9.5	Pruebas específicas	41
1.10	Control	42
1.10.1	Tratamiento	43
1.10.2	Manejo de la granja	43
1.10.3	Estrategias para la erradicación	45
1.10.4	Inmunización	47
1.10.5	Acción de la vacuna	49
1.11	Infección experimental	50
1.11.1	Vías de inoculación	50
1.11.2	Respuesta celular a la inoculación	51
1.11.3	Respuesta humoral a la infección experimental	52
1.11.4	Lesiones en la infección experimental	53
	<b>OBJETIVOS</b>	55
	<b>HIPÓTESIS</b>	56
2.	<b>PROCEDIMIENTO</b>	
	Unidad experimental y asignación de tratamientos	57
2.1	Obtención del inóculo	57
2.2	Inoculación de los cabritos	59
2.3	Inmunización	60
	Pruebas realizadas	
2.4	Detección de la respuesta inmune humoral: pruebas serológicas	60
2.4.1	Prueba de inmunodifusión en gel de agar	61
2.4.2	Prueba de inmunoensayo enzimático	61

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

2.5	Detección de la respuesta inmune celular	63
2.5.1	Prueba de intradermorreacción	63
2.5.2	Prueba de interferón-gamma	63
2.6	Estudios clínicos y postmortem	64
2.6.1	Estudio anatomopatológico	64
2.6.2	Estudio histopatológico	65
2.7	Estudio bacteriológico	66
2.8	Análisis Estadístico	67
3.	RESULTADOS	
3.1	Inmunización	68
3.2	Respuesta inmune humoral I	
3.2.1	Inmunodifusión en gel de agar	69
3.2.2	Inmunoensayo enzimático	70
3.3	Respuesta inmune celular	
3.3.1	Intradermorreacción	73
3.3.2	interferón-gamma	77
3.4	Resultados clínicos y postmortem	
3.4.1	Hallazgos anatomopatológicos	79
3.4.2	Histopatología	79
3.5	Cultivo bacteriano	83
4.	DISCUSIÓN	
4.1	Inoculación	86
4.2	Inmunización	87
4.3	Respuesta inmune humoral	
4.3.1	Inmunodifusión en gel de agar	87
4.3.2	Inmunoensayo enzimático	88
4.4	Respuesta inmune celular	
4.4.1	Intradermorreacción	91
4.4.2	Interferón-gamma	94
4.5	Estudios clínicos y postmortem	98
4.5.1	Hallazgos anatomo patológicos	99
4.5.2	Histopatología	100
4.6	Cultivo bacteriano	104
5	BIBLIOGRAFÍA CITADA	108

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1 Lesiones macroscópicas	80
Cuadro 2. Lesiones microscópicas	81
Cuadro 3 Resumen de resultados de pruebas y lesiones	85
Figura 1. Nódulo vacunal	68
Figura 2. Resultados prueba de IDGA	70
Figura 3. Resultados de la prueba de ELISA	71
Figura 4. Promedio del Cociente de Densidad Optica de ELISA	72
Figura 5. Resultados de la prueba de IDR	74
Figura 6. Reacción a la prueba de IDR	74
Figura 7. Correlación entre las pruebas de ELISA e IDR con PPD-A	75
Figura 8. Correlación entre las pruebas de ELISA e IDR con PPD-B	76
Figura 9. Resultados de la prueba de IFN- $\gamma$	77
Figura 10. Comparación entre las pruebas de IFN- $\gamma$ e IDR.	78
Figura 11. Corte histológico con reacción granulomatosa cabrito 6	84
Figura 12 Corte histológico con lesión granulomatosa cabrito 18	84
Figura 13. Sección de íleon con lesión de PTB, cabrito 6	99

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## INDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Técnicas de laboratorio	
1.1 Técnica de purificación de micobacterias a partir de mucosa intestinal.	125
1.2. Cuantificación de bacterias en un inóculo	126
1.3 Técnica de elaboración de gel para la prueba de IDGA	127
1.4. Protocolo de la técnica de Inmunoensayo enzimático (ELISA)	128
1.5 Técnica de diálisis del Derivado Proteico Purificado (PPD).	130
1.6 Protocolo para la prueba de Interferón-gamma (IFN $\gamma$ )	131
1.7 Protocolo para la elaboración de medio de cultivo Löwenstein-Jensen.	132
Anexo 2. Clasificación de las lesiones de Paratuberculosis	134
Apéndice. Descripción de las lesiones macroscópicas y microscópicas encontradas en los cabritos del estudio.	137

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## ABREVIATURAS UTILIZADAS:

ABP	Avidina Biotina Peroxidasa
CDO	Cociente de densidad óptica
CIEF	Contrainmunolectroforesis
CR	Receptor celular
DPI	Días postinoculación
DPV	Días postinmunización
ELISA	Inmunoensayo enzimático
FC'	Fijación de complemento
FL	Folículo linfoide
TNF- $\alpha$	Factor de Necrosis Tumoral alfa
HE	Hematoxilina Eosina
IDGA	Inmunodifusión en gel agar
IDR	Intradermorreacción
IF	Interfolicular
IFN $\gamma$	Interferón gamma
IL	Ileon
IL1	Interleucina 1
Linf CD	Cluster differentiation
L-J	Löwenstein Jensen
Map	<i>Mycobacterium avium</i> subespecie <i>paratuberculosis</i>
MG-CSF	Factor Estimulante de la Colonización de Granulocitos Macrófagos
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad
NK	Células asesinas naturales
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PI	Postinoculación
PP	Placa de Peyer
PPD-A	Derivado proteico purificado aviar
PPD-B	Derivado proteico purificado bovino

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

PTB	Paratuberculosis
PV	Postinmunización
Th1	Linfocitos T cooperadores tipo 1
Th2	Linfocitos T cooperadores tipo 2
TL	Transformación linfocitaria
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
VIC	Válvula ileocecal
Y	Yeyuno
ZN	Ziehl-Neelsen

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE Y DESARROLLO DE LESIONES EN CABRITOS INMUNIZADOS Y NO INMUNIZADOS, INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* DE ORIGEN CAPRINO Y OVINO.**

**RESUMEN**

**Adriana Alarcón Aburto. "EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE Y DESARROLLO DE LESIONES EN CABRITOS VACUNADOS Y NO VACUNADOS, INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* DE ORIGEN CAPRINO Y OVINO".** Bajo la supervisión de Dr. Gilberto Chávez Gris, Dr. Ramón Juste Jordán y Dr. Jorge Tórtora Pérez.

No se conocen los mecanismos de acción y la eficiencia de la inmunización como parte del control de la paratuberculosis (PTB). Con el propósito de conocer más sobre esto, se inocularon 9 cabritos con *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*) de origen caprino y 9 con *Map* ovino, 9 cabritos sin inocular fueron el grupo testigo (Grupos A, B y C). De cada grupo 5 animales recibieron tratamiento con inmunógeno el día 14 postinoculación (PI). Se obtuvieron muestras de sangre los días 1, 14, 30, 120, 180 PI. Para medir respuesta celular se realizó la prueba de intradermorreacción doble comparativa (IDR) en los dos últimos muestreos y se hizo un ensayo con gamma interferón (IFN- $\gamma$ ), usando en ambas un derivado proteico purificado aviar (PPD-A) y un PPD bovino (PPD-B). Se emplearon pruebas de inmunodifusión en gel de agar (IDGA) y de Inmunoensayo enzimático (ELISA) para medir respuesta humoral. Se sacrificaron 4 cabritos de cada grupo a los 120 y 180 DPI, para observar lesiones y hacer aislamiento bacteriano. Se detectaron seropositivos desde el día 30 PI en los 3 grupos inmunizados, con ambas pruebas, pero IDGA detectó más animales que ELISA, resultando positivos todos los inmunizados en los muestreos a los 120 y 180 DPI. De los no inmunizados, el máximo de seropositivos fue de 2:2 en el grupo B a los 180 DPI. Se encontró una diferencia estadística significativa por efecto del tratamiento pero no por grupos. Mientras que ELISA detectó positivos a 5:5 en el B a los 120 DPI y 4:4 en el B y C a los 180 DPI. No hubo seropositivos en los infectados no inmunizados. No hubo diferencia significativa en la prueba de ELISA para grupos ni tratamiento ni día de muestreo. En la inmunidad celular con IDR hubo una reacción similar con PPD-A y PPD-B. A los 120 DPI hubo más reactores entre los inmunizados de los 3 grupos, que a los 180 DPI, sólo uno del grupo A y uno del B no inmunizados, fueron positivos a los 120 y 180 días respectivamente. Tampoco hubo evidencia estadística de diferencia entre grupos, tratamientos o por el antígeno empleado. La prueba de IFN- $\gamma$  no arrojó resultados consistentes entre los tratamientos como efecto del inmunógeno y el tiempo PI, en los grupos inmunizados el resultado al PPD-A fue superior y en los no bacterinizados al PPD-B. Los hallazgos histopatológicos mostraron lesiones de PTB similares en los cabritos infectados de los grupos A y B inoculados con *Map* de diferente origen, así como en los bacterinizados y los que no lo fueron. La lesión más severa fue del tipo IIIa: delimitada multifocal, y se presentó en un animal no

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

inmunizado, pero no es posible concluir que la bacterina protegió a los cabritos que la recibieron, pues en los demás animales sacrificados, el grado de lesión encontrada, no tiene una relación aparente con el tratamiento del inmunógeno. No se observaron *Map* en los tejidos teñidos con Ziehl-Neelsen. Tampoco fue posible aislar bacterias en los tejidos de los cabritos sacrificados. Por las lesiones encontradas, se sugiere que existió la infección interespecie, del *Map* ovino en los caprinos. No hay evidencia de que la bacterina protegió a los cabritos contra PTB en este periodo de observación, sin embargo, sería importante hacer un seguimiento en muestreos posteriores, al resto de los cabritos pues podría existir la regresión de lesiones con un subsecuente control de la enfermedad en animales inmunizados, como ha sido reportado.

## SUMMARY

The means by which immunization affects paratuberculosis (PTB) and the effectiveness of immunization are unknown. In order to know more about both, nine kids were experimentally infected with *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* (*Map*) obtained from caprines; another nine kids with an ovine *Map*; and nine more remained as a control group (Groups A, B and C). Five animals from each group received an immunogen treatment at 14 days post-infection (DPI). Blood samples were collected at 1, 14, 30, 120 and 180 DPI. To measure cellular immunity, skin testing (IDR) was carried out in the two last samples and a gamma-interferon test (IFN-g ) was conducted. An agar gel immunodiffusion test (IDGA) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were also carried out to find humoral response. Four kids from each group were slaughtered at 120 and 180 DPI, in order to examine the lesions and for isolation of mycobacterias. Seropositive results were detected as early as 30 DPI in the three immunized groups with both ELISA and IDGA, but the latter detected more seropositives than ELISA, finding all immunized animals positive at 120 and 180 DPI and in the non-immunized group reached a maximum number of positives of 2:2 in B group in day 180 PI, statistical differences were found between treatment but not between groups. While the maximum seropositives under the ELISA test was 5:5 in B group at 120 DPI and 4:4 in B and C groups at 180 DPI. No positive animals were detected in the infected/non immunized groups. Non statistical differences were found in ELISA between either treatments, or either groups. In the IDR test for A-PPD and B-PPD there was a similar result. More immunized animals were positive at 120 DPI than at 180 days PI. In the non immunized animals, only one kid in A group and one in B group were positive at 120 y 180 DPI, respectively.

Non-statistical differences were found. The IFN-g test did not point out consistent results within treatments attributable to the bacterin used or the time after infection. The immunized groups had better results with an A-PPD while the non-immunized animals reacted better with the B-PPD. Pathology findings showed some PTB like lesions in all the infected kids from groups A and B inoculated with different *Map* strains. There were similar lesions in bacterinized and non-immunized animals. The most serious lesion was IIIa, and even though it was found in a non-immunized kid, it is not possible to conclude that the bacterin protected the immunized animals, because in the other slaughtered kids, the lesions do not seem to be related to the bacterin. It was not possible to observe *Map* in the Ziehl Neelsen stained tissues nor was it possible to isolate bacterias from slaughtered kids. However, pathology in groups A and B suggest infection in goats with the ovine *Map*. There is no evidence that bacterin protected animals against PTB in this observation period. Nevertheless it would seem important to continue the research because regression of the lesions may be possible and it is also possible that the vaccine may restrict the level of sickness in immunized kids.

## 1. INTRODUCCIÓN

La Paratuberculosis (PTB) es una enfermedad de curso crónico que afecta principalmente a los rumiantes domésticos, ocasionando enteritis y linfadenitis granulomatosa (Chiodini, 1984a; Whitlock y Buergelt, 1996).

El agente causal es *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* (*Map*), bacilo ácido-alcohol resistente, cuyo órgano blanco son los macrófagos (Kreeger, 1991; Smith, 1969).

Los primeros reportes de la enfermedad en México fueron realizados en 1936 en bovinos, confirmando el diagnóstico con la observación de la bacteria en heces (Unzueta, 1936). En 1974 se realizaron las primeras investigaciones de la PTB en ovinos (Bustamante, 1974; Garibay, 1974), pero fue hasta 1979 que se logró el primer aislamiento de la micobacteria asociada a la enfermedad de Johne en bovinos lecheros de México y en 1982 se aisló la bacteria en cabras del Bajío (Ramírez *et al.*, 1979; 1982).

De distribución mundial, la PTB es causante de importantes pérdidas económicas en ganado bovino lechero con una prevalencia que puede llegar hasta el 50% (Hutchinson, 1996). En México no se han realizado estudios epidemiológicos completos de la enfermedad, sin embargo, los porcentajes de animales infectados, aunque muy variados, dependiendo de las pruebas utilizadas y de la especie, oscilan entre 7 y 30% (Barajas *et al.*, 1987; Bustamante 1974, Garibay, 1974; Vélez *et al.*, 1999b).

Son principalmente los rumiantes domésticos los que enferman de paratuberculosis, aunque también se ven afectadas en forma natural todas las especies de rumiantes silvestres y otros animales salvajes. La experiencia de campo demuestra que la infección interespecie no debe ser un evento usual, aunque investigaciones recientes han sugerido que ésta podría presentarse con cierta frecuencia (Sharp, 1996). Aún existe un debate con relación a que las cepas de *Map* puedan afectar a varias especies de manera natural o si existe especificidad de especie.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

La inmunidad protectora contra las infecciones por micobacterias se basa en la respuesta celular, ocasionando una hipersensibilidad retardada durante la primera etapa de la enfermedad, pero conforme la PTB avanza a un estado clínico, se desarrolla una respuesta de tipo humoral (Ellner y Wallis, 1989; Stabel, 1999a).

Las lesiones de la paratuberculosis se desarrollan principalmente por la reacción inmunológica del huésped, más que por el agente, presentándose una reacción inflamatoria granulomatosa que resulta en un engrosamiento del tejido intestinal, comprometiéndose la vascularización y el drenaje linfático (Kreeger, 1991). Las lesiones microscópicas se inician como pequeños focos granulomatosos que van evolucionando hasta una enteritis granulomatosa difusa (García-Marín *et al.*, 1994; Niesbet *et al.*, 1962) Los signos se observan en etapas avanzadas, con diarrea intermitente y pérdida progresiva de la condición corporal hasta llegar a un estado de caquexia y atrofia muscular, puede haber edema en tejido subcutáneo y ascitis (Elsken *et al.*, 1965; Whitlock y Buergelt, 1996).

En general el diagnóstico de la PTB es complicado, aunque existe una gran diversidad de pruebas, entre las que destacan las serológicas como Inmunoensayo enzimático (ELISA) e Inmunodifusión en gel de agar (IDGA), la Intradermorreacción (IDR) para detectar la inmunidad celular, la histopatología con tinción de Ziehl Neelsen (ZN) y el cultivo bacteriano como la prueba más confiable, algunas tienen problemas en sensibilidad y eficiencia, mientras que otras no están suficientemente desarrolladas, por lo cual no hay una que sea del todo satisfactoria (Collins, 1996; Eamens, 1996; Hietela, 1992)

El manejo adecuado en las granjas es una medida importante en el control de la enfermedad (Collins, 1994), se ha demostrado además que con la inmunización se obtienen buenos resultados (Doyle, 1964; Larsen *et al.*, 1978; Saxegaard y Fodstad, 1985; Sigurdson, 1969), no obstante, algunos investigadores no coinciden con el uso de la vacuna para controlar la PTB (Socket, 1996a).

Aunque actualmente se realiza mucha investigación a escala mundial sobre la PTB, aun quedan muchos aspectos por estudiar, especialmente para el control de la

enfermedad. En México son pocos los estudios que se han llevado a cabo, especialmente sobre el control del problema y aun menos en la especie caprina.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 1. Reseña histórica

La primera referencia a un cuadro parecido a la enfermedad de Johne o paratuberculosis fue realizada por d'Aroval en 1826. Sin embargo, la primera descripción fiable de este problema se realizó hasta 1895, en que Johne informó en Alemania el caso de una vaca en la que se realizó un estudio patológico completo, encontrándose que tenía una enteritis crónica, las lesiones eran un engrosamiento difuso de la mucosa intestinal, lo que lo llevó a postular que se trataba de una forma atípica de tuberculosis o tuberculosis entérica, ya que se demostró que un bacilo ácido alcohol resistente estaba involucrado en este problema patológico (Johne y Frothingham, 1895). Fue Bang en 1906 quien dio a este padecimiento el nombre de enfermedad de Jonhe, cuando descubrió que no se trataba de tuberculosis, por lo que también la llamó pseudotuberculosis (Clarke 1997a). Hasta 1910 se logró aislar y caracterizar el microorganismo causante de esa enfermedad y fue posible reproducirla experimentalmente, después de lo cual el nombre que se utilizó fue el de paratuberculosis (Twort e Ingram, 1912).

Las primeras investigaciones de la enfermedad en México fueron realizadas por Unzueta en 1936. En su estudio diagnosticó la enfermedad en ganado lechero que manifestaba signología similar a la descrita en Estados Unidos, utilizando la prueba de johnina y lo confirmó al observar la bacteria en heces. Muy posterior a ese reporte, en 1974, se efectuaron las primeras investigaciones de PTB en ovinos, utilizando en uno de los estudios la prueba doble comparativa (Garibay, 1974) y en el otro se llevó a cabo la detección de animales seropositivos por medio de fijación de complemento (Bustamante, 1974). No obstante, fue hasta 1979 que se logró el primer aislamiento de la micobacteria asociada a la enfermedad de Johne en bovinos lecheros en México y en 1983 se hizo un aislamiento de la bacteria, proveniente de cabras del Bajío (Ramírez *et al.*, 1979, 1982). A partir de entonces, se han realizado diversos trabajos en las tres especies de rumiantes domésticos, con diferentes técnicas de diagnóstico.

Para la clasificación del agente causal han existido problemas y discrepancias entre los investigadores. El nombre que se le dio en un inicio fue más bien descriptivo de la enfermedad, dándole crédito a su descubridor: *Mycobacterium enteritidis chronichae pseudotuberculosis bovis jonhei* Posteriormente se denominó *M. jonhei* y *M. paratuberculosis* (Juste 2000a).

Fue en 1990 que el agente causal fue clasificado como *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* (*Map*) diferenciándolo de otras especies y subespecies de micobacterias, de acuerdo a sus requerimientos de crecimiento, tipo de colonia, actividad enzimática, la susceptibilidad a quimioterapéuticos y la homología del ADN. Asimismo se confirmó que la enfermedad que ocasiona se denomina paratuberculosis, aunque todavía hay quien la llama enfermedad de Johne (Thorel *et al.*, 1990).

## 2. Agente etiológico

El agente causal de la PTB es una bacteria muy pequeña de forma bacilar, mide de 0.5 a 1.5 micrómetros y es inmóvil. Es Gram positiva, aunque responde débilmente a esta tinción, se caracteriza por ser ácido-alcohol resistente (Smith 1969). Esta característica está dada por su pared rica en lípidos, la cual está compuesta por una capa interna de peptidoglicano, una doble capa intermedia de ácido micólico, que es un ácido graso de cadena larga y se une a moléculas de arabinogalactan. La más externa se compone de antígeno glicopeptido-lípido (micósido), y tiene una membrana denominada Lipoarabinomanano (LAM), unida a glicolípidos de la pared, de gran importancia en la respuesta inmune. Todas estas capas en la pared bacteriana y su carácter ceroso, dificultan la penetración pero también la eliminación de los colorantes (Brennan y Nikaido, 1995; Camphausen *et al* 1985)

Además de lo anterior, la compleja pared celular le hace muy resistente a diferentes condiciones como cierto grado de sequía y a algunos desinfectantes, aunque es sensible a otros tales como la formalina al 5%, fenol e hipoclorito de calcio (Chiodini 1986b; Hole 1958). *Map* es un parásito obligado de los rumiantes pero puede sobrevivir fuera del huésped por períodos largos. En el agua permanece viable alrededor de 15 meses, igual que en oscuridad; puede sobrevivir a condiciones de

deseccación por varios años y casi un año en heces, soporta ciertos grados de acidez y salinidad (Hole, 1958; Larsen *et al.*, 1956). En un estudio Stehman *et al.*, 1996, pudieron aislar la micobacteria de pastizales y bebederos hasta casi un año después de que hubieron salido los animales del potrero. Es posible que posterior a ese tiempo, las condiciones adversas como la sequía, los rayos ultravioleta o bien la falta de nutrientes para la bacteria, lleguen a destruirla (Larsen *et al.*, 1956, Tizard 1996). Sin embargo no se puede descartar la idea de que las bacterias puedan entrar en un estado de latencia ocasionada por el estrés de la inanición, esperando las condiciones adecuadas para reactivarse. (Tizard, 1996).

Asimismo, parece ser que las temperaturas de refrigeración y congelación no afectan a la bacteria, que sobrevivió después de permanecer al menos durante un año a  $-14^{\circ}\text{C}$  y a  $4^{\circ}\text{C}$  (Larsen *et al.*, 1956, Richards y Thoen, 1977). Mientras que diversos estudios han demostrado que también resiste la pasteurización, Grant *et al.*, 1996 encontraron que el 18% de muestras de leche contenían pequeñas cantidades de microorganismos después del proceso.

A pesar de lo anterior, *Map* es un microorganismo de lento y difícil crecimiento. Se desarrolla a  $37^{\circ}$  ó  $38^{\circ}\text{C}$  y requiere de medios de cultivo especiales y enriquecidos para desarrollarse (Hole, 1958, Ramírez *et al.*, 1979). Una característica importante de esta subespecie, es la insuficiente producción de micobactina, por lo que requiere de la adición exógena a los medios para su crecimiento (Chiodini *et al.*, 1984a; Merkal y Curran 1974), debido a que esta sustancia es un compuesto intracelular que asiste a la bacteria en la obtención del hierro, a partir del ambiente, si no cuenta con ella no crecerá y es necesaria la adición de grandes cantidades de hierro en el medio (Merkal y Curran, 1974; Twort e Ingram, 1912), a pesar de esto, ha sido demostrado que las bacterias *in vivo* pueden producir micobactina suficiente para crecer (Barclay y Ratledge, 1983) Otros estudios han sugerido que las bacterias pudieran obtener el hierro a partir de los granulomas, donde se acumula a causa de la paratuberculosis (Momotani *et al.*, 1988) Después de varias semanas de cultivo, crecen pequeñas colonias blanquecinas y brillantes, firmes, de 1mm y no mayores de 5 mm (Merkal y Curran 1974). Han sido descritas formas bacterianas con una pared celular

defectuosa, las cuales además de ser mucho más resistentes, parecen jugar un papel importante en la patogenia de la enfermedad (Hulten *et al.*, 2000).

Como ya se mencionó, el agente causal de la PTB fue clasificado como una subespecie del *Mycobacterium avium*, basado en pruebas bioquímicas (Chiodini, 1986b), sin embargo, existen otras posturas como la de Kunze *et al.*, (1991), quienes basándose en el análisis del ADN, señalan que *Map* cuenta con una secuencia de inserción específica (IS900) que es única para esta bacteria. En otro estudio de identificación de ADN, Collins *et al.*, (1990) encontraron que había dos grupos de cepas de *Map*.

### 3. Epidemiología

#### 3.1 Distribución mundial.

La PTB tiene distribución mundial. Tras una serie de estudios realizados en la década de los ochentas, se consideró como una de las enfermedades de mayor prevalencia y causante de importantes pérdidas económicas en ganado bovino lechero (Hutchinson, 1996), así como en caprinos y ovinos (Badiola *et al.*, 1991).

Se estima que el impacto económico que tiene es alto. (Wilson *et al.*, 1996) En este sentido es muy importante considerar que generalmente hay una subestimación de la prevalencia de esta enfermedad, basándose en los estudios que consideran que por cada animal que se encuentra en una etapa avanzada de PTB, de 4 a 8 individuos están infectados y eliminando la bacteria, pero no muestran signos. Asimismo se calcula que ya se encuentran infectados de 10 a 14 animales jóvenes y de 15 a 25 adultos aunque no eliminen *Map* ni manifiesten signología (Whitlock y Buergelt, 1996).

Con todo esto, las estimaciones que se han hecho a partir de resultados obtenidos de cultivo fecal o de tejidos de bovinos, es que el porcentaje de animales infectados puede ser hasta de un 50% y al menos el 25% son eliminadores de micobacterias (Whitlock y Buergelt, 1996). Mientras que en ovinos, estudios realizados en España, empleando pruebas de inmunodifusión en gel de agar (IDGA) y ELISA han encontrado que más del 30% de los rebaños se encuentran infectados (Aduriz *et al.*, 1994) y en algunas regiones la prevalencia llega hasta un 46% (Juste *et al.*, 1991a). Para

caprinos los datos obtenidos en Noruega por Saxegaard y Fodstad en, 1985, indican que el índice de infección en los rebaños de acuerdo a la prueba de fijación de complemento y el examen postmortem en 1966, era del 53%. Asimismo, Molina *et al.*, (1990) publicaron una seroprevalencia del 46% en algunos rebaños caprinos de la zona sur de España. La mayor parte de los estudios en pequeños rumiantes en España han concordado con una prevalencia alta por encima del 40% (Mainar-Jaime y Vázquez-Boland, 1998).

En América son pocos los estudios al respecto, Moreira *et a.*, 1994 llevaron a cabo la prueba de ELISA en bovinos de carne de la provincia de Buenos Aires, donde se encuentra la mayor cantidad de ganado y obtuvieron una prevalencia ajustada al 58.8% de sensibilidad y 95% de especificidad, desde un 3% hasta más del 50%, en los diferentes distritos.

### *3.2 Distribución en México*

En México no se han realizado estudios epidemiológicos completos de paratuberculosis, sin embargo, desde 1974 Bustamante y Garibay realizaron sendos trabajos en un rebaño ovino, en los cuales se obtuvieron porcentajes del 17 % de seropositivos mediante fijación de complemento y del 24% de positivos a la prueba de intradermorreacción, respectivamente. En ganado de lidia, Barajas *et al.*, (1987) comprobaron la enfermedad a través del cultivo de órganos, encontrando que un 70% de los animales del estudio presentaban signología, lo que fue comprobado mediante las lesiones. En el mismo estudio, el 30 % de los individuos tenían lesiones pero no manifestaban signos de paratuberculosis. También en 1987, Barajas *et al*, encontraron en el trópico húmedo que un 7.1 % de ovinos pelibuey eran seropositivos mediante la prueba de ELISA y hasta el 10.6% fueron sospechosos. En 3 rebaños caprinos del altiplano, utilizando las pruebas de IDGA, ELISA, examen histopatológico y aislamiento bacteriano la prevalencia fue del 10%, incrementándose hasta un 20% en uno de ellos debido a un programa de control inadecuado (Vélez *et al.*, 1999b)

### 3.3 Susceptibilidad a la enfermedad

La PTB es una enfermedad de curso crónico, que se desarrolla lentamente afectando a animales adultos en su etapa clínica, sin embargo los animales jóvenes son los más susceptibles a la infección (Whitlock y Buergelt, 1996), principalmente menores de 30 días de edad, en una granja donde existe la enfermedad, se infectan desde el periodo neonatal. Sin embargo, se ha observado que sólo la tercera parte de los becerros expuestos a *Map*, desarrollan la enfermedad, dependiendo de una cierta resistencia por individuo y de sus mecanismos de inmunidad, así como del número de bacterias que sean ingeridas (Hagan, 1938). Por otro lado, los bovinos adultos son más resistentes a la infección (Rankin, 1961), en algunos estudios se observó que cuando éstos desarrollan la enfermedad, es muy leve, algunos animales infectados aun experimentalmente, no presentaron nunca signología, no obstante, pueden convertirse en portadores asintomáticos (Doyle 1953; Hagan, 1938; Payne y Rankin, 1961, Rankin, 1961). En las cabras la resistencia en el animal adulto no ha sido comprobada (Kreeger, 1991; Stehman, 1996), ésto fue estudiado por Elsken *et al.*, en 1965, cuando el 45% de las cabras entre 6 a 9 meses de edad, se infectaron de PTB al convivir con cabras infectadas experimentalmente. El 30% de los animales expuestos, murieron de la enfermedad, y más del 50%, fueron positivos a las pruebas de diagnóstico al inicio de la fase clínica, incrementándose hasta el 100% al final.

Son principalmente los rumiantes domésticos los que enferman de paratuberculosis, aunque también se ven afectadas de forma natural todas las especies de rumiantes silvestres, (Kreeger, 1991; Sharp, 1996). Se han logrado aislamientos de una gran variedad de especies de rumiantes en todo el mundo, de manera espontánea o experimental (Riemann y Abbas, 1983; Williams *et al.*, 1983). Asimismo, la enfermedad ha sido reproducida en algunos monogástricos, los cerdos pueden infectarse desarrollando lesiones similares a las de los rumiantes (Jørgensen, 1969; Larsen *et al.*, 1971). Varios investigadores lograron la infección experimental con micobacterias, en algunas especies que no son el huésped natural, como animales de laboratorio: ratas, ratones, conejos, hámsters, cuyes y pollos, produciéndose en casi todos,

lesiones similares a las naturales, aunque en la mayoría de los casos, éstas se desarrollaron principalmente en hígado, bazo y otros órganos (Francis, 1943; Harding, 1959; Larsen *et al* 1971; Mokresh y Butler 1990), en otros casos no hubo éxito en el experimento, aunque los investigadores concuerdan que es más probable la infección exitosa cuando las bacterias no han sufrido pases en medios de cultivo (Francis, 1943; Hirsch, 1956; Mokresh y Butler, 1990). En la actualidad los informes de infección natural en varias especies se han incrementado (Angus, 1990). En 1996, Greig *et al.* encontraron evidencia microbiológica e histopatológica de PTB en conejos silvestres (*Oryctolagus cuniculus*) de 22 granjas de ganado, donde la enfermedad era un problema o contaban con historia de ella. En la tipificación molecular no se logró encontrar discrepancias entre las bacterias aisladas en conejos y bovinos, lo cual sugiere que la infección interespecie puede ocurrir (Sharp, 1999, Stevenson *et al.*, 1999). Más aún, Beard *et al.*, 1999 encontraron lesiones compatibles con PTB en zorros y un armiño en Escocia, asimismo, obtuvieron resultados positivos en el cultivo bacteriano y mediante pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

A pesar de ello, la experiencia de campo demuestra que la infección interespecie no debe ser un evento frecuente, aun existe un debate al respecto, incluso entre los huéspedes naturales, el punto es si las cepas de *Map* pueden moverse de una especie a otra de manera natural, o bien hay especificidad de especie (Sharp, 1996) Experimentalmente, Saxegaard, (1990) no consiguió repetir la enfermedad en becerros con una cepa de origen caprino. Tampoco desarrollaron respuesta humoral, aunque fue posible aislarla del intestino delgado de los animales. Collins *et al.*, (1984) inocularon *Map* de origen caprino en becerros, pollos, cuyes y ratones y tampoco obtuvieron aislamientos ni lesiones en ninguno, excepto en los ratones, sin embargo, los becerros y cuyes tuvieron una fuerte respuesta a la tuberculina aviar. Por otro lado Taylor, 1953 si fue capaz de infectar y reproducir la enfermedad clínica en becerros infectados mediante dos variedades de *Map* aisladas de ovejas.

Chiodini, (1986b) y Chiodini y Van Kruiningen, (1985) realizaron una caracterización por cromatografía de gases y mediante pruebas bioquímicas de varias cepas de campo provenientes de diversas especies domésticas y silvestres, pero no

encontraron diferencias entre ellas. No obstante, las técnicas más modernas empleadas por Bauerfeind *et al.*, (1996) quienes realizaron por medio de hibridación, una caracterización de cepas de *Map* obtenidas en heces de bovinos, caprinos y ovinos de diferentes países, concluyen que hay variaciones genéticas y fenotípicas en las bacterias de distintas poblaciones de rumiantes. Por otro lado, hay quienes mencionan que no se ha encontrado evidencia en los patrones de ADN que demuestren diferencias entre los microorganismos aislados de esas especies en campo (Sharp, 1996). Se ha encontrado la enfermedad en pequeños rumiantes, pastando con ganado vacuno infectado (Sweeney, 1996c). Asimismo, Djønne *et al.*, 1999 han estudiado la posibilidad de que la persistencia de la enfermedad en las cabras de Noruega, haya sido determinante para la reaparición de la PTB en hatos bovinos con los que han tenido contacto.

Todo esto tiene un especial interés desde el punto de vista del control, pues el establecer un programa para una especie significaría que deben ser incluidos otros animales susceptibles; del mismo modo, los animales silvestres deben considerarse potencialmente huéspedes y transmisores de la enfermedad (Sharp, 1996, Clarke, 1997b). En el caso de los zorros infectados, se especula que pudieran haber contraído la infección indirectamente al ingerir conejos con la bacteria (Beard, 1999), aunque ello no le quita la posibilidad actuar como transmisores.

### 3.4 Factores asociados a la infección

Además de la susceptibilidad de los animales jóvenes para contraer la infección, otros factores de riesgo han sido asociados a la presentación de la PTB. Uno de los más importantes parecen ser los sistemas de producción intensiva (Clarke, 1997a). En 1997, Mainer-Jaimes y Vázquez-Boland llevaron a cabo un estudio en donde encontraron una correlación entre la seroprevalencia de PTB en caprinos y ovinos (44%) con la introducción de razas nuevas a los rebaños y una alta tasa de reemplazo, lo que está asociado a una mayor intensidad en el manejo, la seroprevalencia fue mayor en rebaños entre 200 y 400 animales, comparado con los rebaños mayores de 100 animales, asociado esto al manejo que reciben.

El estrés también es un factor de riesgo asociado con transporte, parto o lactación, así como enfermedades inmunosupresoras (Clarke, 1997a).

En una investigación sobre el impacto del ambiente contaminado en la diseminación de la enfermedad, Pavlik *et al.*, 1999a, identificaron *Map* en muestras del ambiente (pastura y suelos de corrales) de hatos infectados, asimismo se aislaron bacterias de ratones capturados en las zonas de pastoreo. No fue posible identificar al bacilo en animales invertebrados, sin embargo no se pudo descartar la posibilidad de que actuaran como vectores, pues al infectar experimentalmente a moscas, escarabajos y gusanos que fueron capturados, se logró aislar *Map* después de 4-6 semanas de cultivo.

#### **4. Importancia económica**

El impacto económico que tiene esta enfermedad puede ser muy importante. En Estados Unidos se estimaron pérdidas mayores de 1.5 billones de dólares anuales en la industria lechera (Clarke, 1997a), sin embargo poco se ha estudiado de lo que se pierde en ganado de carne y especies como caprinos y ovinos (Hutchinson, 1996).

Las pérdidas en los animales se deben principalmente al incremento en la tasa de desecho de animales en edad productiva que equivale a un 43%, esta situación se presenta por la disminución progresiva de peso de los animales así como por la baja en la producción de leche, incluso antes del Pico de producción, reduciendo así la posibilidad de ganancias futuras (Chiodini *et al.*, 1984a; Benedictus, 1987). Buergelt y Duncan, 1978, encontraron que las vacas afectadas por PTB, frecuentemente eran desechadas después de la primera o segunda lactancia, perdiendo así el potencial genético con que se contaba. Del mismo modo, Merkal *et al.*, 1975, publicaron que únicamente son eliminados un 30% de las vacas que manifiestan la enfermedad clínica, mientras que el 70% restante se desechan debido a posibles complicaciones a partir de la PTB, como mastitis e infertilidad. En una zona de Aragón en España, se estudiaron las causas de desecho de ovinos, encontrándose a la paratuberculosis como el principal enfermedad que conduce al desecho, duplicando casi al Maedi que es la segunda razón de eliminación (Pérez *et al.*, 1991).

Pero a la reducción de los ingresos también pueden sumarse la baja en la producción de carne y leche, se ha calculado que implica un 32% del déficit (Hutchinson, 1988). Es principalmente en el ganado lechero en el que se han llevado a cabo más estudios con el afán de cuantificar las pérdidas. En Nueva Zelanda, las vacas con aislamiento positivo a *Map* produjeron un 17% menos que las negativas (De Lisle y Milestone, 1989), Wilson *et al.*, 1993, obtuvieron resultados semejantes al analizar el efecto de la enfermedad durante las lactancias de vacas positivas a la enfermedad en comparación con las negativas. Por supuesto la baja de producción es mayor cuando la enfermedad es clínica en comparación con las vacas subclínicas (Hutchinson, 1996), aunque se ha descrito que en vacas con enfermedad subclínica la producción es un 15% menor en comparación con vacas no infectadas (Abbas *et al.*, 1983; Collins, 1994; Nordlund, 1996).

Como ya se mencionó una de las complicaciones de la PTB son los problemas reproductivos, un mayor número de vacas infectadas es eliminado por problemas de infertilidad (Merkal *et al.*, 1975) y el intervalo entre partos es mayor (Abbas *et al.*, 1983). No obstante algunos autores no han encontrado una relación entre la PTB con trastornos en la reproducción (Hutchinson, 1988).

De igual manera, la relación con la mastitis tampoco es muy clara (Hutchinson, 1996), Wilson *et al.*, 1993 observaron que el porcentaje de mastitis crónica y aguda en vacas positivas a PTB era significativamente mayor que en vacas negativas, también se ha notificado un 22% de vacas positivas eliminadas por mastitis contra un 3% de animales negativos a PTB que fueron desechados (Merkal *et al.*, 1975).

Los problemas en el diagnóstico también acarrear pérdidas económicas importantes, por un lado, puede ser necesario utilizar más de una prueba diagnóstica, lo que incrementa el costo del laboratorio, por otra parte, aunque algunas pruebas han demostrado alta sensibilidad, ésta se logra principalmente en etapas avanzadas de la enfermedad lo cual las hace menos eficientes. Otro factor importante a este respecto, es la prevalencia en el hato y el tamaño del mismo, de manera que las pruebas diagnósticas sean costeables. También es relevante el desecho de animales sanos por resultados falsos positivos (Hutchinson, 1988, 1996).

Otras pérdidas que son difíciles de cuantificar, pero que pueden ser importantes, han sido consideradas por algunos autores, la reducción del valor del animal al rastro en un 20%, costos de veterinario y tratamientos 2-3% (Benedictus, 1987; Hutchinson, 1996; Schaik *et al.*, 1996).

##### **5. La paratuberculosis como potencial zoonosis.**

En los últimos años una parte importante de la discusión sobre la PTB se ha enfocado a la posibilidad de considerarla como una zoonosis. El padecimiento en humanos con la cual se relaciona es la Enfermedad de Crohn, que por su presentación es conocida como colitis o ileitis de Crohn o ileitis regional. Los signos de este padecimiento son muy similares a los que afectan a los animales: pérdida de peso crónica y paulatina, diarrea, dolor abdominal y vómito, la lesión principal es una ileocolitis granulomatosa crónica, aunque puede desarrollarse en cualquier parte del tracto gastrointestinal (Chiodini y Rossitier, 1996b; Thorel, 1989), afectando primordialmente a pacientes desde la adolescencia y jóvenes de 20 a 30 años (Juste, 2000c). Debido a que se desconoce la etiología, la enfermedad de Crohn se ha englobado con otras similares de etiología desconocida como la colitis ulcerativa y que en conjunto reciben el nombre de enfermedades inflamatorias del intestino (Thorel, 1989, Collins, 2000). Se ha especulado sobre la inmunopatogénesis, la cual consiste en un estímulo inicial persistente del tejido linfoide asociado al intestino, se liberan citocinas y mediadores inflamatorios, se presenta una respuesta anormal por hipereactividad descontrolada, debido a que no hay una regulación para detener la respuesta defectuosa (Chiodini y Rossitier, 1996b; Juste *et al.*, 2000). Ya que la enteritis granulomatosa es característica de una hipersensibilidad retardada, se ha sugerido que el origen puede ser autoinmune, aunque no se sabe qué es lo que ocasiona o genera la respuesta anómala (Chiodini y Rossitier, 1996). En los años 80's se sugirió que el estímulo inmunológico de dicha respuesta podría ser *Map* (Juste *et al.*, 2000), debido a que, Chiodini *et al.*, (1984b) lograron aislamientos de *Mycobacterium* spp a partir de tres pacientes con enfermedad de Crohn. Los resultados de la caracterización bioquímica, sugirieron que podría tratarse de *Map*, o bien de una especie nueva de micobacteria.

Posteriormente se realizaron aislamientos de la bacteria hasta en el 30% de tejidos y muestras de pacientes con la enfermedad (Chiodini y Rossitier, 1996b). Usando las nuevas técnicas desarrolladas para pruebas genéticas, fue detectada la fracción IS900 del DNA a partir de un aislamiento de *Map*, proveniente de un paciente con enfermedad de Crohn (Bauerfeind, 1996). En una investigación llevada a cabo por Sanderson *et al.*, (1992), fue posible detectar la fracción en un 65% de pacientes con el padecimiento, no obstante el resultado no fue concluyente pues también se detectó la fracción IS900 en un porcentaje menor del 10% de enfermos de colitis ulcerativa y controles. En un estudio de Collins *et al.*, (2000), aplicando diversas pruebas para detectar *Map* en muestras de pacientes con el padecimiento y en controles, se encontró una diferencia significativa al detectar el fragmento IS900 en el 19% de aquellos y un 20% de seropositividad con ELISA. Han sido muchos los trabajos en los que se ha podido aislar *Map*, así como sus formas defectuosas, los esferoplastos, utilizando como controles a pacientes con colitis ulcerativa (Chiodini *et al.*, 1986a; Thorel, 1989), asimismo se han obtenido resultados positivos a pruebas serológicas (Elsagher, 1992). En las técnicas de PCR, hibridación y otras en las que se ha detectado el ADN de la bacteria, no ha existido una diferencia significativa con respecto a los controles estudiados (Chiodini y Rossitier, 1996b). Juste *et al.*, 2000 hicieron una evaluación estadística de varios estudios que se han realizado al respecto, donde sugieren que las diferencias en los resultados hallados pueden obedecer a la gran variabilidad que existe, en los antígenos empleados y en la metodología, así como en las diferencias que pueden existir en las cepas de la bacteria. Los autores del estudio sugieren que el hecho de encontrar un incremento en la inmunoglobulina G contra micobacterias en la mayoría de los trabajos hechos bajo condiciones muy diferentes, podría indicar que sí existe una relación de la enfermedad de Crohn con *Map*. En la evaluación los investigadores concluyen que es importante hacer estudios en los que se consideren los aspectos genéticos y del ambiente que pudieran permitir a la bacteria producir la enfermedad en el ser humano (Juste *et al.*, 2000). Por otro lado, Collins, 2000 argumentó que los estudios no habían demostrado una correlación entre la enfermedad de Crohn y una exposición ocupacional con los

animales, sin embargo debían tomarse ya algunas acciones para evitar una posible transmisión a través de los productos de origen animal.

## **6. Desarrollo de la enfermedad**

De acuerdo a los estudios realizados por Elsken *et al.*, 1965 en cabras y la propuesta de Whitlock y Buergett, 1996 para bovinos, la enfermedad se desarrolla manifestándose en 4 etapas:

- I. Infección silenciosa o latente. Ocurre en bovinos jóvenes hasta 2 años de edad, no existe ninguna evidencia de infección ni hay signología. En cabras, el periodo de latencia se planteó desde el momento de la inoculación hasta el primer aislamiento fecal que fue de 1-7 meses con un promedio de 3.
- II. Enfermedad subclínica. Son los adultos portadores, los cuales no muestran signos clínicos, sin embargo eliminan el agente de manera intermitente y en pequeñas cantidades y pueden ser detectados anticuerpos contra la bacteria, pero en general escapan a la mayoría de las técnicas disponibles. Este periodo en cabras es de 2-18 meses con un promedio de 9 meses.
- III. Enfermedad clínica. Puede ocurrir después de un periodo bastante largo de incubación, de 2 a 10 años en vacas, se caracteriza por pérdida de peso paulatina, el cual es el signo más destacable, apetito normal y ocasionalmente incrementado, así como el consumo de agua. Poco después del inicio de las manifestaciones clínicas, hay cambio en la consistencia de las heces hasta llegar a una diarrea acuosa, abundante de forma intermitente. En cabras la diarrea sólo se presenta en el 10 ó 20 % de ellas y por lo general la consistencia de las heces sólo se vuelve pastosa. Los signos vitales son normales, pero sí se encuentran cambios bioquímicos en sangre, por un lado la disminución de proteínas totales, albúmina, triglicéridos y colesterol, y por el otro el aumento de enzimas como creatinín-fosfoquinasa y aldolasa. Sin embargo, estos cambios no son específicos de la enfermedad. La eliminación de micobacterias en heces se incrementa exponencialmente y de manera constante. En caprinos este periodo dura de 2-5 meses.

IV. Enfermedad avanzada. Después de un periodo de algunos meses en la etapa III, los animales progresan a un estado de emaciación, se encuentran débiles y letárgicos, en cabras se ha observado anorexia en esta etapa, hay edema intermandibular, continúa la diarrea y se presenta baja de producción, razón por la cual los animales son desechados antes de que se presente la muerte. El estudio en cabras reveló que esta etapa puede durar desde 1 mes hasta 19 meses.

Por supuesto esta clasificación se basa en el tiempo y puede ser útil para conocer de manera muy general el desarrollo de la PTB, sin embargo es un tanto arbitraria, ya que no considera el tipo de respuesta inmune individual, pues las variaciones en el desarrollo de la enfermedad y la respuesta a las diversas pruebas son muy diferentes en los individuos, pudiendo contener o no la infección, dependiendo de su resistencia genética o ambiental. Por ello no se trata de una evolución temporal, sino que depende principalmente de factores inmunes (Juste, 2000<sup>1</sup>).

Otros autores han hecho clasificaciones con diferentes criterios, la propuesta de García-Marín *et al.*, 2000, considera la respuesta del individuo y el desarrollo de las lesiones. Primeramente se considera el momento de la infección a partir del cual los macrófagos intentan destruir o contener la multiplicación de *Map* y dependiendo de la capacidad de las células, puede progresar a una fase inicial de la PTB. En la primera fase sólo se encuentran formas focales, granulomas microscópicos, formados por unas cuantas células, a veces sólo una célula gigante y unos linfocitos, localizados en zonas interfoliculares de las placas de Peyer (PP). Cuando el animal se encuentra en esta etapa pueden ocurrir tres cosas: 1. Que la inmunidad celular local controle la infección y por lo tanto haya regresión de las lesiones. 2. Que sólo se logre su limitación, de manera que las lesiones y la bacteria permanezcan en un estado de latencia indefinido. 3. Que no se presente una respuesta inmune celular eficaz y la infección progrese.

En una segunda fase, las lesiones focales empiezan a extenderse hacia la lámina propia y linfonodos mesentéricos y conforme evoluciona la enfermedad se transforma

paulatinamente en lesiones multifocales, ocupando también la mucosa intestinal libre de PP, se les denomina formas multifocales debido a que continúan siendo pequeños granulomas, por lo que pueden ser reversibles si el animal cuenta con una respuesta inmune adecuada.

Aunque difícilmente podría encontrarse el límite justo de la tercera fase, ésta se presenta cuando dejan de encontrarse lesiones focales y avanzan a formas difusas que se extienden por toda la mucosa tanto de íleon como del yeyuno. La forma en que se presente esta fase, la velocidad con que se extienda y el tipo de células presentes también depende del sistema inmune del animal. (García-Marín *et al.*, 2000; Pérez *et al.*, 1996)

## **7. Patogenia e inmunidad del huésped**

### **7.1 Transmisión y entrada al huésped.**

La vía de entrada principal de la bacteria es la oral, a través de alimento y agua contaminados o leche de madres infectadas, así como por el amamantamiento en ubres contaminadas con heces (Chiodini, 1984; Hietela, 1992; Pavlik *et al.*, 1999a). Asimismo, algunos estudios, han encontrado que pudieran existir otras vías de transmisión de la bacteria, pues se ha aislado a partir de semen, en útero, glándula mamaria y de fetos, no obstante ninguna de éstas parece ser una forma importante de infección (Chiodini, 1984a). Una vez que la bacteria penetra por el tracto gastrointestinal, puede ocasionar una infección transitoria en las tonsilas y linfonodos de faringe, sin embargo no tiene importancia porque desaparece rápidamente, sin dejar secuelas (Payne y Rankin, 1961). Cuando *Map* alcanza el intestino, es endocitada por las células **M** del domo epitelial sobre el tejido linfoide organizado del intestino, en las placas de Peyer (García-Marín *et al.*, 1992; Momotani *et al.*, 1988). Los estudios sugieren que estas áreas son favorables para las micobacterias, lo que podría explicar la mayor susceptibilidad de animales jóvenes, que cuentan con una PP continua en todo el íleon y están más desarrolladas en yeyuno, esto y la tolerancia

---

<sup>1</sup> Comunicación personal.

local sugieren ser uno de los principales mecanismos para el establecimiento de la bacteria (Chiodini, 1996a; Juste *et al.*, 1994; Kreeger, 1991). Es posible que existan otras vías de entrada para las bacterias, debido a infecciones en áreas que no cuentan con células M (Chiodini, 1984). Las bacterias pueden ser llevadas en vacuolas por medio de la transcitosis al tejido subepitelial e intraepitelial, donde se encuentran los macrófagos, células blanco de la infección por *Map*, residiendo en ellos, aunque también es posible encontrar detritus de bacterias (Kreeger, 1991; Momotani *et al.*, 1996; Munk *et al.*, 1990; Stabel 1999).

No se conocen receptores específicos para *Map*, pero en el caso de *M. tuberculosis* se ha observado que intervienen en la adhesión receptores del complemento CR1, CR3 y CR4. Algunas moléculas funcionan en un mecanismo de opsonización, mientras que el receptor CD14, del complejo principal de histocompatibilidad, fibronectina, vitronectina, facilitan la entrada de las bacterias no opsonizadas dentro de los macrófagos (Bercovier, 1996; Clarke 1997b). Una vez dentro de los macrófagos, la bacteria reside en el compartimento endosomal, donde se mantiene viable y protegida casi por completo de los factores de resistencia e inmunidad (Bendixen, 1978; Chiodini, 1996a). En varios estudios fue posible observar lisosomas, fagosomas o fagolisosomas en los macrófagos, sin embargo la bacteria tiene mecanismos para evadir la fagocitosis (Clarke, 1997; Sweeney, 1996b). En un estudio *in vitro* de Bendixen *et al.* (1981), encontraron *Map* dentro de macrófagos hasta las 5 semanas posteriores a la fagocitosis, cuando el cultivo celular se degradó por sí sólo y aunque también fueron encontradas algunas bacterias degradadas dentro de los fagosomas, los investigadores sugieren que es posible que se deba a la fagocitosis de bacterias muertas en el cultivo celular. También Buerquelt *et al.*, 1994, demostraron la presencia de bacterias en los macrófagos después de la incubación, sin embargo, cuando los macrófagos fueron incubados con varias dosis de gamma-interferón, no encontraron un efecto bactericida sobre los macrófagos infectados con *Map*, que pudiera comprobar la destrucción de la bacteria, es probable que se requiera otro estímulo para activarlos. Por otro lado, en un ensayo con las mismas células, cuantificaron pequeños Picos de oxidación, demostrando que la vía dependiente del oxígeno que

emplean los macrófagos para destruir a las bacterias, puede ser utilizada de manera esporádica y en pequeña escala.

### 7.2 Mecanismos de defensa de *Map*

Al igual que las otras micobacterias, *Map* tiene diversos mecanismos de resistencia y evasión de la fagocitosis (Zaho *et al.*, 1996). Uno de ellos es su pared con la capa rica en lípidos y azúcares complejos, donde se encuentra en mayor cantidad el lipoarabinomano, el cual parece jugar un importante papel en la entrada de la bacteria a células epiteliales y macrófagos, inhibe la activación de los macrófagos o sus propiedades para eliminar microorganismos, por inmadurez de los fagosomas, probablemente porque inhibe la bomba de ATPasa, como ha sido demostrado con *M. tuberculosis* (Clemens y Horwitz, 1995; Sweeney, 1996). Por otra parte, se ha demostrado que hay una inhibición de la fusión fagosoma-lisosoma, probablemente por los sulfatos que se encuentran en la pared bacteriana, que son antagonistas de esta acción, además existe cierto grado de resistencia por parte de las bacterias al ambiente interior del fagosoma (Clemens y Horwitz, 1995; Edwards y Kirkpatrick, 1986; Ferhel *et al.*, 1986; Tanaka, 1996.). Un mecanismo que parece utilizar la bacteria para sobrevivir, es modificar el transporte de los nutrientes celulares, que la micobacteria parece aprovechar para subsistir (Ferhel *et al.*, 1986). También ocurre una inhibición de los mecanismos de las células para eliminar a las bacterias, tales como el oxidativo y la vía respiratoria, inhibiendo el óxido nítrico por medio de glicolípidos o con la superóxido dismutasa (Ellner y Wallis, 1989).

### 7.3 Respuesta inmune a la infección.

Por lo general son macrófagos inactivados los que fagocitan las bacterias recién endocitadas, sin embargo la respuesta no se presenta inmediatamente, sino que ocurre un lapso, que de acuerdo al modelo estudiado con tuberculosis, podría ser alrededor de 20 días, mientras tanto, son procesados los antígenos (Chiodini, 1996a). La inmunidad generada contra las infecciones de micobacterias se basa en la respuesta celular, ocasionando una hipersensibilidad retardada (Ellner y Wallis, 1989). Dependiendo de la forma en que sean presentados los antígenos, se desarrollará la

respuesta celular, a partir de ese momento se desencadena una cascada de eventos movida por la actividad celular y las citocinas (Chiodini, 1996a; Edwards y Kirkpatrick, 1986)

Los macrófagos infectados pueden procesar algunos productos bacterianos y presentarlos al sistema de células T mediante el Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) clase II, activando principalmente linfocitos T CD4+, aunque también puede ocurrir a través del MHC clase I cuando *Map* logra escapar al citoplasma, entonces los T CD8+ se activan, y se convierten en los responsables de la resistencia (Kauffman, 1995; Munk, 1990; Navarro *et al.*, 1998; Stabel, 1999).

Los macrófagos activados actúan mediante la explosión respiratoria y la cascada del óxido nítrico, las cuales posteriormente, son mejoradas por citocinas derivadas de los mismos macrófagos y de linfocitos, principalmente el cooperador 1 (Th1) (Stabel, 1999), inmediatamente después, los macrófagos producen interleucina 1 (IL1), factor de necrosis tumoral alfa ( $FNT\alpha$ ) y factor estimulante de colonias de neutrófilos (MG-CSF), los cuales aparentemente tienen un efecto autócrino para eliminar a la bacteria (Nathan, 1987). La IL-1 estimula la activación de los linfocitos Th1 cuando se les presenta el antígeno, a su vez, estas células liberan IL-2, retroalimentando así la expansión de linfocitos CD4+ y CD8+ (Edwards y Kirkpatrick, 1996). Otras citocinas producida por los CD4+ son: la IL-6, IL-8, el interferón gamma ( $IFN\gamma$ ), el factor de necrosis tumoral beta ( $FNT\beta$ ), cuya acción es dirigir la función de la respuesta celular. Asimismo el  $IFN\gamma$  limita el crecimiento intracelular de las bacterias e incrementa la fagocitosis (Zaho *et al.*, 1996; Zurbrick *et al.*, 1987); ésta es una citocina básica para la resistencia a la infección de la micobacteria (Cooper *et al.*, 1995). El  $TNF\alpha$  pudiera tener actividad bacteriostática y bactericida, pues se ha observado en estudios de crecimiento *in vitro* con *M. tuberculosis* (Stable, 1994, Clarke, 1997a). Además de su acción quimiotáctica, la IL-2 parece tener un efecto directo sobre la capacidad de fagocitosis de los macrófagos (Hubbard y Collins, 1991).

Hay evidencia desde hace tiempo, que son principalmente los linfocitos T CD4+ y CD8+ los involucrados en la resistencia a las micobacteriosis, pero estudios más

recientes han encontrado que en la inmunidad de la tuberculosis también tienen relevancia los linfocitos T gama/delta ( $\gamma\delta$ ), que responden fuertemente a los componentes de las bacterias produciendo principalmente  $\text{IFN}\gamma$ , así como IL-2 y el MG-CSF y no requieren de la presentación por medio del MHC I y II (Follows *et al.*, 1992; Munk *et al.*, 1990; Stabel, 1999). Los linfocitos T CD4+ alfa/beta ( $\alpha/\beta$ ) son los principales productores de citocinas, especialmente la IL-12, la cual ha demostrado en estudios recientes, jugar un papel primordial en la resistencia a la infección con micobacterias, pues promueve la proliferación de linfocitos Th1, así como la producción de  $\text{IFN}\gamma$ , éste a su vez estimula la secreción de más IL-12. Asimismo, se demostró que al neutralizar la monocina, se reducía la capacidad del animal para controlar el crecimiento de la bacteria (Cooper *et al.*, 1995). También se ha encontrado que las células T CD8+  $\alpha/\beta$  pueden producir  $\text{IFN}\gamma$  y contribuyen a la activación de macrófagos (Kauffman, 1995). No obstante, Navarro *et al.*, 1998 sugieren que cuando la enfermedad progresa y hay lesiones más severas, puede deberse a una respuesta ineficiente atribuible a los linfocitos CD8+ que disminuyen la actividad de los CD4+ y por lo tanto la de los macrófagos. Por su parte, Little *et al.*, 1996 observaron que en las lesiones tuberculoides había mayor cantidad de CD4+ y  $\gamma\delta$ , mientras que en las lepromatoides, encontraron pocos linfocitos CD4+ y aunque no en un número muy elevado, predominaban los CD8+, también se incrementó la cantidad de los  $\gamma\delta$ . Por los estudios que se han llevado a cabo en ratones con cepas resistentes y sensibles a las infecciones por micobacterias, se ha planteado la hipótesis de que los animales que solamente desarrollan una respuesta de tipo Th1, son los que resisten la enfermedad, mientras que los que evolucionan a una respuesta Th2 son los que ceden a la enfermedad (Sweeney, 1996b). Por otro lado, se demostró en un estudio de Bassey *et al.*, 1996, mayor proliferación de linfocitos CD4+, CD8+ y  $\gamma\delta$  en becerros no infectados con respecto a los infectados, al ser estimulados con fitohemaglutinina como mitógeno, sin embargo, al medir el  $\text{IFN}\gamma$  producido, no hubo diferencias por grupo, sugiriendo una liberación complementaria en los bovinos infectados. Debido a que en este experimento los linfocitos  $\gamma\delta$  casi no produjeron  $\text{IFN}\gamma$ , los autores sugieren, que no es

probable que desempeñen un papel importante en la protección de los animales jóvenes, en los cuales abundan estas células. Estas conclusiones son contrarias a los hallazgos de otras investigaciones en que se ha demostrado la importante producción de esta citocina por parte de los linfocitos  $\gamma\delta$  (Follows *et al.*, 1992). Sweeney *et al.*, 1996a halló que la producción de IFN $\gamma$  en vacas infectadas pero asintomáticas y con bajas cargas bacterianas en heces, era significativamente mayor que la de vacas clínicamente enfermas y eliminando abundantes micobacterias, resultados que se repitieron y han sido comprobados en varios estudios (Clarke, 1996b; Stabel *et al.*, 1996), hallando además que esta monocina incrementa la capacidad de fagocitosis de bacterias (Zhao *et al.*, 1996). Como ya se mencionó otras citocinas pueden jugar un papel importante en la patogenia. Se ha descubierto un incremento en el FNT $\alpha$  en ovinos con manifestaciones clínicas de la enfermedad con respecto a los controles (Alzuherri *et al.*, 1994). Sin embargo, Stabel, 1995 evaluó la misma citocina en bovinos con PTB clínica y subclínica, los hallazgos fueron que el FNT $\alpha$  se encontraba en mayor cantidad en los animales sin manifestaciones, respecto a los controles y los clínicamente enfermos, la autora sugiere que la enfermedad puede avanzar en la medida que se disminuye la monocina, siendo determinante en la protección de los animales. Posteriormente la misma autora investigó la acción del FNT $\alpha$  sobre los macrófagos, mostrando que si bien éste incrementaba la fagocitosis e inhibía el crecimiento de las bacterias dentro de las células, dependía de la cantidad y tiempo de infección, y aunque los resultados no fueron consistentes, parece haber una tendencia a que una dosis muy alta a corto plazo no mejora la acción de los macrófagos, pero sí lo logra a mayor tiempo (Stabel, 1996).

También se ha demostrado que existen mecanismos citolíticos en la respuesta inmune, mediada por células asesinas naturales (NK) y por una destrucción inespecífica dada tanto por las células  $\gamma\delta$  como por las  $\alpha/\beta$  (Bercovier, 1996; Kauffman, 1988). Las primeras son atraídas hacia el sitio de inflamación después de la descarga de antígeno, por lo cual son las que se encuentran en mayor proporción en las reacciones locales (Munk *et al.*, 1990). La acción de las células NK se ve potenciada por el IFN $\gamma$

(Edwards y Kirkpatrick, 1996). La investigación de Zhao y Collins, 1994, demostró una menor cantidad de linfocitos T  $\gamma/\delta$  y de neutrófilos en circulación periférica, sin embargo los autores sugieren que pueda deberse a que estas células se congregan de manera local en los tejidos afectados. Con respecto a los neutrófilos, Faldyn *et al.*, 1999, descubrieron que cabras adultas infectadas con *Map* pero sin manifestaciones clínicas, contaban con una mayor población de éstas células comparadas con los linfocitos.

Durante la primera etapa de la enfermedad, se presenta una respuesta de tipo celular, caracterizada por una reacción de hipersensibilidad de tipo IV, generada por los linfocitos Th1 y las citocinas que secretan, pero conforme la PTB avanza a un estado clínico, se desarrolla más una respuesta dada por el estímulo a linfocitos Th2, por lo cual empieza a predominar la liberación de citocinas IL-4, IL-5, IL-6, e IL-10, las cuales estimulan una respuesta de tipo humoral, mientras declina la primera respuesta (Bercovier, 1996; Stabel, 1999; Sweeney, 1996b; Zhang *et al.*, 1995). Little *et al.*, 1996 sugieren que la persistencia de la enfermedad podría deberse a un desbalance entre las subpoblaciones linfocitarias, debido a que existen retroalimentaciones entre las citocinas producidas y las células que las generan.

La inmunidad humoral no protege a los animales contra la enfermedad, por lo cual la mediada por linfocitos Th1 es esencial para mantener bajo control la infección (Clarke *et al.*, 1996<sup>a</sup>; Stabel, 1999; Sweeney, 1996b). En un estudio de Clarke *et al.*, 1996<sup>a</sup>, se clasificó a los animales en dos grupos de acuerdo a la respuesta inmune que presentaban: el primero caracterizado por un predominio de la inmunidad celular, con baja respuesta humoral, y altos niveles de IFN $\gamma$  y de IL-2, típico de una respuesta inmune de Th1. El segundo grupo con una baja inmunidad celular, elevada respuesta humoral, niveles bajos de IL-2 y de IFN  $\gamma$ , considerado como respuesta inmune de Th2. La inmunidad observada depende del tiempo, ya que inicialmente se desarrolla la repuesta inmune mediada por células y conforme la enfermedad progresa, se inicia la humoral, presentándose una relación inversa entre los dos tipos de inmunidad (Chiodini 1996a).

Las lesiones del intestino ocasionan que se presente un incremento en la permeabilidad del intestino, por lo cual se pierden proteínas, de 11 a 21 % de pérdida de nitrógeno (Chiodini, 1984a, Rubin *et al.*, 1999). El animal se mantiene en un estado de catabolismo debido a la presencia del FNT $\alpha$  y se presenta emaciación (Clarke, 1997<sup>a</sup>; Silva y Faccioli, 1988). La diarrea es un signo característico debido a las lesiones del intestino, aunque, no se presenta de manera constante en pequeños rumiantes (Hole, 1958). La mala absorción del intestino causada por la lesión, no parece ser un factor esencial en la patogenia de esta enfermedad, pues en un estudio realizado por Juste *et al.*, 1992, no se observaron diferencias en la digestibilidad de animales con paratuberculosis frente a animales sin PTB. Otros signos que suelen presentarse son la deshidratación, anemia y disminución gradual de la producción láctea (Fodstad y Gunnarsson, 1979).

## **8. Lesiones anatomopatológicas**

La patogenia de la paratuberculosis se desarrolla principalmente por la reacción inmunológica del huésped más que por el agente mismo, ya que no se conoce que cause daño o destrucción directa, sino que ocurre la multiplicación y la supervivencia de la bacteria en presencia de una elevada cantidad de citocinas, que mantienen la reacción produciendo lesiones inflamatorias crónicas (Bendixen, 1978; Clarke 1997a Chiodini, 1984). La enfermedad se relaciona con una hipersensibilidad tipo IV, cuya reacción inflamatoria resulta en un engrosamiento del tejido intestinal, comprometiéndose la vascularización y el drenaje linfático. En términos generales, la lesión típica de PTB en intestino y linfonodos es granulomatosa, caracterizada por la presencia de macrófagos, linfocitos T, células epitelioides y células gigantes multinucleadas, éstas últimas rara vez se encuentran en pequeños rumiantes, hay ausencia de necrosis y fibrosis (Chiodini, 1996; Kreeger, 1991).

### **8.1 Lesiones Macroscópicas**

Sólo pueden observarse las lesiones macroscópicas cuando la enfermedad se encuentra en una fase avanzada, encontrándose caquexia, atrofia muscular y

degeneración grasa (Bernabé *et al.*, 1991; Clarke y Little, 1994; Pérez *et al.*, 2000). Puede haber edema en tejido subcutáneo y líquido seroso en cavidades, principalmente ascitis (Pérez *et al.*, 2000). Se aprecian alteraciones en intestino delgado, principalmente en las porciones finales y en válvula ileocecal y ocasionalmente en el ciego, en ovinos también se ha encontrado afectada la parte proximal del recto. La lesión es un incremento en el grosor de la mucosa, que se manifiestan con pliegues del tejido (Fodstad y Gunnarsson, 1979; Clarke y Little, 1994; Pérez *et al.*, 2000). En ovinos se ha descrito una apariencia granular rojiza en el intestino o petequias en la mucosa cercana a válvula ileocecal además de una pigmentación amarilla-anaranjada en las lesiones (Clarke y Little 1994; Karpinski y Zórawski, 1975). En las porciones afectadas puede aparecer linfangiectasia sobre la serosa intestinal y el mesenterio, hasta los linfonodos (Bernabé *et al.*, 1991; Domínguez, 2000). Los linfonodos mesentéricos se ven tumefactos y muy prominentes en el mesenterio, en el interior se aprecia edema, aumento del tamaño medular, aunque suele no diferenciarse bien de la zona cortical con pequeñas nodulaciones blanquecinas, puede mostrar un color diferente como marrón (Bernabé *et al.*, 1991; Fodstad y Gunnarsson, 1979; Pérez *et al.*, 2000; Vélez *et al.*, 1999a). También se puede encontrar en forma secundaria, granulomas hepáticos, mientras que en bovinos hay mineralización del endocardio y aorta (Kreeger, 1991; Pérez *et al.*, 2000; Vélez *et al.*, 1999a).

## 8.2 Lesiones Microscópicas

Las lesiones microscópicas pueden ser apreciadas desde etapas muy tempranas de la enfermedad. En infección experimental, Payne y Rankin, (1961) describieron lesiones desde un mes posterior a la infección, aunque fueron raras y muy difíciles de detectar, pues se trataba únicamente de células multinucleadas tipo Langhans dispersas. Se observan pequeños focos granulomatosos en la submucosa alrededor de las placas de Peyer, que van creciendo y confluyendo, desplazando el tejido linfoide y llegando hasta la lámina propia generando enteritis granulomatosa difusa (Chávez, 1992; García-Marín *et al.*, 1994, Nisbet *et al.*, 1962; Sigurdardóttir *et al.*, 1999). El

engrosamiento de la pared intestinal se debe al infiltrado granulomatoso, principalmente en la submucosa y la lámina propia (Fodstad y Gunnarsson, 1979, García-Marín *et al.*, 2000), que provoca un ensanchamiento y aplanamiento de las vellosidades intestinales y en casos graves fusión de las mismas (García-Marín *et al.*, 2000). Aunque básicamente se encuentra un infiltrado mononuclear, en algunas lesiones de ovinos se han encontrado polimorfonucleares, eosinófilos y algunos neutrófilos en las criptas de Lieberkuhn, que podrían no estar asociados a la PTB (Nisbet *et al.*, 1962). En casos graves se observa linfangiectasia e inflamación de la serosa (Bernabé *et al.*, 1991; Domínguez, 2000). Una de las lesiones más características se encuentra en los linfonodos mesentéricos, observándose áreas con cúmulos de macrófagos, células epitelioides y gigantes en la zona cortical que confluyen. En la médula, pueden encontrarse bacilos ácido-alcohol resistentes en su interior, aunque el hallazgo es intermitente y depende del tiempo postinfección. En cabras, es muy raro encontrar células gigantes (Bernabé., 1991; Fodstad y Gunnarsson, 1979; Payne y Rankin, 1961; Vélez *et al.*, 1999a). Sin embargo en las etapas iniciales de la enfermedad, no es común encontrar cambios en los linfonodos, y cuando son hallados se observan pequeños focos granulomatosos en la zona cortical (Sigurdardóttir *et al.*, 1999). Otros hallazgos descritos, son lesiones como lipidosis hepática así como algunos cambios en el encéfalo (Rubin *et al.*, 1999), en examen histopatológico de cabras infectadas naturalmente se ha descrito un infiltrado mononuclear periportal y microgranulomas y un animal con hepatitis granulomatosa con presencia de células gigantes (Bernabé *et al.*, 1991; Vélez *et al.*, 1999a).

Varios investigadores han clasificado las lesiones producidas por PTB, en ovinos, Pérez *et al.*, 1996 publicaron un trabajo en rebaños infectados, donde se consideraron los hallazgos a la necropsia de animales sacrificados por motivos diversos. Se establecieron tres grados de lesiones, donde el Tipo 1 es el más leve con granulomas pequeños, delimitados en placa de Peyer ileocecal, el Tipo 2 con granulomas delimitados que se encuentran también en mucosa adyacente a al tejido linfoide y el Tipo 3 el más severo, que consta de granulomas difusos localizados en placa de Peyer y en mucosa asociada y no al tejido linfoide. Éste último, además consta de otros tres

subtipos, dependiendo del sitio del daño y del tipo de respuesta presente: el 3<sup>a</sup> multifocal delimitado, el 3b con granuloma difuso no linfocítico y el 3c lesión difusa linfocítica, con bacterias abundantes (Pérez *et al.*, 1996; Juste *et al.*, 2000b). La descripción completa de estas lesiones se encuentra en el Anexo

## 9. Diagnóstico

Anteriormente el diagnóstico de la PTB se llevaba a cabo por la presentación de signología en los animales, las otras opciones que se han empleado como el aislamiento a partir de heces o de tejidos como el intestino, sólo se hacían para la confirmación, de la enfermedad (Hietela, 1992), sin embargo el problema radica en lograr diagnosticar la enfermedad en la etapa subclínica (Jørgensen, 1987). Poco a poco fue tomando mayor importancia la realización de un diagnóstico temprano. Sin embargo, hasta ahora sigue sin existir una prueba lo suficientemente confiable, especialmente para detectar la enfermedad en sus inicios (Collins, 1996; Hietela, 1992; Whittington, 1999). En la actualidad, los esfuerzos de la investigación se han intensificado en la búsqueda de pruebas seguras, prácticas y redituables para el diagnóstico de la PTB (Collins, 1996; Eamens, 1996).

En términos generales, las diferentes técnicas pueden ser clasificadas en varios grupos:

### 9.1 Métodos para la identificación del agente etiológico.

#### 9.1.1 Cultivo bacteriano

El aislamiento bacteriano mediante el cultivo de *Map* ha sido la prueba más confiable desde que se descubrió la enfermedad y aun continua utilizándose ampliamente para la identificación de la bacteria y por tanto de la enfermedad, así como prueba control para otros métodos (Hietela, 1992; Wittington, 1999).

El cultivo bacteriano se puede lograr a partir de heces o bien del tejido de los animales afectados, principalmente de yeyuno e íleon y de linfonodos mesentéricos (Collins, 1996). No obstante, las técnicas para llevarlo a cabo no se han podido estandarizar, desde el medio de cultivo que se puede usar, como el de Löwnstein-Jensen que se

usa principalmente en Europa, más que el de Herrold con yema de huevo utilizado ampliamente por los laboratorios en E.U.A. (Collins, 1996; Eamens, 1996). En un estudio realizado por Juste *et al.*, 1991 comprobaron que las bacterias provenientes de diversas especies tienen diferentes exigencias en su crecimiento, mientras que las *Map* de origen bovino crecieron mejor en el Herrold con piruvato de sodio, las provenientes de pequeños rumiantes sólo pudieron aislarse en Löwenstein-Jensen sin piruvato.

Es necesario descontaminar las muestras empleadas para el aislamiento, por lo cual se ha utilizado durante mucho tiempo el cloruro de benzalconio y otros desinfectantes (Riemann y Abbas, 1983) sin embargo, más recientemente se han logrado buenos resultados con el cloruro de hexadecilpiridinium (HCP) para la descontaminación de muestras (Eamens, 1996). Asimismo, no se logra el crecimiento de *Map* si no se agrega micobactina al medio de cultivo. Anteriormente la carencia de micobactina se contrarrestaba mediante la adición de un extracto de *M. phlei*, al medio, posteriormente se encontró que añadiendo alguna fuente directa de hierro en el medio, era suficiente para el crecimiento de la bacteria a pesar de la carencia de micobactina (Riemann y Abbas, 1983). Las variaciones en las condiciones del medio de cultivo pueden afectar la detección de la bacteria especialmente cuando se encuentra en pocas cantidades (Eamens, 1996). Además de ser específico, el cultivo bacteriano tiene la ventaja de que permite identificar a los animales que están eliminando la bacteria, cuando el aislamiento es a partir de heces y se identifican a los individuos transmisores (Collins, 1996).

El principal inconveniente para este método es que el periodo de incubación es muy largo, un cultivo primario puede llevar de 9 a 12 semanas para que se desarrollen colonias visibles (Riemann y Abbas, 1993), aunque algunos autores han logrado el aislamiento desde las 3 semanas, un cultivo no debe ser dado por negativo antes de 16 semanas (Ramírez, 1982), incluso hay quien ha mantenido los cultivos por 15 meses, investigaciones (Pérez, *et al.*, 1996). Por otro lado, se encuentra el problema de que la eliminación de *Map* en heces ocurre de manera intermitente y en etapas tempranas o durante la infección subclínica, se eliminan cantidades pequeñas de

bacterias, lo que hace más difícil su aislamiento, de manera que el cultivo negativo no puede ser un resultado definitivo (Hietela, 1992), la sensibilidad de esta prueba en un hato infectado naturalmente es del 50%. Una desventaja más para el cultivo bacteriano es el alto costo de la prueba (Collins, 1996).

Algunos esfuerzos se han encaminado a realizar el cultivo bacteriano de una manera más rápida y sencilla, tal es el caso del cultivo utilizando una técnica radiométrica, la cual aventaja a la anterior en rapidez y sensibilidad (Hietela, 1992). Esta nueva técnica se basa en el cultivo en un medio líquido especial que contiene un radioisótopo como marcador, para medir el CO<sub>2</sub> que se desprende del metabolismo de la bacteria, cuando ésta crece en el medio, aún antes de que se observen las colonias, por lo que un cultivo negativo se puede descartar a las 7 semanas de incubación. Este sistema radiométrico es conocido como el sistema BACTEC,<sup>2</sup> sin embargo tiene un alto costo, por lo que sólo algunos laboratorios especializados cuentan con él, utilizándose a escala experimental (Collins, 1996; Hietela, 1992).

Como una manera de disminuir costos en rebaños ovinos muy grandes, Whittington, 1999 llevó a cabo el cultivo fecal a partir de una mezcla de heces de muchos animales de la misma granja. Se encontró que aun mezclando heces de animales conocidos positivos con negativos, era posible lograr el aislamiento, más aún, al evaluar esta técnica con prueba de IDGA, se observó que la primera detectó 14 rebaños positivos, mientras que la segunda solamente en 4 rebaños hubo resultados positivos.

### 9.1.2 Examen microscópico

La identificación de la bacteria también puede llevarse a cabo en un examen microscópico directo, con muestras teñidas mediante el método de Ziehl-Neelsen, ya sea en una biopsia de la mucosa rectal o a partir de heces. Estas pruebas han sido ampliamente utilizadas en bovinos, sin embargo existe el inconveniente de que el resultado negativo no es seguro por los mismos motivos del cultivo fecal, además de que suele ser difícil la observación por el tamaño pequeño y porque tienden a agruparse, perdiendo la forma de bacilos. Contrario a lo que ocurre en el cultivo

bacteriano, el resultado positivo tampoco es definitivo, ya que otras bacterias ácido-alcohol resistentes habitan normalmente el tracto gastrointestinal, aunque con alguna experiencia pudieran ser descartadas (Hietela, 1992).

### 9.1.3 Histopatología

Asimismo, el examen microscópico para la detección de la bacteria puede realizarse mediante el uso de técnicas de histopatología con tinción de Ziehl-Neelsen (Riemann y Abbas, 1983), para ello es muy importante contar con las muestras de tejidos adecuadas, es decir de sitios específicos del intestino de los animales donde hay placas de Peyer, principalmente en íleon distal y válvula ileocecal, pues de esta manera se reduce el costo de la prueba, que es una de las desventajas que tiene (Marshall *et al.*, 1999). Igual que la observación de bacterias ácido-alcohol resistentes en heces, tampoco es una prueba definitiva el hallazgo de algunos bacilos en las muestras de tejidos, pues pudiera tratarse de micobacterias saprófitas. Otro inconveniente importante de esta técnica es que dependiendo del patrón de lesión que se desarrolle en el animal, será la facilidad para encontrar bacterias. En términos generales, se han clasificado en lesiones de tipo lepromatoide o multibacilar, con gran cantidad de *Map* y tuberculoide o paucibacilar con pocas o ninguna bacteria (Clarke *et al.*, 1996c). En un trabajo realizado por Bastianello y Huchzermeyer en 1994, encontraron que aproximadamente el 30% de las borregas con lesiones características de PTB, eran positivas con Ziehl-Neelsen.

### 9.1.4 Pruebas genéticas

Los métodos más recientes en el diagnóstico de la PTB se han dado en la detección de la bacteria, mediante pruebas genéticas. El avance más importante se dio cuando se identificó un elemento de inserción del ADN de *Map* designado como IS900, este puede detectarse mediante técnicas de hibridización o de reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés). Esta prueba tiene una especificidad del 100%, pues no se ha podido identificar el fragmento en ninguna otra bacteria

---

<sup>2</sup> Becton Dickinson Laboratories, Inc, Sparks, MD.

(Bauerfeind *et al.*, 1996; Collins *et al.*, 1990; Collins, 1996). Tiene además todas las ventajas encontradas en el cultivo bacteriano, pero además, con esta prueba se obtienen resultados rápidamente, todo el proceso lleva 3 días. Algunas desventajas para esta prueba son que la sensibilidad es menor que el cultivo, ya que se requiere aproximadamente  $10^3$ - $10^4$  microorganismos por gramo, para lograr la identificación (Collins, 1996; Hietela, 1992). Se han hecho numerosos intentos por mejorar la sensibilidad, pues en animales poco eliminadores, la prueba es poco eficiente (Eamens, 1996).

En un trabajo reciente, Garrido *et al.*, (1999) utilizaron varias técnicas para la concentración y purificación de *Map*, logrando una sensibilidad de 94% y una especificidad de 92% en la prueba de PCR para muestras fecales de ovinos. En otro estudio realizado por Gwózdź *et al.*, (1997), el hallazgo fue que es importante el órgano de la muestra para lograr mejores resultados en la sensibilidad, siendo alta con muestras de íleon e hígado y baja en linfonodos y sangre. Otra desventaja es el costo de la prueba que probablemente similar al del (Collins, 1996; Hietela, 1992).

## 9.2 Métodos para la detección de la respuesta inmune celular.

La respuesta inmune de los animales infectados mediada por linfocitos T, la cual va decreciendo conforme avanza la enfermedad, mientras que se incrementa la respuesta humoral (Collins, 1996). Debido a lo anterior, es que las pruebas destinadas a determinar la respuesta celular, son de mayor utilidad en etapas tempranas de la PTB. Por el contrario, cuando existe una manifestación clínica, los resultados positivos a éstas pruebas decrecen (Hietela, 1992).

### 9.2.1 Prueba de intradermorreacción (IDR).

Ésta mide una hipersensibilidad retardada cuando se aplica un antígeno por vía intradérmica. El animal sensibilizado desarrolla una respuesta local que se manifiesta con un engrosamiento de la piel de 48 a 72 h después de la aplicación (Collins, 1996; Hietela, 1992; Riemann y Abbas, 1983). Hay varias posibilidades para la IDR en el diagnóstico de la PTB, una de ellas es la aplicación de la tuberculina doble

comparativa o únicamente la aplicación de *M. avium*. Asimismo, se ha desarrollado una prueba específica llamada Johnina, en la que el antígeno que se aplica procede de *Map*. Ninguna de las opciones ha tenido suficiente éxito. En el caso de la Johnina, lo más probable, es que se deba a que la bacteria tiene más antígenos en común con las micobacterias saprófitas dando falsos positivos, mientras que resultados falsos negativos podrían deberse a que la Johnina produce una desensibilización local temporal (Collins, 1996; Kreeger, 1991). En general, las reacciones cruzadas son la causa fundamental de los resultados falsos positivos, principalmente con *M avium*, aunque también pueden ocurrir con micobacterias no patógenas (*Mycobacterium spp*) o con otras bacterias del orden de los Actinomicetales, como la *Nocardia asteroides*, *Actinomyces spp*, *Dermatophilus spp*, *Streptomyces spp* y *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Juste, 2000a) pues las preparaciones pueden contener antígenos comunes (Chiodini, 1984; Hietela, 1992; Ralph, 1989) Comparada con otras pruebas, la sensibilidad no es mayor del 55% mientras que la especificidad va de 35 a 45% (Pavlik *et al.*, 1999b; Riemann y Abbas 1983). En caprinos los resultados tampoco han sido adecuados, ya que proporcionan una sensibilidad media, encontrándose hasta un 50% de falsos positivos (Elsken *et al.*, 1965). No obstante los inconvenientes que tiene, ésta puede ser utilizada como una prueba tamiz o para evaluar los programas de control (Hietela, 1992), asimismo, tiene gran utilidad cuando se aplica con exámenes serológicos. En un trabajo realizado por Collins *et al.*, 1984, la sensibilidad lograda en conjunto con la prueba de Contraímuno-electroforesis (CIE) fue del 83 %, con una especificidad cercana al 100%.

### 9.2.2 Aplicación de un antígeno intravenoso.

Como una variante de la IDR, se instrumentó una forma sistémica, con aplicación intravenosa de los antígenos empleados en ella, en cuyo caso se evalúa el incremento de la temperatura corporal unas horas después de la inyección, o bien se mide la relación entre neutrófilos y linfocitos antes y después de la aplicación de la Johnina (Riemann y Abbas, 1983).

Para cualquier clase de prueba del tipo de hipersensibilidad retardada existe el problema de que los animales no tienen una respuesta persistente y pueden volverse anérgicos (Riemann y Abbas, 1983).

En vista de todos los problemas que tiene la IDR para medir la respuesta inmune celular, está siendo reemplazada por ensayos *in vitro* para determinar la presencia de citocinas producidas por los linfocitos sensibilizados (Collins, 1996).

### 9.1.3 Transformación Blastoide [Linfocitaria (TL)].

Esta prueba se basa en la medición de la respuesta blastogénica de los linfocitos ante un estímulo antigénico específico, cuantificando la cantidad de timidina tritiada, precursor de DNA, que incorporan los linfocitos.

En 1977 y 1978, Buergelt *et al*, utilizaron la TL en animales infectados naturalmente y encontraron sensibilidad y especificidad superior a las pruebas convencionales con 40-60% y 84% respectivamente. Johnson *et al.*, (1977), trabajaron con animales infectados experimentalmente, hallaron que el 100% de los infectados fueron detectados a los 112 días postinfección, con mejores resultados que con otros análisis. Jørgensen (1987) hace referencia a la importancia en el uso de esta prueba en etapas iniciales de la infección, cuando los animales excretan pocas bacterias.

### 9.1.4 Inhibición de la migración linfocitaria.

Es otra prueba *in vitro* para detectar la inmunidad celular, la cual se basa en la medición de la inhibición de la migración de macrófagos en un gel, por la secreción de citocinas producidas por los linfocitos estimulados (Riemann y Abbas, 1983) Aunque los primeros ensayos se realizaron desde 1964, esta prueba no ha sido muy utilizada en el diagnóstico de la PTB.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 9.1.5 Detección de Gamma Interferón (IFN- $\gamma$ )

Fue el primer examen para citocinas que se desarrolló, pues los estudios mostraron que la exposición a las micobacterias (*M. bovis*), estimulaba a los linfocitos T para sintetizar IFN $\gamma$  en grandes cantidades (Ralph, 1989). La prueba consiste en estimular muestras de linfocitos circulantes con un derivado proteico purificado de *M. avium* y medir la liberación de IFN $\gamma$  mediante una ELISA con anticuerpos monoclonales contra esa citocina. (Collins, 1996). La prueba detecta animales infectados durante la etapa subclínica de la enfermedad. Stabel, 1996 encontró que las vacas que no manifestaban signología tenían niveles de IFN $\gamma$  significativamente mayores que vacas clínicamente enfermas y no infectadas. Sin embargo, Billman-Jacobe *et al.*, 1992 habían encontrado que la sensibilidad para detectar vacas subclínicas era de 70 a 93%, incrementándose hasta el 100% para animales clínicos. Por otra parte se ha denunciado que el empleo de la prueba de IFN $\gamma$  en animales infectados artificialmente es variable, con diferentes respuestas a lo largo del tiempo, aunque funciona mejor para la fase inicial de la infección, que las pruebas serológicas (Eamens, 1996). También Pérez *et al.*, 1994 la emplearon en corderos infectados experimentalmente, la prueba fue capaz de detectar a los animales durante la fase inicial de la enfermedad, pero los resultados no fueron constantes.

El producto de estos estudios es de gran importancia por la posibilidad de detectar animales con PTB subclínica, en etapa temprana y llevar a cabo un mejor control de la enfermedad. Además del costo que tiene la prueba, un inconveniente es la dificultad de trabajar las muestras pues no debe exceder en 16 h después de la obtención de sangre con heparina, para efectuar la estimulación (Collins, 1996).

### 9.2 Métodos para la detección de anticuerpos

Son muchas las técnicas que han sido probadas para la detección de anticuerpos contra *Map* en el suero de los animales infectados, algunas de ellas se han utilizado con mayor frecuencia (Collins, 1996).

A pesar de los esfuerzos por encontrar la mejor prueba serológica, siempre ha existido el inconveniente de que los niveles de la respuesta humoral se incrementan en animales ya con curso avanzado de la enfermedad, coincidiendo con la aparición de lesiones macroscópicas, apenas un poco antes de la manifestación de signos clínicos, momento en el cual ya se excretan numerosas bacterias al ambiente y se puede intentar el aislamiento a partir de heces (Collins, 1996; Chávez, 1993; Hietela, 1992). Casi siempre coincide la elevación de anticuerpos séricos con el inicio de la eliminación de bacterias en heces, así como con la caída de la respuesta inmune celular (Hietela, 1992), cuando ésta falla, son los anticuerpos los encargados de controlar la infección, aunque nunca lo logran y la contaminación ambiental crece aumentando la posibilidad de infectar nuevos animales (Ralph, 1989).

Por otra parte, estas pruebas son indicativas de que el animal ha estado expuesto al agente, pero no aseguran que padezca la enfermedad.

#### 9.2.1 Fijación de Complemento (FC).

A pesar de que ha sido ampliamente utilizada en ganado vacuno como prueba tamiz en Europa y se ha venido estudiando casi desde la identificación de la enfermedad, se ha demostrado que no es confiable para la detección de animales subclínicos (Collins, 1996; Goudswaard y Terporten-Pastoors, 1972). Los anticuerpos son detectados cuando ya se presentan los signos, pero decrecen al avanzar la enfermedad, encontrándose falsos negativos, hasta en un 60%, obtenido por Buergelt *et al.*, 1977.

#### 9.2.2 Inmunodifusión en Gel de Agar (IDGA).

Las características importantes de esta prueba de precipitación son su bajo costo y su sencillez, es utilizada en bovinos, ovinos y caprinos (Hietela, 1992). Los resultados obtenidos han mostrado que es aplicable en animales con infección clínica, con sensibilidad aproximada al 50%, ya que en animales subclínicos disminuye hasta menos del 30% (Goudswaard y Terporten-Pastoors, 1972; Hietela, 1992). En 1968 Merkál *et al.* encontraron buenos resultados en ovinos. En la aplicación de IDGA en caprinos, Pérez *et al.*, 1994 obtuvieron resultados positivos desde el día 120

postinfección, pero de manera inconsistente, relacionada siempre con lesiones severas o difusas. Más recientemente, Vélez, 1998 obtuvo mejores resultados aplicando IDGA cabras infectadas naturalmente que con otras pruebas.

### 9.2.3 Inmunoensayo Enzimático (ELISA).

La prueba serológica más utilizada y en la cual se han enfocado la mayoría de los esfuerzos por mejorar los resultados, es la de ELISA (Eamens, 1996). En términos generales esta prueba se ha caracterizado por su alta sensibilidad y especificidad, así como por ser rápida y económica, siendo en la mayoría de los casos superior a las otras técnicas (Sánchez-Vizcaíno y Cambra, 1987), sin embargo, como en las demás pruebas serológicas, el ELISA no ha dado buenos resultados en el diagnóstico de la PTB. Algunos de los primeros hallazgos mostraron sensibilidad que podía ir desde el 40 hasta el 75%, con especificidad del 90%, igual que en otras pruebas serológicas, los resultados se ven afectados por el grado de afección de los animales (Pavlik *et al.*, 1999b). Clarke *et al.*, 1996c, obtuvieron sensibilidad del 86% en borregas con lesión de tipo multibacilar, muy semejante al resultado obtenido por Billman-Jacobe *et al.*, 1992 donde la sensibilidad en ganado con infección avanzada fue del 80%. En caprinos, Molina *et al.*, 1990 encontraron hasta un 88% de sensibilidad con el 95% de especificidad, al adsorber los sueros con *M. phlei*, ésta se incrementó un 2% pero la primera bajó hasta el 64%. A pesar de los resultados desalentadores, las investigaciones para encontrar un mejor antígeno que aporte resultados superiores en la prueba de ELISA han continuado (Eamens, 1996). Asimismo, los esfuerzos también están encaminados en modificar la técnica mediante la automatización para reducir el tiempo de trabajo (Dimech, 1999).

### 9.2.4 Contrainmuno Electroforesis (CIE)

Esta prueba no ha sido utilizada convencionalmente para el diagnóstico de PTB, sin embargo su aplicación en la tuberculosis humana (Quesada, 1983) es un indicio de que puede ser de gran utilidad para esta enfermedad. Son pocos los estudios que hay al respecto en PTB (Molina *et al.*, 1996; Shome *et al.*, 1996). Oviedo, 1991 encontró que

el empleo de esta prueba en ovinos, es más sensible que IDGA, sin embargo, no logró detectar corderos positivos aún después de dos años de infección experimental. Por su parte, Domínguez, 2000 obtuvo resultados comparables utilizando CIE, IDGA y ELISA, para determinar la presencia de anticuerpos en cabras inmunizadas, con la ventaja de que la CIE reporta resultados en una hora, siendo una técnica fácil y económica.

#### 9.2.5 Pruebas poco utilizadas.

Otros análisis han sido empleados en el diagnóstico, como el caso de anticuerpos fluorescentes que Goudswaard y Terporten-Pastoors evaluaron desde 1972, encontrando que los resultados eran similares a los obtenidos con IDGA. Por su parte, Paliwal *et al.*, 1984, descubrieron que la prueba de anticuerpos fluorescentes era buena para diagnosticar la enfermedad en cabritos en cualquier etapa de la misma. O bien la prueba de Radioinmunoanálisis, que habiendo obtenido sensibilidad del 97% y especificidad del 74% (Warsaae, 1978), no ha sido utilizada para investigaciones en la infección natural.

#### 9.3 Pruebas específicas

Ensayos más especializados se han desarrollado más con fines de investigación que de diagnóstico. Tal es el caso de la detección de diferentes citocinas. Adams *et al.*, 1996, investigaron la expresión del ARN mensajero del FNT- $\alpha$  y la IL-6, encontrando que después de la estimulación *in vitro*, se expresaba igual en becerros infectados natural y artificialmente que en los no infectados.

En general el diagnóstico de la PTB es complicado, ha habido problemas en sensibilidad y eficiencia de algunas pruebas, mientras que otras no están suficientemente desarrolladas, por lo cual no hay una que sea del todo satisfactoria (Bendixen, 1978; Garrido *et al.*, 1999; Kreeger, 1991; Riemann y Abbas 1983). Como consecuencia, los animales portadores no son detectados y continúan diseminando la enfermedad (Hietela, 1992; Kreeger, 1991).

Uno de los conflictos ha sido el diagnóstico de animales portadores o en la etapa silenciosa y subclínica de la enfermedad. Ésto se complica más en el caso de animales resistentes que han estado expuestos al agente etiológico y dan resultados positivos en respuesta celular, pero no presentan lesiones en el examen postmortem (Bendixen, 1978). Asimismo, se dan falsos negativos debido a cierta tolerancia o fenómenos de anergia en individuos en una fase avanzado de la enfermedad (Dunkin 1928), en estos casos se ha sugerido que puede ser causada por la deficiencia de proteínas (Bendixen, 1978). En un estudio realizado por Davis *et al.*, (1974), utilizando la prueba de transformación de linfoblastos, encontró que hay una inhibición en la transformación de los linfocitos por un supresor humoral, por lo cual no responde. Esto ocurre como una retroalimentación negativa para controlar la respuesta inmune y evitar una destrucción excesiva de tejido.

En conclusión, la utilización y eficiencia de las pruebas diagnósticas se basa principalmente en las condiciones de la granja, de la especie de que se trate y de la finalidad que persiga el diagnóstico. Por supuesto, cualquier prueba que se utilice, será más eficiente cuando se toman en consideración los datos de la historia clínica del hato o rebaño, así como el examen clínico y las lesiones encontradas en los animales al practicar la necropsia (Whittington, 1999).

## **10. Control**

A pesar de que la PTB se ha conocido desde hace muchos años, aún continúa investigándose la forma de controlarla (De Lisle, 1996), el control es complicado primeramente por el periodo tan largo en el que los animales se mantienen en etapa subclínica y por el desarrollo paulatino de la etapa clínica (Rossitier y Burhans, 1996). También ha afectado la falta de pruebas que sean totalmente aceptadas y que tengan resultados precisos (Westendorf y Zirkle, 1995). Por otro lado, se requiere que las medidas se lleven a cabo para cada granja en particular, dependiendo de los factores que la rodean, las características del hato, del lugar y la finalidad de los animales, así como de los recursos con los que se cuenten (Collins, 1994; Rossitier y Burhans, 1996).

### 10.1 Tratamiento

La PTB es una enfermedad mortal, por lo que se ha intentado probar diversos antibióticos para eliminar a la bacteria (St. Jean, 1996). A pesar de ello, no existe tratamiento para esta enfermedad, debido a que *Map* es intracelular, requiere antibióticos especiales tales como la isoniazida, la rifampicina y la amikacina; se ha observado que el agente es sensible a algunos de los fármacos usados comúnmente contra la tuberculosis, pero el costo de las drogas y la duración del mismo, hacen que sea poco razonable su utilización en animales (St. Jean, 1996). Más aun, se ha observado que ni aun administrando los antibióticos de forma preventiva, o por largos periodos, es posible evitar la infección y el desarrollo de las lesiones. Además, la enfermedad clínica es una fase terminal, por lo cual los animales pueden responder por algún tiempo al tratamiento y recaer posteriormente, pero siempre continúan eliminando la bacteria (Chiodini, 1984; Gezon *et al.*, 1988; Kreeger, 1991).

### 10.2 Manejo de la granja

Debido al fracaso en el tratamiento los esfuerzos se han enfocado al control de la enfermedad.

Un punto importante para llevar a cabo el control, como en las demás enfermedades de rumiantes, es que debe ser tratada como una enfermedad de hato y no de individuos y es necesario conocer la prevalencia en el hato o rebaño, para decidir las acciones a realizar (Collins, 1994). En general, lo más práctico es mejorar el manejo de la granja, como lotificación de los animales, alimentación adecuada, manejo de excretas, ya que todo productor puede usarlo como su principal recurso, sin una inversión considerable y enfocarse a llevar a cabo una prevención (Rossitier y Burhans, 1996).

Una fase importante para iniciar el control es en la crianza de los animales; ya que es la etapa en la cual hay mayor susceptibilidad, las mejoras que se realicen en el manejo de los animales jóvenes tendrán una repercusión positiva en el control de PTB y otras enfermedades de esta etapa (Collins, 1994). Se debe implementar medidas de higiene

básicas para los corrales de alojamiento como la limpieza periódica, principalmente en los parideros y corrales de recría. Los becerros o crías de otras especies deben separarse de su madre y no debe ser utilizada la leche y calostro de madres con signología de PTB (Rossitier y Burhans, 1996; Stehman, 1996). En general para toda granja, un manejo adecuado de la enfermedad depende de controlar la transmisión que se da por vía oral a través de las heces, principal fuente de infección para los animales, por lo que es importante la disposición adecuada de las mismas, evitando el contacto con los animales susceptibles, mientras más limpios se encuentren los alojamientos, las ubres permanecerán menos contaminadas cuando las crías mamen leche, el estercolero debe ubicarse en un sitio alejado de los corrales especialmente el de animales jóvenes, evitando también la posible contaminación del alimento, un buen diseño de comederos también evita esa contaminación (Collins, 1994; Gezon *et al.*, 1988; Rossitier y Burhans, 1996; Stehman, 1996).

Es básico, independientemente de la estrategia que se tome, el adquirir animales de reemplazo a partir de hatos certificados como negativos, o bien que hayan sido probados por lo menos 2 veces, con diferencia de 6 meses (Larsen, 1950; Rossitier y Burhans, 1996), aunque una mejor recomendación es mantener el hato cerrado (Sockett, 1996b). En este caso, y debido a que puede ser difícil el conseguir rebaños no infectados, es posible mejorar la situación criando reemplazos libres de PTB, a partir de hembras y machos seronegativos (Gezon, 1988).

Cuando los animales se encuentran en pastoreo, se debe llevar a cabo un manejo especial, pues suele ser más problemático, por lo general, el pastoreo intensivo y de alta densidad, incrementa las posibilidades de transmisión. Se debe evitar la fertilización con abono de la granja, mantener libre de contaminación las fuentes de agua y hacer una rotación de potreros adecuada (Gezon, 1988; Stehman, 1996).

De gran relevancia para tratar de controlar la aparición de casos clínicos es mantener una alimentación adecuada de los animales, aunque esto no baja la prevalencia a corto plazo (Collins, 1994).

Otras medidas que deben ser consideradas son el control de fauna silvestre que pueda transmitir la enfermedad, teniendo especial cuidado en los sitios de pastoreo,

también se debe vigilar el contacto con otras especies de rumiantes domésticos (Williams *et al.*, 1983; Riemann y Abbas, 1983; Greig *et al.*, 1996)

Es posible que el tomar todas estas acciones para intentar controlar la enfermedad sean poco prácticas y en muchos casos difíciles de implementar, además de que el avance en el control sería muy lento si sólo se utilizara el mejoramiento del manejo, sin embargo es importante conocerlas de manera que puedan implementarse algunas de ellas en la medida de lo posible, ya que son de utilidad cuando se suman a alguna de las estrategias que se describirán.

### *10.3 Estrategias para la erradicación*

Una de las formas en las cuales se ha tratado de controlar y erradicar la enfermedad desde hace muchos años es la eliminación de los animales enfermos y positivos a las pruebas diagnósticas, sin embargo no siempre ha sido del todo satisfactorio porque toma mucho tiempo la obtención de resultados, además de que es complicado cuando hay seroprevalencia alta de algunos hatos (Saxegaard y Fodstad, 1985). El problema de no contar con una prueba suficientemente confiable parece que ha desaparecido en los últimos años mediante el uso de ELISA o pruebas de PCR para identificar el ADN, sin embargo, pese a su eficiencia, ésta última es aun más cara para poder utilizarse rutinariamente (Collins, 1994; Garrido *et al.*, 1999; Wittington, 1999), otra dificultad para aplicar este método es cuando el hato o rebaño presenta una prevalencia alta.

De cualquier manera para realizar un programa de control de la enfermedad, es necesario hacer pruebas de diagnóstico, aunque el veterinario y el dueño de los animales deben discutir la interpretación de los resultados y las acciones que se tomen a partir de ellos, además de considerar las cualidades de la prueba o pruebas que se decidan emplear (Collins, 1994; Rossitier y Burhans, 1996).

Una de las razones principales de llevar a cabo pruebas de diagnóstico es establecer la prevalencia o una aproximación del número de animales infectados en la granja. A partir de ello se puede establecer la forma en que se manejará la situación (Collins, 1994). La eliminación de todos los animales seropositivos es la forma más efectiva

para reducir la prevalencia con resultados rápidos, también es posible aplicar esta medida a su descendencia, por el riesgo de haber sido infectados desde el nacimiento por la contaminación del ambiente en que se desarrollaron y principalmente de la ubre, así como la posible infección en el útero o a través del calostro (Collins, 1994; Rossitier y Burhans, 1996; Wilesmith, 1981). La aplicación de este método de control dependerá en gran medida de la cantidad de animales positivos, puesto que el sacrificio de los animales implica pérdidas económicas importantes (Rossitier y Burhans, 1996). Sin embargo Elskén *et al.*, 1965 concluyeron en su estudio que la sola eliminación de seropositivos no elimina la PTB del rebaño, pues los animales seronegativos también eliminan bacilos, aunque en menor cantidad, hasta un año antes de seroconvertir, por lo cual es necesario usar por lo menos dos pruebas complementarias.

Debido a lo anterior, se puede optar por eliminar sólo algunos de los animales positivos, iniciando por los que tienen manifestaciones clínicas, ya que son los que eliminan la mayor cantidad de bacterias (Rossitier y Burhans, 1996), por otro lado, se ha observado que las crías de animales infectados tardan al menos 6 meses en iniciar la eliminación de *Map* en las heces, por lo que de ser necesario, los animales podrían permanecer en el rebaño durante un periodo hasta de un año (Jørgensen, 1987). Al mismo tiempo se puede separar a los animales positivos del hato o rebaño, manejándolos por separado mientras pueden ser eliminados, sin embargo, no siempre resulta práctico, dependiendo del número de animales por grupo.

Una alternativa a ésta última acción, puede ser el identificar bien a los animales positivos, de manera que sean considerados para poder llevar a cabo las medidas mencionadas anteriormente. Ésta sería la estrategia a seguir cuando la prevalencia del rebaño es alta y no permita eliminar a los positivos, lo cual puede variar en cada granja desde un 35% en adelante.

Es importante que al decidir llevar a cabo una estrategia, ésta sea complementada con otras medidas. Vélez *et al.*, (1999b) hicieron un estudio para controlar la PTB en dos rebaños caprinos, los resultados expuestos fueron que en donde se eliminaron a los animales seropositivos y se llevaron a cabo las medidas de higiene sugeridas, la

prevalencia se redujo casi al 0%, mientras que en el rebaño donde no se adoptaron las recomendaciones, se incrementó el grado de infección más del doble.

En cualquier estrategia que se lleve a cabo es importante el punto de vista económico, Juste y Casal, 1993 hicieron un ejercicio de simulación del costo-beneficio de diferentes programas de control, incluyendo la inmunización. Los resultados mostraron que el mejor programa era el de la sola vacunación, mientras que las estrategias de eliminación sola y eliminación con vacunación, resultaban más costosas que no intervenir.

#### 10.4 Inmunización

En contraste con lo anterior, la vacunación contra esta enfermedad ha mostrado buenos resultados. La idea fue introducida desde 1926, cuando encontraron que la inyección subcutánea del *M. paratuberculosis*, no ocasionaba la enfermedad. Sin embargo existe controversia con respecto a su eficiencia (De Lisle, 1996). Muchos son los informes respecto a los logros obtenidos a partir de la vacuna. Doyle, 1964 menciona que después de 20 años de vacunación en Francia se ha demostrado la eficiencia en el uso de la vacuna. Las conclusiones de Spears, 1959 después de 15 años de vacunación en Gran Bretaña, publicadas en 1959 coincidieron con el anterior. Otros autores han investigado el efecto de la vacuna en el control de la PTB con resultados similares (Larsen *et al.*, 1978; Stuart, 1965; Wilesmith 1982). Un programa similar fue establecido en Iowa, EUA, por Thoen y Moore, 1989, evaluando durante 6 años, los productores notificaron una disminución significativa en las pérdidas ocasionadas por PTB. Muchos de los esfuerzos han sido encaminados para el control de la enfermedad en ovinos. Larsen *et al.*, 1964 investigaron si los corderos de madres enfermas, desarrollaban la enfermedad después de ser vacunados, el resultado fue que únicamente un animal vacunado desarrolló la enfermedad, contra un 38% de los no vacunados. En Islandia la bacterina redujo en 93 % la mortalidad por paratuberculosis, aplicándola en corderos de 141 granjas durante 3 años, las fallas en la vacuna se estimaron sólo en un 0.6% (Sigurdson, 1969; Stehman, 1996). Cranwell, 1993 apoyó las conclusiones sobre la eficiencia de la vacuna, pues además en el

rebaño en que trabajó, desaparecieron los casos clínicos en 3 años. Aunque con menos estudios, los caprinos no han sido la excepción en la inmunización. En Noruega, la inmunización resultó exitosa al reducir la prevalencia de la enfermedad en cabras de un 53% hasta un 1% (Saxegaard y Fodstad, 1985). Gezon *et al.*, 1988 llevaron a cabo un programa de control en un rebaño caprino mediante inmunización, logrando llevar la incidencia a 0 en un periodo de 8 años.

A pesar de la evidencia, algunos investigadores no concuerdan con la idea de que la inmunización mediante la vacuna es la mejor manera de controlar la PTB (Sockett, 1996a).

La oposición principal a la vacunación está en el hecho de que no protege contra la infección (Chiodini, 1984; Sockett, 1996a). Kalis *et al.*, 1999 encontraron en hatos de Holanda con prevalencias máximas de 30%, que después de 12 años no existía una diferencia significativa en la prevalencia y el número de animales eliminadores, comparando el programa de vacunación con el programa de erradicación al eliminar a las vacas positivas a cultivo fecal. No obstante, numerosos trabajos han revelado que la inmunización, si bien no evita la infección ni elimina a la bacteria de la granja, sí disminuye la incidencia de la enfermedad, ya que el número de animales con enfermedad clínica y eliminadores, sí se ve reducido, también baja la cantidad de individuos con infección intestinal, asimismo disminuye la severidad de las lesiones en animales enfermos. (Aduriz *et al.*, 1994; Pérez *et al.*, 1995; Shaik *et al.*, 1996; Stuart, 1965) mejorando las condiciones de prevalencia y pérdidas económicas (Juste y Casal, 1993; Shaik *et al.*, 1996). García Marín *et al.*, 1996 minimizaron los efectos genéticos al probar la eficiencia de la vacuna en corderos gemelos, los resultados fueron muy favorables para los vacunados con lesiones locales en tejido linfoide, mientras que los no inmunizados, presentaban lesiones difusas en diversas porciones del intestino. En 5 granjas de Holanda se bacterinizaron únicamente los becerros, a partir de los resultados Huttema, 1967 concluyó que la vacuna incrementó la resistencia y aunque no evitó el establecimiento de la enfermedad si fue posible controlarla en un lapso de 8 años.

Contra la vacuna se agrega el problema de que ocasiona un nódulo inflamatorio fibrocáseo, en el sitio de aplicación, el cual persiste durante mucho tiempo y a veces durante toda la vida del animal, especialmente después de la revacunación (De Lisle, 1996; Riemann y Abbas, 1983). La lesión en el sitio de aplicación se debe a la utilización de un adyuvante mezclado con la bacteria. En ovinos puede ser tan grande el estímulo inmune, que repercute en la inspección de la canal (De Lisle, 1996). Sin embargo, en otros estudios se ha observado que la reacción en el sitio de la vacuna es ligera, sin dolor ni debridación (Cranwell, 1993). En términos generales, el nódulo parece ser inocuo, además Larsen *et al.*, 1964 concluyeron que la revacunación no aportaba un beneficio extra por lo que no era recomendable. Algunos estudios han encontrado que puede bajar la producción láctea, de manera similar que en los animales con la enfermedad y que no son vacunados, sin embargo el beneficio sigue siendo mayor (Shaik, 1996).

Otra desventaja es la inoculación accidental en el vacunador, ya que ocasiona una inflamación local severa y persistente, ocasionalmente con reacción sistémica, lo cual puede prevenirse cuidando la técnica de aplicación (De Lisle, 1996).

La inmunización también puede interferir con el diagnóstico, pues los animales se vuelven reactores a la prueba de tuberculina, de tal manera que confunde los resultados en las pruebas para detectar tuberculosis y también se incrementa la respuesta inmune humoral (De Lisle, 1996; Sockett, 1996a). Para otros autores, esto no es de relevancia, ya que el utilizar la doble comparativa, permite identificar a los vacunados y no se confunde con los tuberculosos, pues los animales reaccionan más a la aplicación aviar y disminuye con el tiempo (Doyle, 1964; Domínguez, 2000; Huttema, 1967; Larsen *et al.*, 1978).

### 10.5 Acción de la vacuna

Los estudios realizados para evaluar la vacuna han encontrado que ésta es capaz de estimular la respuesta inmune del animal casi de inmediato, alcanzando los mayores niveles de respuesta después de los 20 días postvacunación y que se mantienen por varios meses (Corpa *et al.*, 1999; Domínguez, 2000; Juste *et al.*, 1994). García Marín

*et al (1999a)* encontraron que la vacuna produce un incremento del IFN $\gamma$ , lo cual, demuestra la estimulación sobre la respuesta celular. Hilbink y West, 1990 describieron que la vacuna estimula la respuesta humoral, la cual puede ser detectada por varios meses, se incrementa a las 3 ó 4 semana y puede mantenerse hasta las 25 semanas, dependiendo de la prueba utilizada en la detección. Sin embargo en un estudio realizado en cabras, se encontró después de la vacunación, una respuesta proliferativa de linfocitos específicos al antígeno aplicado, durante más de un año postvacunación, pero no se observó una respuesta humoral (Molina *et al.*, 1996).

En ovinos se ha observado que las subpoblaciones linfocitarias son diferentes, básicamente en los linfocitos T, los CD2 y los receptores CD45 aumentan en animales vacunados con respecto a los no vacunados (Mateo *et al.*, 1996). Por otro lado, en un estudio conducido por Valheim *et al.*, 1999 concluyeron que no existe un cambio significativo en las subpoblaciones linfocitarias que expliquen el éxito de la vacuna. Se ha planteado la teoría de que la inmunidad se caracteriza por un incremento en la capacidad de los macrófagos para evitar la proliferación de *Map* y destruir las bacterias fagocitadas (Larsen, 1973).

## **11. Infección Experimental.**

En pos de ampliar los conocimientos sobre la paratuberculosis y su agente etiológico, se han llevado a cabo múltiples investigaciones con infección experimental en varias especie de ruminantes y en animales de laboratorio.

### **11.1 Vías de inoculación**

La mayoría de los trabajos se han dirigido hacia el ganado vacuno, en 1950, Larsen infectó oralmente a 10 becerros vacunados y no vacunados, con la idea de evaluar esta medida de control. 7 animales, entre ellos los tres no vacunados se encontraron con lesiones y/o bacterias en el intestino después de su muerte, ocurriendo ésto desde los 12 hasta los 38 meses de edad, sin embargo, dos animales inmunizados continuaban completamente sanos a los 4 años. Payne y Rankin, (1961) al inocular a 21 becerros, también por vía oral, pero con bacterias provenientes de cultivo

bacteriano, pudieron aislar *Map* de todos los animales infectados, en mayor o menor cantidad dependiendo del momento del sacrificio, que se realizó desde 1 día PI hasta 14 meses PI.

Muchas investigaciones se han llevado a cabo en ovinos mediante infección experimental, en gran medida por su utilidad como modelos para entender la enfermedad en bovinos (García-Marín *et al.*, 2000; Gilmour *et al.*, 1965). En 1968 Merkal *et al.* inocularon corderos por vía oral, intratraqueal y endovenosa, aunque no se comprobó la infección con el aislamiento, las tres rutas presentaron resultados positivos al evaluar la respuesta celular y humoral. Se observó que la vía intratraqueal indujo títulos serológicos y la intradermorreacción positiva, de forma más rápida y más persistente, mientras que la oral fue la más lenta, menos frecuente y menos duradera. Juste *et al.*, 1994 utilizaron la vía oral para inocular *Map*, y lograron la infección, aunque la evaluación del experimento fue sobre la vacuna. Otros autores han utilizado la vía oral para llevar a cabo la infección experimental, ya sea a partir de cultivos bacterianos o de raspados de mucosa intestinal de animales enfermos infectando también caprinos (García Marín *et al.*, 1994; Gwózdź *et al.*, 1999; Karpinsky y Zórawski, 1975; Pérez *et al.*, 1994; Stewart *et al.*, 1999).

### 11.2 Respuesta celular a la inoculación experimental

La respuesta celular, fue positiva sólo en 8 de 26 becerros inoculados, medida con la intradermorreacción de PPD aviar, iniciando al mes PI con 1 positivo, en general la reacción fue intermitente e inconsistente entre los 3 y 11 meses PI (Gilmour *et al.*, 1965). Resultados similares obtuvieron Merkal *et al.*, (1968) en ovejas, inoculando por tres diferente vías, siendo la intratraqueal la más estable. Por el contrario, Karpinsky y Zórawski, (1975) obtuvieron positivos tanto al PPD-A como a la Johnina, en todos los animales infectados. La respuesta se inició a partir de las 8 semanas PI en 7 de 12 animales, en casi todos con reacción similar a ambos antígenos o mayor en PPD-A, y aunque algunos animales murieron antes de finalizar el experimento, hubo positivos hasta los 12 meses PI. La respuesta celular también ha sido evaluada por medio del IFN- $\gamma$ , así, Pérez *et al.*, (1994) identificaron como positivos a todos los corderos



infectados en los que realizaron la prueba, desde el día 50 PI hasta el día 220, y aunque fue disminuyendo el número de positivos desde los 350 hasta los 450 días, siempre hubo mayor respuesta al PPD-A que al PPD-B. Los resultados del IFN- $\gamma$  evaluados con johnina en el estudio de Gwózdź *et al.*, (1999) fueron importantes con respecto a la relación con la manifestación clínica de PTB, pues a partir de las 18 semanas, fue mayor la cantidad de la citocina encontrada en los corderos sin signología, hasta las 44 semanas, cerca de la semana 53, se elevó más el IFN- $\gamma$  en los corderos afectados clínicamente. Algo similar se presentó en los animales vacunados con respecto a los no vacunados, iniciándose la respuesta desde la semana 9 PI. En un estudio con becerros, cabritos y corderos, se encontraron animales positivos al PPD-A desde los 2 meses, aunque la mayoría reaccionó a los 3 meses, la respuesta fue mayor con la johnina (Stewart *et al.*, 1999).

### *11.3 Respuesta humoral a la infección experimental.*

Se han utilizado varias pruebas serológicas para evaluar la respuesta a la infección, Merkal *et al.*, (1968) encontraron que la IDGA mostraba de mejor manera el progreso de la enfermedad en borregos, aunque el resultado positivo apareció ligeramente más tarde, pues los títulos de FC, así como los de hemoaglutinación, decrecieron en animales altamente eliminadores. Los resultados de Pérez *et al.*, (1994) coincidieron con el anterior, aunque el primer positivo se obtuvo el día 120, incrementándose el número con el tiempo. Sólo una cabra con enfermedad clínica, de dos que fueron infectadas como controles para los becerros inoculados, fue positiva a IDGA en el experimento de Saxegaard, 1990, mientras que ambos resultaron positivos a ELISA y FC, desde los 6 y 10 meses en cada animal, y desde los 9 meses en la que resultó positiva a AGID. Con la prueba de ELISA, Juste *et al.*, 1994 encontraron resultados mucho más precoces, desde las 6 semanas PI, aunque fue hasta los 3 meses que los títulos fueron elevados. Stewart *et al.*, 1999 sólo encontraron anticuerpos en dos de 5 cabritos a los 4 y 5 meses en la prueba de ELISA, pero no así en becerros y corderos infectados.

#### 11.4 Lesiones en la infección experimental.

Payne y Rankin, 1961 no encontraron lesiones macroscópicas características de PTB en becerros infectados, excepto a los 14 meses PI, donde hubo un engrosamiento difuso de la mucosa de la porción caudal del íleon, pero no característico de PTB. Las primeras lesiones histopatológicas aparecieron al mes PI, aunque en realidad se trataba de lesiones muy pequeñas, difíciles de observar. A los 4 y 6 meses PI las lesiones siguieron siendo focales y poco constantes, aunque progresaban lentamente, fue hasta los 14 meses PI cuando el daño en la mucosa fue más extenso, en todos los casos fueron observadas células gigantes. En la investigación de Juste *et al.*, (1994), sólo un cordero presentó lesiones macroscópicas a partir del día 220 PI, consistentes en nódulos prominentes con un centro caseoso, con mayor extensión cerca de la válvula ileocecal. Mientras que microscópicamente, sólo se encontró infiltrado de polimorfonucleares, con un aspecto semejante a granulomas cercanos a la válvula, desde el día 45 PI, a los 120 y 220 días las lesiones se observaron francamente de tipo granulomatoso en las zonas interfoliculares. Lo destacable de estos resultados fue que en un grupo vacunado, las lesiones en el día 120 fueron mayores que en los no vacunados, mientras que para el 220, se encontraron menos granulomas, y éstos eran de menor tamaño y mucho más definidos en el grupos de inmunizados en comparación con los no vacunados, quienes tenían más lesiones y de mayor tamaño. Estas lesiones fueron muy similares a las observadas por Chávez, 1993, por el mismo tiempo, pero, en este trabajo se sacrificaron borregos hasta los 650 días, y se presentó una enteritis granulomatosa difusa. En el trabajo de Karpinsky y Kórawski, 1975, varios corderos murieron a causa de la PTB, desde los 8 hasta los 14 meses PI, presentándose las lesiones macroscópicas características, principalmente en íleon y linfonodos y en algunos animales, también en el ciego.

Pese a los estudios realizados en las diferentes especies, no se ha logrado controlar la Paratuberculosis a escala mundial, la investigación en los últimos años se ha centrado tanto en el diagnóstico como en el uso de la vacuna, la cual todavía no se sabe cómo es que actúa y si es capaz de mejorar la inmunidad de los animales, ayudando a

controlar la enfermedad. La carencia de estudios es aún más crítica en la especie caprina, pues en la mayoría de los países desarrollados no se tiene interés en ella. Ya que en México las cabras representan un importante potencial ganadero, además de la posibilidad de ser utilizadas como modelo biológico, es necesario llevar a cabo más investigaciones en las que se estudie la evolución de la enfermedad, observando tanto las lesiones como la respuesta inmune de los animales vacunados y no vacunados, de manera que se pueda establecer una forma de control adecuada para esta enfermedad que ocasiona grandes pérdidas.

## OBJETIVO.

Evaluar la reproducción de la infección con *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* de origen caprino y ovino en cabritos.

Evaluar la respuesta inmune celular y humoral, así como las lesiones anatomopatológicas en cabritos inmunizados y no inmunizados, infectados con *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* de origen caprino y ovino.



## **HIPÓTESIS.**

Los cabritos sólo pueden infectarse con el *M avium* subsp *paratuberculosis* de origen caprino.

Las lesiones ocasionadas por la infección experimental con *M avium* subsp *paratuberculosis* son menos severas en los cabritos inmunizados contra la paratuberculosis, que en los cabritos no inmunizados.

## **HIPÓTESIS.**

Los cabritos sólo pueden infectarse con el *M avium* subsp *paratuberculosis* de origen caprino.

Las lesiones ocasionadas por la infección experimental con *M avium* subsp *paratuberculosis* son menos severas en los cabritos inmunizados contra la paratuberculosis, que en los cabritos no inmunizados.

## PROCEDIMIENTO

### Unidad experimental y asignación de tratamientos.

Se utilizaron 27 cabritos machos destetados, de 45 días de edad de razas lecheras alpinas, provenientes de un rebaño de 400 animales, en Apaseo el Grande, Gto. La historia clínica de la granja no mostraba antecedente alguno de la enfermedad y empleando la prueba de Inmunodifusión en gel de agar (IDGA), fue detectado libre de paratuberculosis después de probar a todas las cabras del rebaño, dos veces en 4 meses.

Los cabritos se trasladaron a las instalaciones del Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnica de la Universidad Nacional Autónoma de México, donde se llevó a cabo el experimento. Se mantuvieron en corrales aislados del resto de los animales del Centro ya que no es libre de PTB. Los cabritos tuvieron una alimentación basada en alfalfa, heno de avena molida y concentrado. Se hizo una distribución al azar de los cabritos en 3 grupos de 9 animales cada uno: A. Inoculados con micobacterias de origen caprino, B. Inoculados con micobacterias de origen ovino, C. No inoculados y se alojaron en 3 corrales. A su vez, en cada uno de los grupos, fueron seleccionados aleatoriamente 5 animales para recibir el tratamiento: Inmunizados y 4 para el tratamiento: No inmunizados

#### *1. Obtención del inóculo.*

Se realizaron necropsias de ovinos y caprinos con diagnóstico clínico y serológico de paratuberculosis, teniendo especial atención al examinar intestino, para buscar las lesiones macroscópicas características, descritas en cabras (Elsken, 1965; García-Marín *et al.*, 1991; Pérez *et al.*, 1999). Cuando estaban presentes se colectó el intestino delgado y fue lavado con agua corriente, se guardó en bolsas de plástico y fueron mantenidos en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ , hasta el momento en que fueron procesados. Durante la necropsia, se tomaron muestras de la válvula ileocecal, varios segmentos del ileon con placas de Peyer y de linfonodos mesentéricos, los cuales se

fijaron en una solución de formalina al 10%. Posteriormente se realizó el examen histopatológico con tinción de Hematoxilina-Eosina (HE) y de Ziehl-Neelsen (ZN), para determinar la existencia de lesiones microscópicas compatibles con paratuberculosis y la presencia de bacterias (García-Marín, 1991).

Para la obtención del inóculo proveniente de las dos especies de rumiantes, se realizó la técnica de purificación descrita por Chávez *et al.*, 1992 y Chávez, 1993 (Anexo 1.1), la cual fue adaptada de Ratnamohan y Spencer, 1986. Para obtener cada uno de los inóculos se utilizaron aproximadamente 2 metros de íleon y yeyuno, utilizando principalmente las porciones que se observaban más afectadas. Se obtuvieron 4.5 ml del purificado caprino y 4 ml ovino.

Una vez obtenidos los inóculos concentrados, se llevó a cabo la cuantificación de bacterias. Fue necesario realizar una dilución de 1:1000 en agua destilada, para facilitarla ya que la cantidad de microorganismos observados en un frotis directo era muy grande. La técnica utilizada se explica en el Anexo 1.2, descrita por Chávez, 1993. La concentración bacteriana fue de  $6.8 \times 10^{14}$ /ml del inóculo caprino y  $7.2 \times 10^{15}$ /ml del concentrado de *Map* ovino. Ambos fueron conservados en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 5 semanas, hasta el momento de ser utilizados.

Se separaron 250  $\mu\text{l}$  de cada inóculo que fueron congelados durante 7 meses y posteriormente se utilizó para cultivo bacteriano. Éste fue diluido en una solución de cloruro de hexadecilpiridinium<sup>3</sup> (HPC) y se dejó en reposo durante 24 h, transcurrido ese tiempo se usó una pipeta de transferencia para tomar unas gotas de la mezcla y depositarlas en tres tubos de medio de cultivo de Löwenstein-Jensen, dos con micobactina<sup>4</sup> y uno sin micobactina. Posteriormente se pusieron a incubar a  $37^{\circ}\text{C}$  por varias semanas. La concentración de bacterias del inóculo de cabra que se sembró en el medio de cultivo fue de  $3.87 \times 10^{13}$  bacterias y para el concentrado de origen ovino fue de  $4.5 \times 10^{13}$  bacterias en cada tubo. Después de 4 semanas de cultivo se encontraron pequeñas colonias de 1 mm, blanquecinas, brillantes, de consistencia firme, sólo en los medios con micobactina, se comprobó la presencia de las bacterias

---

<sup>3</sup> Sigma

<sup>4</sup> Allied Mo, Fayette, Missouri

en frotis positivos a ZN. El aislamiento fue identificado como de *Map* por la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes, la falta de crecimiento en los medios de cultivo sin micobactina y las colonias características (Pérez *et al.*, 1996).

La concentración de bacterias con que fueron infectados los cabritos fue 10 veces mayor que la sembrada en medios de cultivo.

## 2. Inoculación de los cabritos.

Una vez instalados los cabritos, permanecieron en un periodo de adaptación de 10 días antes de iniciar el experimento.

La infección experimental se llevó a cabo en tres días alternados: día 1, 3 y 5, para descripción del trabajo y cuantificación de días postinfección (DPI), el día 1 se considera como el día de la infección. Los inóculos de caprino y ovino fueron mezclados con leche ultrapasteurizada de vaca como vehículo, de manera que el volumen total para administrar a cada animal fuera de 5 ml por día. La dosis infectante total para cada cabrito fue de  $3.3 \times 10^{14}$  microorganismos para el inóculo caprino y  $5.6 \times 10^{14}$  para el de ovino. Se administró por vía oral empleando una jeringa estéril para cada uno. A los cabritos del grupo control se les administró únicamente la leche, de la misma manera que en los tratamientos (Gilmour *et al.*, 1965).

Los animales fueron distribuidos en los tratamientos correspondientes realizando la inoculación de la siguiente manera:

Grupo A: 9 cabritos inoculados con *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* de origen caprino.

Grupo B: 9 cabritos inoculados con *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* de origen ovino.

Grupo C: 9 cabritos no inoculados, a los que se les administró únicamente el vehículo del inóculo. Éste fue el grupo testigo.

La inoculación de *Map* como desafío a la bacterina, se realizó antes que la aplicación de ésta, contrario a la mayoría de las investigaciones de inmunógenos, ya que en forma natural, la infección se da antes que la inmunización (Gwózdź *et al.*, 1999; Whitlock y Buergelt, 1996).

### 3. Inmunización.

En el día 14 postinoculación (PI), 5 animales de cada grupo fueron inmunizados contra la PTB y 4 no recibieron el tratamiento, quedando así 6 tratamientos con 5 y 4 animales (ver cuadro). Se empleó una bacterina comercial Gudair<sup>5</sup>, la cual contiene la cepa 316F muerta de *M. avium* subsp *paratuberculosis*, aplicando 1 ml del producto en la región subescapular por vía subcutánea como dosis única. A los cabritos que no recibieron la vacuna también se les aplicó la misma cantidad de aceite de oliva como placebo (1 ml) utilizando la misma técnica y sitio de aplicación que los animales vacunados. 3 días después se revisó el punto donde se aplicó el inmunógeno para asegurar el efecto del mismo, el cual se observó como una inflamación formando un nódulo de 2-4 cm de tamaño, la nodulación se inspeccionó en días posteriores para controlar posibles complicaciones.

Grupo	Inóculo	No de animales	
		Inmunizados	No inmunizados
A	<i>Map</i> caprino	5	4
B	<i>Map</i> ovino	5	4
C	Control	5	4

#### Toma de muestras

Se utilizó el sistema *Vacutainer*<sup>6</sup>, mediante la venopunción yugular, para la obtención de muestras de suero sanguíneo y de sangre completa, utilizando tubos de 10 ml sin anticoagulante y con heparina respectivamente, los días: 0, 14, 30, 120 y 180 PI.

### 4. Detección de respuesta inmune humoral: pruebas serológicas.

Para evaluar la respuesta humoral se utilizaron las muestras sanguíneas obtenidas sin anticoagulante. Éstas se dejaron en reposo a temperatura ambiente durante 12 h y

<sup>5</sup> CZ Veterinaria S.L. Pntevedra, España.

<sup>6</sup> Beckton Dickinson NY, USA

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

posteriormente fueron centrifugadas a 4000 r.p.m. durante 15 min<sup>7</sup>, el suero obtenido se colocó en viales *Eppendorf* de 1.5 ml y se almacenaron a -20°C hasta que se realizaron las pruebas.

#### 4.1 Prueba de Inmunodifusión en gel de Agar (IDGA)

Para realizar esta prueba se preparó primero el gel en las cajas de petri empleando la metodología descrita en el Anexo 1.3. Los sueros fueron descongelados a temperatura ambiente unos minutos antes de ser utilizados. Se colocaron 30 µl de suero control en los pocillos superior e inferior, asimismo se agregaron 30 µl de cada suero problema en los 4 pocillos restantes de cada roseta. En el pocillo central se depositaron 30 µl de antígeno protoplasmático purificado de *Mycobacterium avium* (PPA-3) liofilizado,<sup>8</sup> el cual se preparó en una concentración de 4 mg/ ml de agua destilada estéril. Las cajas se incubaron en cámara húmeda a temperatura ambiente realizando la lectura a las 24 h y 48 h, con ayuda de una lámpara de luz blanca.

#### 4.2 Prueba de Inmunoensayo Enzimático (ELISA)

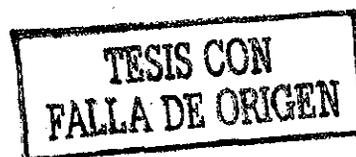
La prueba de ELISA se llevó a cabo de acuerdo a la técnica descrita por Domínguez, 2000. Todas las soluciones y tampones requeridos fueron elaborados un día antes de hacer el ensayo, las fórmulas y elaboración de ellos se describen en el Anexo 1.4, así como la preparación de antígenos, sueros y enzima.

Previamente al desarrollo de la técnica, se adsorbieron las muestras de suero con una suspensión de *Mycobacterium phlei*,<sup>9</sup> con la finalidad de eliminar una respuesta inespecífica a otras micobacterias (Molina *et al.*, 1990) y se dejan a 4°C durante 12-18 h. Los controles positivo y negativo también se adsorben. Por otro lado, el antígeno PPA-3<sup>10</sup>, diluido 1:100 en una dilución de tampón carbonato, fue adsorbido en las placas de ELISA, colocando 100 µl por pocillo y se incubaron las placas durante 24 h a 4°C. Fueron empleados controles positivos y negativos que se tienen identificados en

<sup>7</sup> Centrifuga Eppendorf 5810R

<sup>8</sup> Allied Mo. Fayette, Missouri

<sup>9</sup> Allied Mo. Fayette, Missouri



el laboratorio, los cuales también se agregan en los pocillos en la posición de la placa que se recomienda para el lector del ELISA. Las placas fueron lavadas y escurridas antes de iniciar la prueba. Todos los lavados se hicieron por tres veces, utilizando 150  $\mu$ l por pocillo en cada lavado y en cada ocasión, de una solución de PBS Tween con gelatina (PBS-TG) con una micropipeta multicanal<sup>11</sup>.

Se agregó a cada pocillo 98  $\mu$ l PBS-TG y 2  $\mu$ l (proporción de 1:50) de los sueros problema preadsorbidos con el *M. phlei*, mezclando por pipeteo, también se agregaron los controles. Se dejaron incubar durante 2 h en cámara húmeda a temperatura ambiente y se realizó el lavado con PBS-TG. Se adicionó en cada pocillo 100  $\mu$ l de una solución de anti-Inmunoglobulina G de caprino marcado con peroxidasa de rábano, preparado en una dilución 1:4500 en PBS-TG. Nuevamente se incubaron durante 2 h en cámara húmeda y se lavaron con PBS-TG. Transcurrido el tiempo, se agregó el sustrato de enzima ABTS (2,2'-AZINO-bis(3-ethyl- benzthiazoline-6-sulfonic-acid)) de *Sigma* recién preparado en una solución con Tampón Citrato, se colocaron 100  $\mu$ l y se cubrieron las placas para evitar la luz. Se incubaron durante 20 minutos contando desde el momento en que se empieza a agregar el sustrato.

La lectura de las placas se llevó a cabo mediante un espectrofotómetro de 8 canales empleando un filtro de 450 nm.<sup>12</sup>

Para evaluar los resultados, se obtuvo el cociente de la densidad óptica (CDO) promedio de cada uno de los sueros problema dividida entre la DO promedio del control positivo. Se consideraron como positivos aquellos cuyo CDO fuera mayor de 0.7, ya que en estudios anteriores se ha encontrado que con este punto de corte se obtiene mejor sensibilidad y especificidad (García-Marín *et al.*, 1991). Asimismo, se obtuvieron promedios del CDO, por grupos y tratamientos en cada muestreo, y se hizo un ajuste de medias.

---

<sup>10</sup> Allied Mo. Fayette, Missouri

<sup>11</sup> Eppendorf

<sup>12</sup> Elx 800, Bio Tek

## **5. Detección de respuesta inmune celular**

### **5.1 Prueba de Intradermorreacción (IDR).**

Esta prueba se efectuó los días 120 y 180 PI después del sangrado correspondiente, para ello se inoculó el PPD-B y PPD-A<sup>13</sup>, para realizar la prueba doble comparativa de IDR o prueba de tuberculina. Se aplicaron 0.1 ml de cada una por vía intradérmica, la PPD-B en el pliegue anocaudal derecho y la PPD-A en el izquierdo. Previo a la inoculación, se midió el grosor de la piel empleando un vernier y la observación de la reacción se llevó a cabo 72 h después midiendo nuevamente el grosor de los pliegues. Para evaluar la prueba se consideró como positiva cuando el aumento en la piel fue mayor o igual a 2 mm (Chávez, 1993).

### **5.2 Prueba de Gamma Interferón (IFN $\gamma$ ).**

Las muestras de sangre completa con heparina se trabajaron aproximadamente 1 h después de terminado el muestreo. Primeramente se hizo la estimulación de las células sanguíneas, con 100  $\mu$ l de Derivado Proteico Purificado bovino (PPD-B)<sup>14</sup> y 100  $\mu$ l de Derivado Proteico Purificado aviar (PPD-A).<sup>15</sup> Tanto el PPD-B como el PPD-A tuvieron que ser dializados para eliminar el exceso de fenol que contienen (Anexo 1.5), posteriormente se cuantificó la concentración de proteínas (Rosenberg, 1996). Ambos PPDs se utilizaron en una concentración de 20  $\mu$ g /ml (Chávez, 1993). Después de Pipetear 3-4 veces para mezclar, los microtubos destapados se colocaron en gradillas cubriendo con papel para evitar la deshidratación y se incubaron a 37<sup>0</sup>C, durante 24 h. Transcurrido ese tiempo se obtuvo el plasma mediante centrifugación, mismo que se separó cuidadosamente mediante el uso de micropipetas y se colocó en microtubos nuevos que fueron almacenados a -20<sup>0</sup>C hasta que se realizaron las pruebas. (Anexo1.6) Los viales con plasma fueron descongelados unos minutos antes de iniciar la prueba de IFN $\gamma$ . Ésta se llevó a cabo empleando un kit comercial,

<sup>13</sup> Productora Nacional de Biológicos Veterinarios: Pronavive, México, DF.

<sup>14</sup> Pronabive, México DF.

<sup>15</sup> Pronabive, México DF

Bovigam®<sup>16</sup> que se utiliza para el diagnóstico de tuberculosis, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para hacer las lecturas de densidad óptica de las placas se usó un espectrofotómetro de 8 canales empleando un filtro de 450 nm<sup>17</sup>. El criterio para considerar como positivo un resultado fue el sugerido por el laboratorio que lo elabora, las lecturas de DO tanto del PPD-A como del PPD-B que tuvieron una diferencia superior 0.100 con respecto a la lectura del PBS, considerándose reacción paratuberculosa si la DO del antígeno aviar fuera mayor que la del bovino. También se obtuvo el CDO de cada PPD con su respectivo control positivo, y se calificaron como positivos los plasmas cuyo CDO fue superior al punto de corte establecido de 0.7, aunque no hubo variación en los resultados entre los dos criterios (García-Marín et al., 1991).

## **6. Estudios clínicos y postmortem.**

Fueron elegidos al azar, dos animales de cada grupo y uno de cada tratamiento, los cuales fueron sacrificados en dos periodos realizando la necropsia. El primer sacrificio se hizo a los 120 días PI correspondiendo a 6 meses de edad aproximadamente y el segundo a los 180 días PI, alrededor de los 8 meses de edad. Los otros animales no se utilizaron debido a que forman parte de una investigación más extensa para ser sacrificados a los 12 y 18 meses PI.

### *6.1 Estudio anatomopatológico.*

Se realizaron las necropsias inspeccionando con mayor atención el intestino, aunque fueron consideradas todas las lesiones macroscópicas observadas en ese momento.

Para el examen de histopatología se colectaron las siguientes muestras con las siguientes referencias:

Válvula ileocecal (VIC)

Ileon distal (ID): 15 cm de la porción inmediata anterior a la VIC.

Íleon proximal (IP): 10 cm midiendo 80 cm antes de la VIC

---

<sup>16</sup> Bovigam CSL, Australia.

<sup>17</sup> Eppendorf

Yeyuno distal (YD): con y sin placa de Peyer: 30 cm midiendo 30 cm antes del IP en una porción que incluyera placa.

Yeyuno medial (YM): con y sin placa de Peyer: 20 cm midiendo 2.5 m antes del YD en un fragmento que incluyera placa.

Yeyuno proximal (YP): con y sin placa de Peyer: 15 cm tomados de 2 m antes del YM.

Linfonodos mesentéricos: ileocecal, distal, medio y proximal y

Nódulo vacunal.

También fueron seleccionadas algunas porciones de intestino donde se observaban lesiones características o sugestivas de la PTB, así como muestras de otros órganos.

Todas las muestras fueron colocadas en varios frascos identificados conteniendo una solución de formalina al 10% para ser fijadas. Asimismo, se guardaron en bolsas de plástico identificadas las porciones intermedias de íleon y yeyuno y de algunos linfonodos mesentéricos, éstas fueron congeladas para el aislamiento bacteriano.

## 6.2 Estudio Histopatológico

Los tejidos fueron fijados en una solución de formalina al 10% durante 24-48 h. Se hicieron cortes de las porciones específicas a estudiarse y se procesaron para su inclusión en parafina de acuerdo a la técnica de rutina. Una vez obtenidos los bloques se realizaron cortes de 4  $\mu\text{m}$  de espesor, en algunos casos, se hicieron cortes seriados de varias porciones del intestino para apreciar mejor la presencia de lesiones incipientes. Las laminillas obtenidas se trabajaron con tinciones de Hematoxilina-Eosina (HE) y Ziehl-Neelsen (ZN) y se hicieron las observaciones empleando un microscopio óptico.

Las lesiones encontradas fueron evaluadas y clasificadas sobre la base del criterio establecido por Pérez *et al.*, 1996 que se describe en el Anexo 2.

## 7. Estudio bacteriológico.

Para llevar a cabo el cultivo bacteriano se prepararon tubos de cristal conteniendo medio de Löwenstein-Jensen<sup>18</sup> (LJ) con y sin micobactina<sup>19</sup>. Se utilizaron tubos de cristal con tapón de baquelita de 15 ml, previamente esterilizados, la metodología para la elaboración del medio de cultivo se detalla en el Anexo 1.7. Los tubos con medio se almacenaron en refrigeración hasta el momento de ser utilizados, a excepción de dos tubos de cada medio, que fueron incubados a manera de control de calidad, para constatar su esterilidad (Domínguez, 2000)

Las muestras de tejidos obtenidas durante las necropsias se descongelaron y procesaron de acuerdo a la metodología descrita por Juste *et al.*, 1991b, con algunas modificaciones. Para el intestino se hizo un raspado de la mucosa con la ayuda de hojas de bisturí estériles obteniendo aproximadamente 5 g. En el caso de linfonodos se quitó la grasa y tejido conectivo capsular, se cortaron finamente con bisturí para obtener también 5 g, se maceraron con la ayuda de un mortero tipo Ten Broek estéril, se adicionó una pequeña cantidad de agua destilada para facilitar la acción. Se vertieron en tubos Falcon donde se les adicionó una solución de HPC al 1% como descontaminante, más o menos en una proporción de 1:6 y se dejaron en reposo durante 3 días (Pavlik *et al.*, 1999b). Para inocular en el medio se tomó una pequeña cantidad de la fase intermedia utilizando una pipeta de transferencia y se aplicaron 6-8 gotas sobre la superficie del medio, moviéndolos para extender el macerado en todo el tubo. Los tubos ya con los inóculos se incubaron a 37°C durante 8 meses para observar el crecimiento de colonias. Para cada animal sacrificado se cultivaron muestras de VIC, ileon, yeyuno y LN, en dos tubos con micobactina y uno sin micobactina J.

Los cultivos se revisaron a las 4, 8, 12, 16, 24 y 32 semanas para buscar la presencia de las colonias características de *Map*. Cuando los cultivos parecían positivos, se tomó una pequeña cantidad de colonia con un asa microbiológica y se colocó con una gota

---

<sup>18</sup> Merck

<sup>19</sup> Allied Mo. Fayette Missouri

de agua estéril sobre un portaobjetos. Las laminillas fueron teñidas con ZN para comprobar la presencia de bacterias ácido-alcohol resistentes.

### **8. Análisis Estadístico.**

Para la prueba de IDGA e IDR se llevó a cabo una prueba de homogeneidad de proporciones con  $\chi^2$  de Pearson.

En las pruebas de ELISA e IFN- $\gamma$  se hicieron pruebas de t de Student para encontrar diferencia de medias. Para obtener las medias ajustadas se utilizó un modelo lineal de tres efectos principales y tres interacciones de segundo grado y una de tercero:

$$Y = X + \text{grupo} + \text{tx} + \text{DPI} + \text{grupo} * \text{tx} + \text{grupo} * \text{DPI} + \text{tx} * \text{DPI} + \text{grupo} * \text{tx} * \text{DPI} + \text{error}$$

Se hicieron pruebas de concordancia entre IDGA y ELISA así como pruebas de correlación entre IDR y ELISA.

### 3. RESULTADOS.

#### 1. Inmunización.

Todos los animales a los que se les aplicó la bacterina presentaron tumoración en el sitio de aplicación, que inició de 4 a 6 días después de la inmunización (Figura 1). El nódulo se fue incrementando hasta alcanzar entre 3-5 cm de tamaño, variando en cada animal, el cual persistió durante los 6 meses que duró el estudio, excepto en 2 animales sacrificados el día 180 PI, donde sólo podía apreciarse por palpación, pues medían un máximo de 1 cm. En 4 de los animales la reacción llegó a ulcerar, expulsando exudado caseoso, que dejó una cicatriz perceptible hasta el final del experimento.

En los cabritos que no fueron inmunizados no se observó una respuesta inflamatoria al placebo, pues únicamente se encontró un incremento de tamaño de 1 cm en el sitio de aplicación hasta 2 ó 3 días después, la cual se fue perdiendo sin dejar secuela.

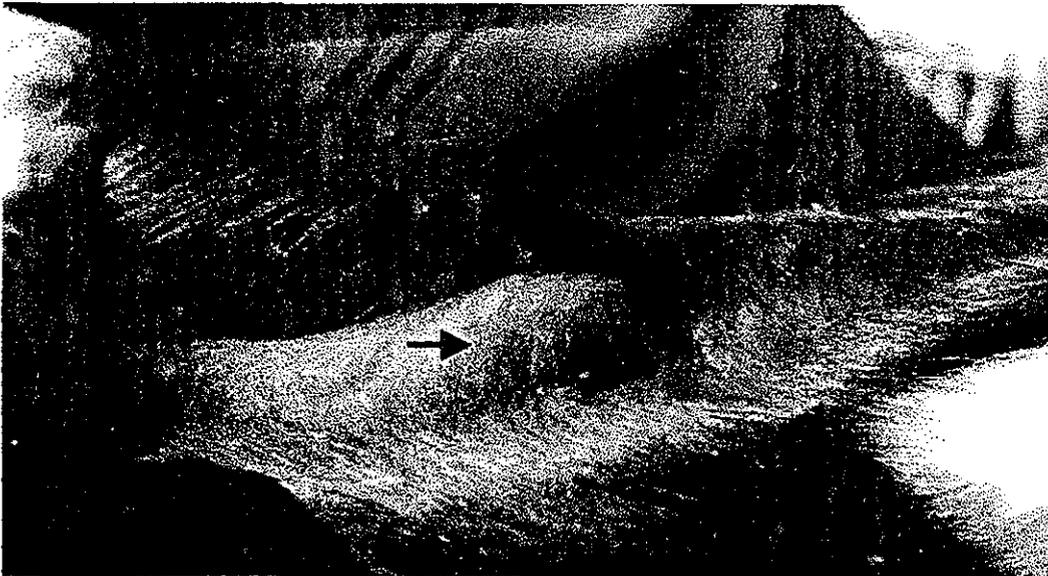


Figura 1: Nódulo en la zona subescapular (N), en un cabrito inmunizado contra *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*, a los 15 días posteriores a la inmunización.

## **2. Respuesta inmune humoral.**

De los 27 cabritos inoculados e inmunizados, 3 murieron por problemas de neumonías, los días 39, 47 y 58 PI, correspondiendo a los grupos C, B y A, respectivamente. Por lo que todos los resultados que se muestran corresponden a 8 cabritos por grupo, 5 inmunizados y 3 no inmunizados.

### **2.1 Inmunodifusión en Gel de Agar (IDGA).**

En la figura 2 se observan los resultados de la prueba de IDGA. No fueron encontrados animales positivos en ninguno de los grupos, en los muestreos de los días 1 y 14 PI. Los resultados seropositivos se presentaron desde el día 30 PI, es decir, 16 DPV, cuando la seropositividad fue en 4:5 cabritos inmunizados en cada uno de los tres grupos. De los inoculados/no inmunizados, sólo un animal (1:3), del grupo A, fue positivo. Para el día 120 PI, todos los cabritos inmunizados, 15:15 resultaron seropositivos, es decir de los grupos A y B inoculados/inmunizados y del C no inoculado inmunizado. Asimismo se observó una respuesta positiva en 1:3 y 2:3 en los grupos A y B inoculados/no inmunizados. A los 180 días PI la seropositividad también se presentó en todos los inoculados/inmunizados de los grupos A y B, (4:4 en cada uno) mientras que en el grupo C inmunizado, sólo 2:4 cabritos, fueron seropositivos. En los animales no bacterinizados, únicamente fue positivo 1:2 en el grupo A, pero ninguno en el B y C. Se encontró diferencia estadística significativa ( $p > 0.05$ ) por el tratamiento de inmunización a los 30, 120 y 180 DPI, pero no entre grupos y tampoco por día de muestreo.

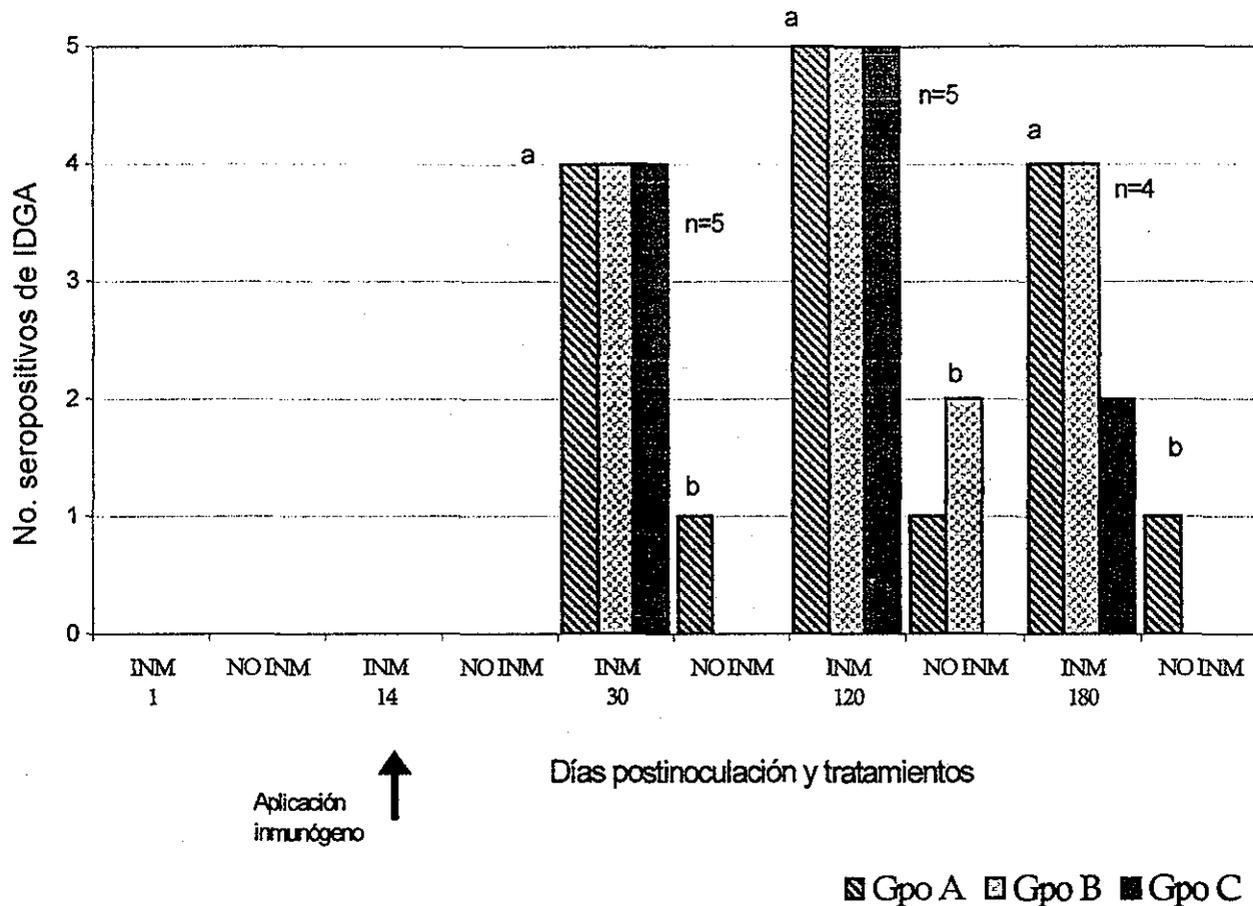


Figura 2. Detección de anticuerpos contra *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* mediante la prueba de IDGA, en cabritos inmunizados (INM) y no inmunizados (NO INM).

Gpo A: inoculados con *Map* de origen caprino, Gpo B: inoculado con *Map* ovino, Gpo C: Testigo.  
 Literales diferentes por tratamiento ( $p < 0.05$ ). No hubo diferencia estadística significativa entre grupos ni días de muestreo ( $p > 0.05$ ).

## 2.2 Inmunoensayo enzimático (ELISA).

En la figura 3 se presenta el número de animales positivos a la prueba de ELISA; en los dos primeros muestreos (día 1 y 14) todos los animales fueron negativos. La presencia de positivos se inició en el día 30 PI, con 2:5 y 3:5 seropositivos en los grupos A inoculado/inmunizado y C inmunizado, respectivamente. A los 120 y 180 DPI se observó un incremento en la cantidad de cabritos positivos, 5:5 y 4:4 a los 120 y 180 DPI, respectivamente, en los grupos B inoculado/inmunizado y C inmunizado, mientras que en el grupo A inoculado/inmunizado, fueron positivos 1:5 y 3:4 a los 120

y 180 DPI. No existieron resultados positivos en los cabritos no inmunizados de los tres grupos, sin embargo no hubo diferencia estadística significativa ( $p>0.05$ ) por efecto del inmunógeno, ni entre grupos, ni muestreos.

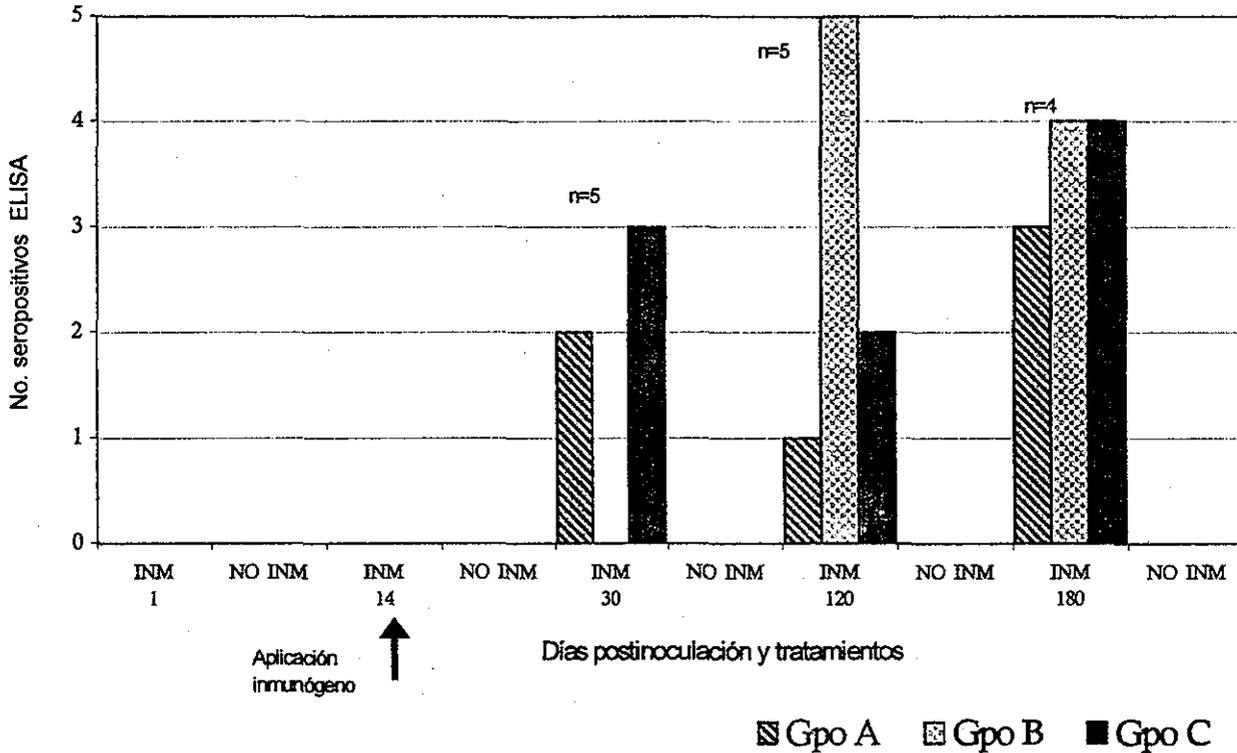


Figura 3. Detección de anticuerpos contra *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* mediante la prueba de ELISA, en cabritos inmunizados (INM) y no inmunizados (NO INM).

Gpo A: inoculados con *Map* de origen caprino, Gpo B: inoculado con *Map* ovino, Gpo C: Testigo. No hubo diferencia estadística significativa entre grupos y tratamiento ( $p>0.05$ ).

En la figura 4 se graficaron los promedios de los resultados del CDO para todos los grupos y tratamientos en los 5 muestreos. En las tres gráficas, se puede observar un incremento en el CDO desde el día 30 PI en los animales inmunizados, con un promedio de 0.742 para el grupo A, alcanzando el nivel máximo en el muestreo del día 180, el cual fue de 0.83. En el grupo B la respuesta también se incrementó a 0.67 en el día 30 PI, en el día 120 PI subió a 0.92 y 0.91 en el 180. animales.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

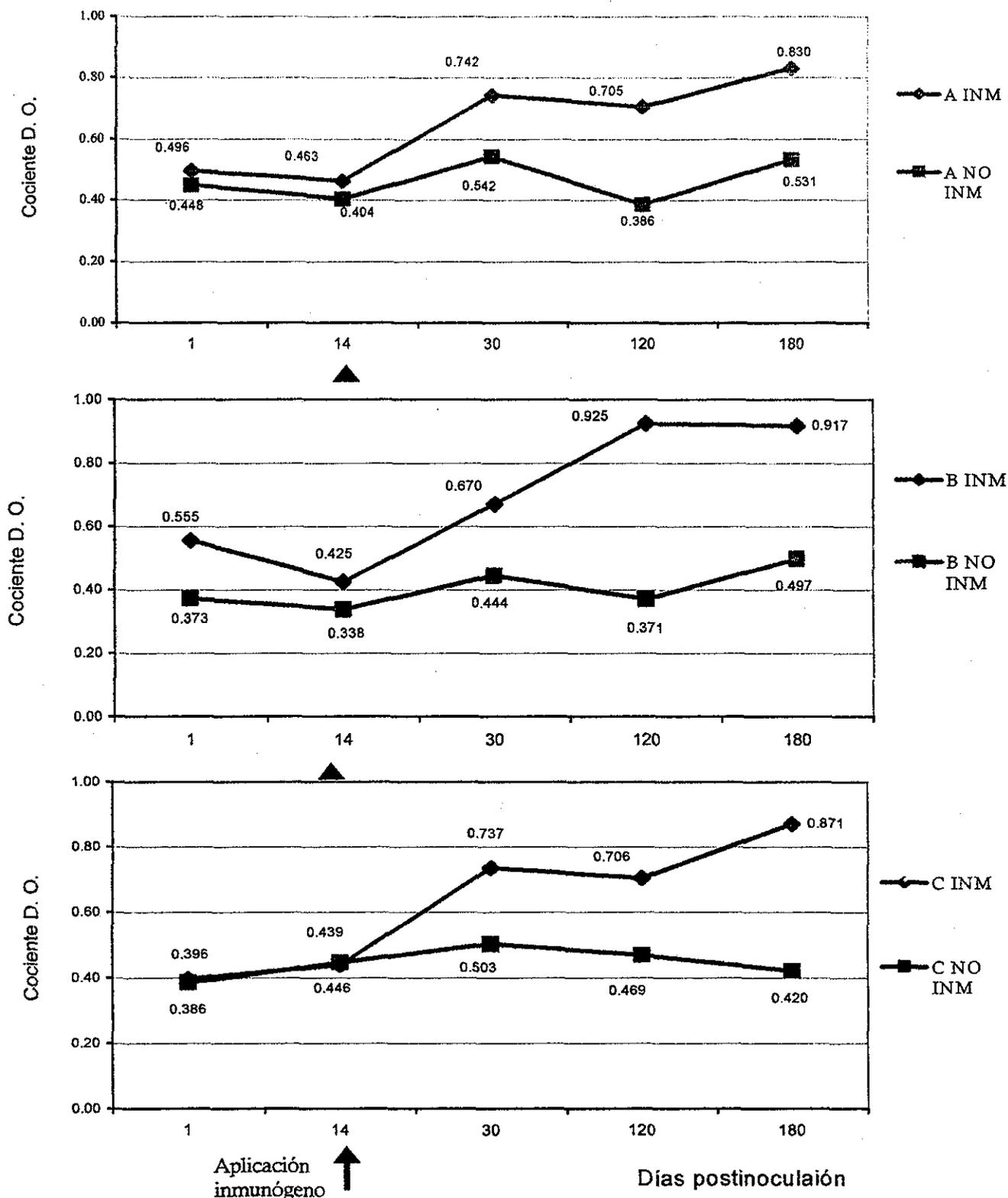


Figura 4. Promedio del cociente de densidad óptica de la prueba de ELISA, en cabritos inmunizados (INM) y no inmunizados (NO INM) contra *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*.

Gpo A: inoculados con *Map* de origen caprino, Gpo B: inoculados con *Map* ovino, Gpo C: Testigo. D.O. Densidad óptica.

No hubo diferencia significativa de medias entre tratamientos en cada grupo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Asimismo en los cabritos del grupo C hubo un incremento en el día 30 PI, con un CDO de 0.737, elevándose hasta 0.871 en el día 180, que fue la máxima respuesta de estos. Por otro lado en los cabritos no inmunizados de los tres grupos, el CDO se mantuvo bajo con un máximo de 0.542 en el grupo A, al día 30 PI, y en el resto estuvo por debajo del 0.5. A pesar de las observaciones anteriores, no se pudo apreciar una diferencia de medias significativa en el CDO de los animales inmunizados de los tres grupos con respecto al de los cabritos no inmunizados ( $p>0.05$ ).

### 3. Respuesta inmune celular.

#### 3.1 Intrademorreacción IDR

En la figura 5 se muestra el número de animales reactivos en la prueba de IDR. Se observa a los 120 DPI, que de los cabritos inoculados/inmunizados, fueron positivos 5:5 en el grupo A y 3:5 en el B, así como 4:5 en el grupo C no inoculado/inmunizado. En comparación, de los animales que no recibieron bacterina, sólo 1:3 del grupo A, inoculado/no inmunizado fue positivo al PPD-A. En la prueba a los 180 DPI, el número de reactivos bajó a 2:4 en el grupo A inoculado/inmunizado y se incrementó a 4:4 en el C inmunizado. Asimismo, se encontró 1:3 y 1:2 positivos en los grupos B y C no inmunizados. No hubo diferencia significativa ( $p>0.05$ ) por el tratamiento con la bacterina, ni entre grupos.

Con respecto al uso del PPD-A y PPD-B se comportaron de manera similar, aunque de los cabritos inoculados/inmunizados, uno del grupo A y uno del B fueron reactivos al antígeno aviar y negativos al bovino (Figura 6). No hubo diferencia estadística significativa ( $p>0.05$ ) entre los PPDs empleados.

Se hicieron pruebas de correlación entre la prueba de IDR con PPD-A y PPD-B y la prueba de ELISA sólo para los cabritos de los grupos A y B inoculados, para que los resultados del grupo testigo (C), no modificaran la prueba estadística. En la figura 7, se puede apreciar, una correlación de  $r^2=0.62$  con el antígeno aviar, sólo en los no

inmunizados a los 120 DPI, en los inmunizados a los 120 días y en ambos tratamientos a los 180 DPI, la correlación fue baja o casi nula.

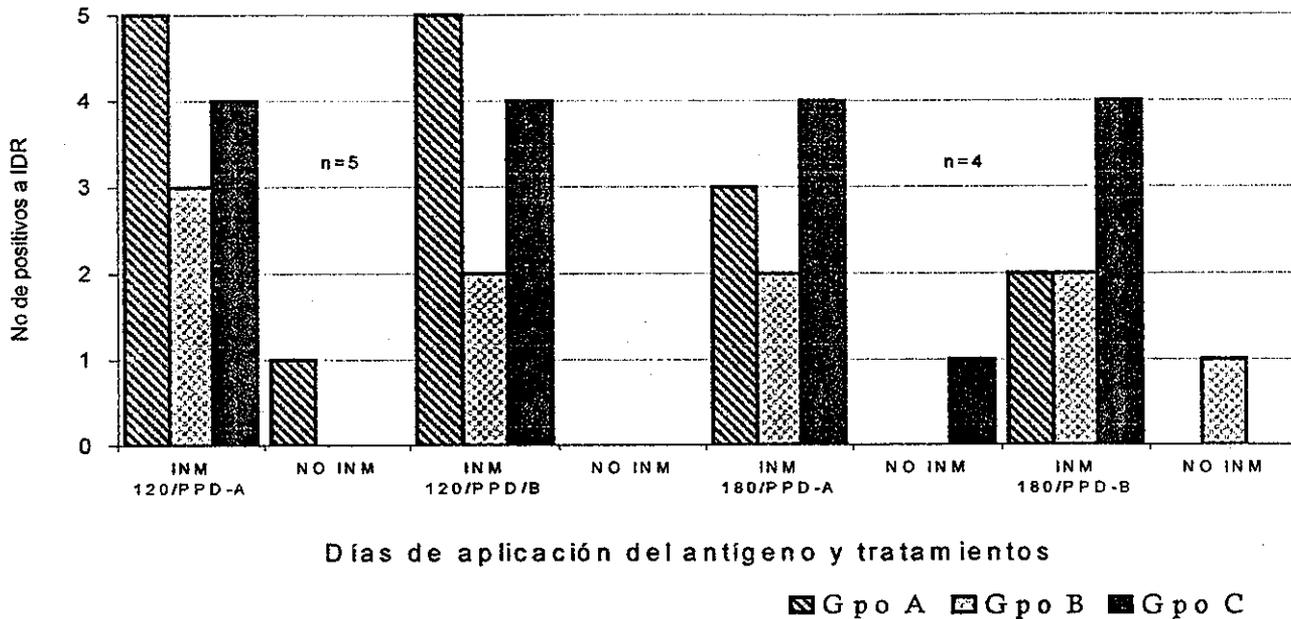


Figura 5. Resultados de la prueba de IDR, a los 120 y 180 DPI con *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*, en cabritos inmunizados (INM) y no inmunizados (NO INM).

Gpo A: inoculados con *Map* de origen caprino, Gpo B: inoculados con *Map* ovino, Gpo C: Testigo. No se encontró diferencia estadística significativa ( $p > 0.05$ ) entre grupos y tratamientos, ni por el PPD empleado.

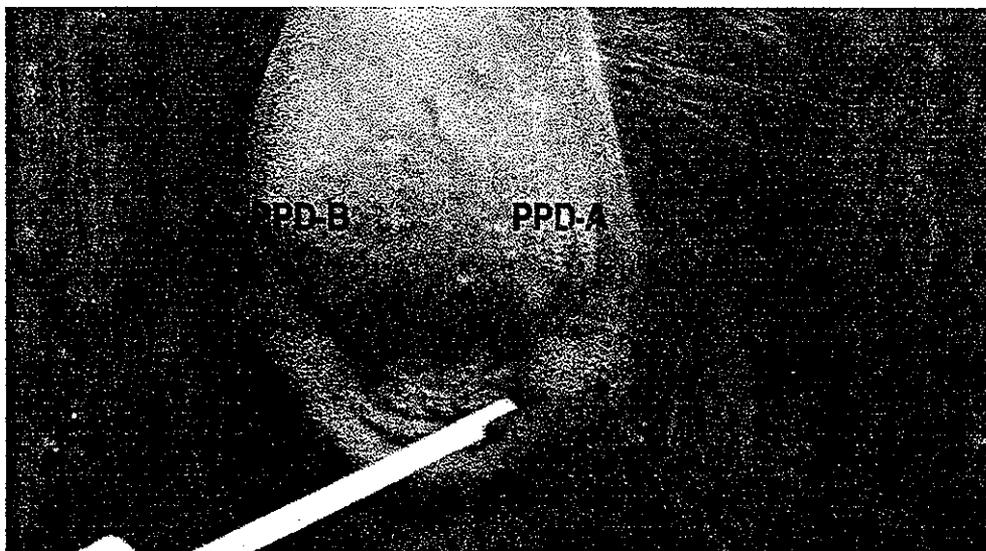
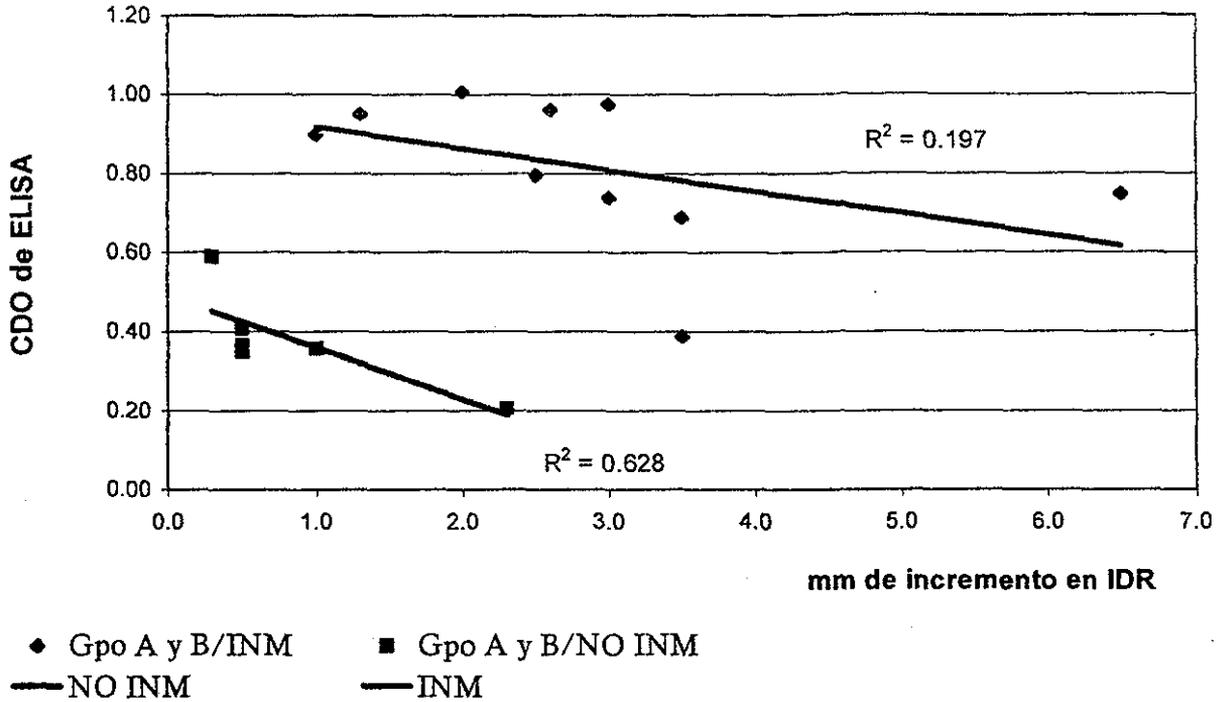


Figura 6. Reacción en la prueba de IDR en un cabrito, a 72 h de la aplicación de los antígenos. Se observa mayor reacción en el pliegue anocaudal derecho, donde se le aplicó el PPD-A, comparado con el lado izquierdo, donde se puso el PPD-B.

120/PPD-A



180/PPD-A

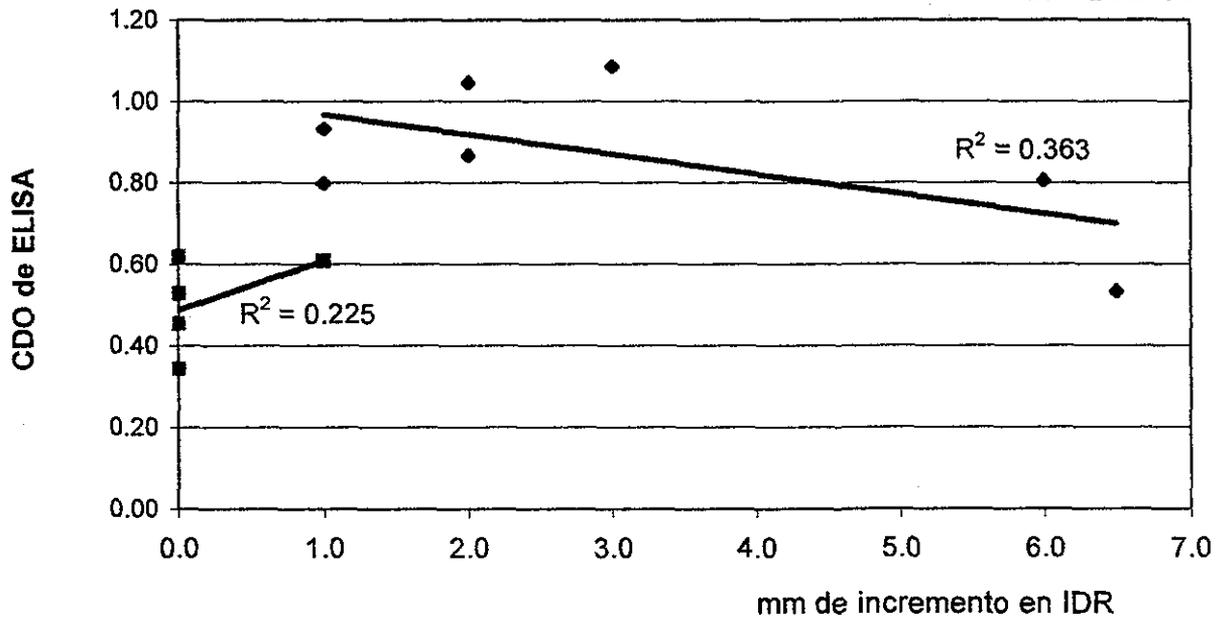


Figura 7. Correlación entre las pruebas de IDR (PPD-A) y ELISA en cabritos inmunizados (INM) y no inmunizados (NO INM) a los 120 y 180 DPI con *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*.

Gpo A: inoculado con Map de origen caprino, Gpo B: inoculado con Map ovino. CDO: Cociente de densidad óptica.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Por otro lado, en la figura 8, con el PPD-B, se encontró mayor correlación en los inmunizados, pero a los 180 DPI con  $r^2=0.41$ , mientras que en los otros resultados con ese antígeno no existió correlación mayor de  $r^2=0.34$ .

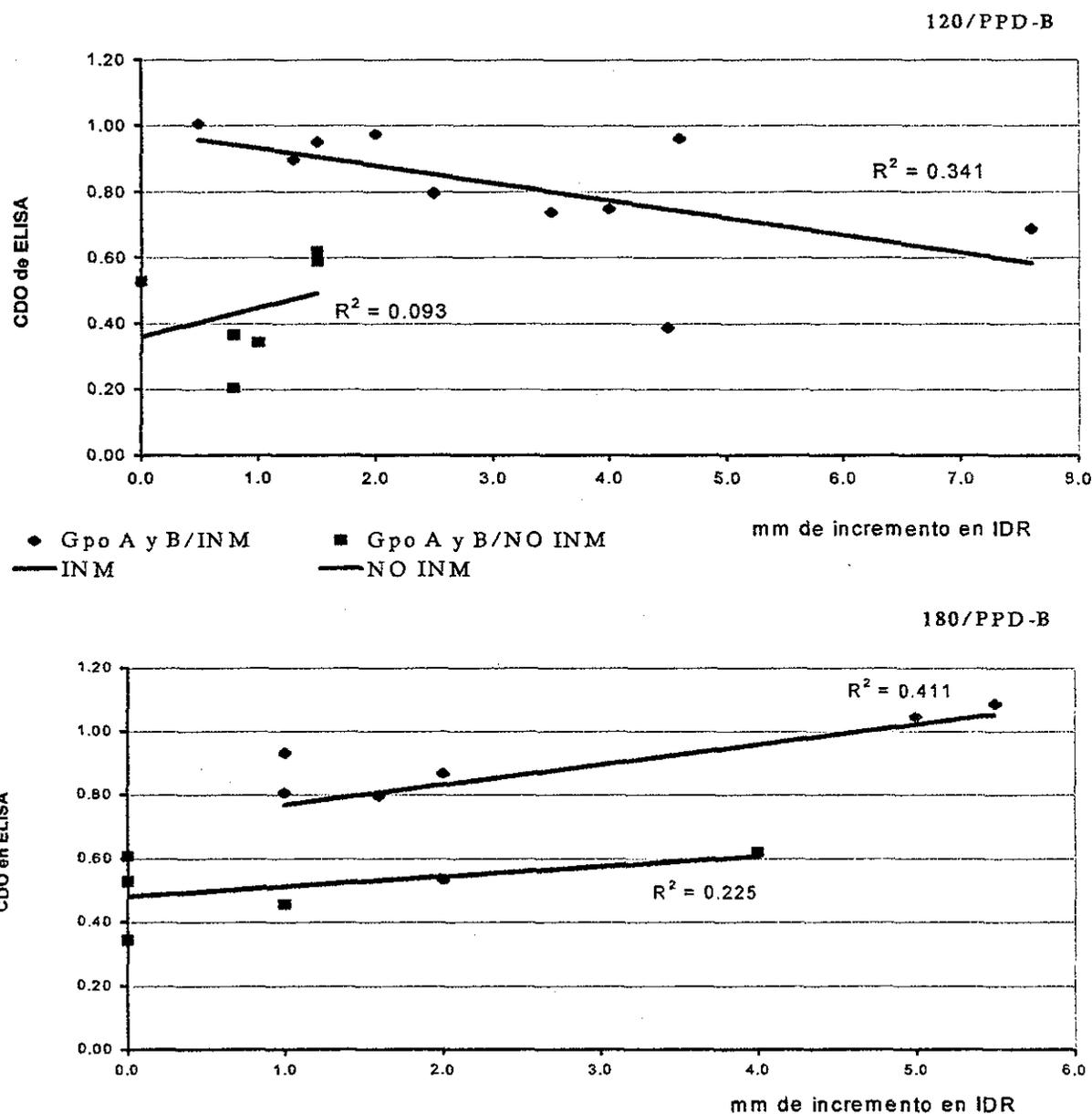


Figura 8. Correlación entre las pruebas de IDR (PPD-B) y ELISA en cabritos inmunizados (INM) y no inmunizados (NO INM), a los 120 y 180 DPI con *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*  
 Gpo A: inoculados con Map de origen caprino, Gpo B: inoculados con Map ovino. CDO: cociente de densidad óptica.

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

### 3.2 Gamma-Interferón (IFN- $\gamma$ )

En la figura 9 se pueden observar los resultados obtenidos en la prueba de IFN- $\gamma$ , mediante la obtención del cociente de la densidad óptica tanto del PPD-A como del PPD-B, donde se graficaron los promedios de cada grupo y tratamiento. El promedio de CDO fue mayor que el punto de corte (0.7), a los 120 DPI en el grupo A inoculado/no inmunizado, y a los 180 DPI en el A inoculado/no inmunizado y en ambos del grupo B, todos ellos estimulados con el PPD-B, así como el grupo B inoculado/no inmunizado, incubado con el PPD-A. Ningún animal del Grupo C no inoculado resultó positivo a la prueba de IFN $\gamma$ , no obstante, no hubo diferencia estadística significativa entre los tratamientos ( $p > 0.05$ ), ni se encontró diferencia significativa entre grupos o por el empleo del PPD-A ó PPD-B.

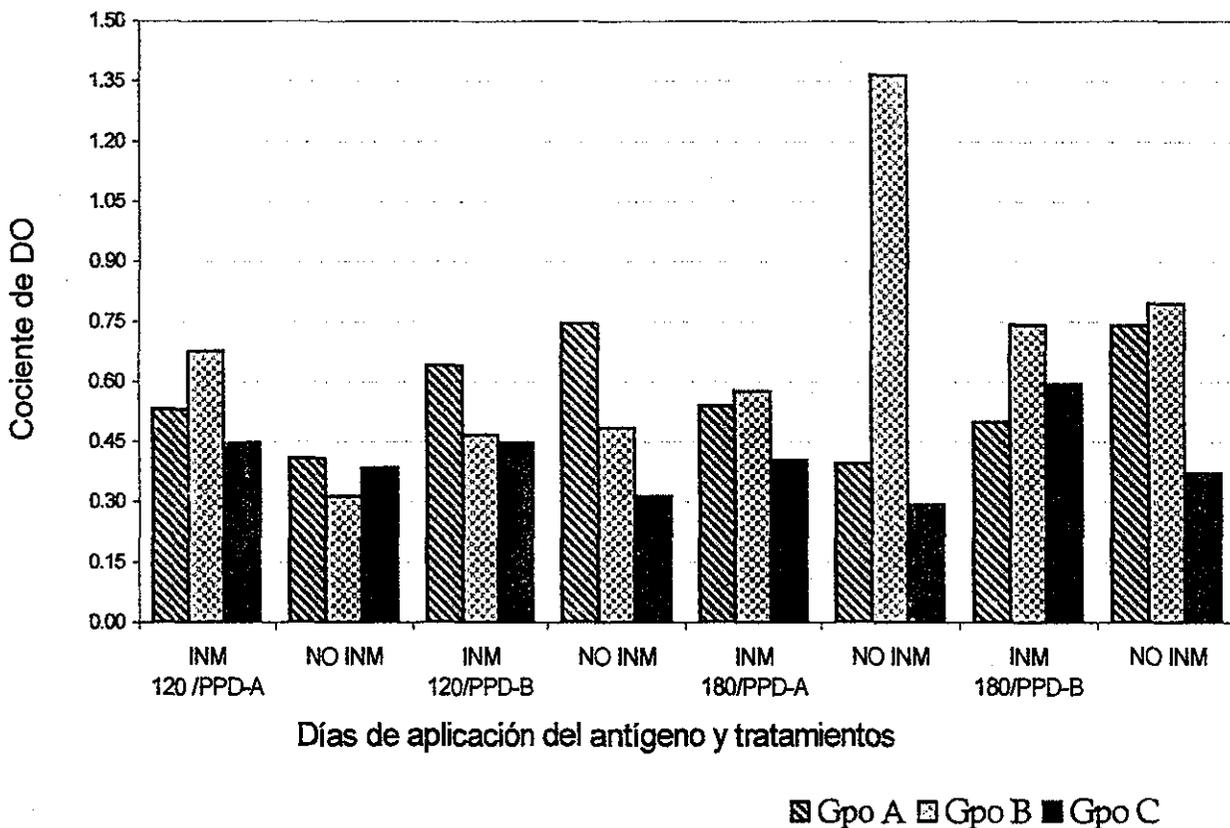


Figura 9. Resultado de la prueba de IFN- $\gamma$  con el PPD-A y PPD-B a los 120 y 180 DPI con *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* en cabritos inmunizados (INM) y no inmunizados (NO INM).

Gpo A: inoculado con *Map* de origen caprino, Gpo B: inoculados con *Map* ovino, Gpo C: Testigo. DO Densidad Óptica  
No hubo diferencia estadística significativa ( $p > 0.05$ ) entre grupos, ni tratamientos.

En la figura 10 se comparan los resultados obtenidos en las dos pruebas que miden la respuesta inmune celular, encontrándose que la IDR detectó a un mayor número de animales positivos que el IFN- $\gamma$ , la primera fue capaz de detectar en total 12 positivos en los cabritos inmunizados a los 120 DPI (5 en el A, 3 en el B y 4 en el C), así como un positivo del grupo A inoculado/sin bacterina, mientras que la otra prueba sólo detectó 5 animales positivos 2 en el A inoculado/inmunizado, 1 en el A no inmunizado y 1 en cada uno de los grupos B y C bacterinizados. A los 180 DPI la prueba de IFN- $\gamma$  detectó 6 positivos, 2 del grupo A inmunizado, 1 del A no inmunizado y 3 del B no inmunizado, todos inoculados, mientras que los positivos a IDR disminuyeron, detectando en total 10 positivos, 8 inmunizados y 2 no, siendo mejor que el IFN- $\gamma$ .

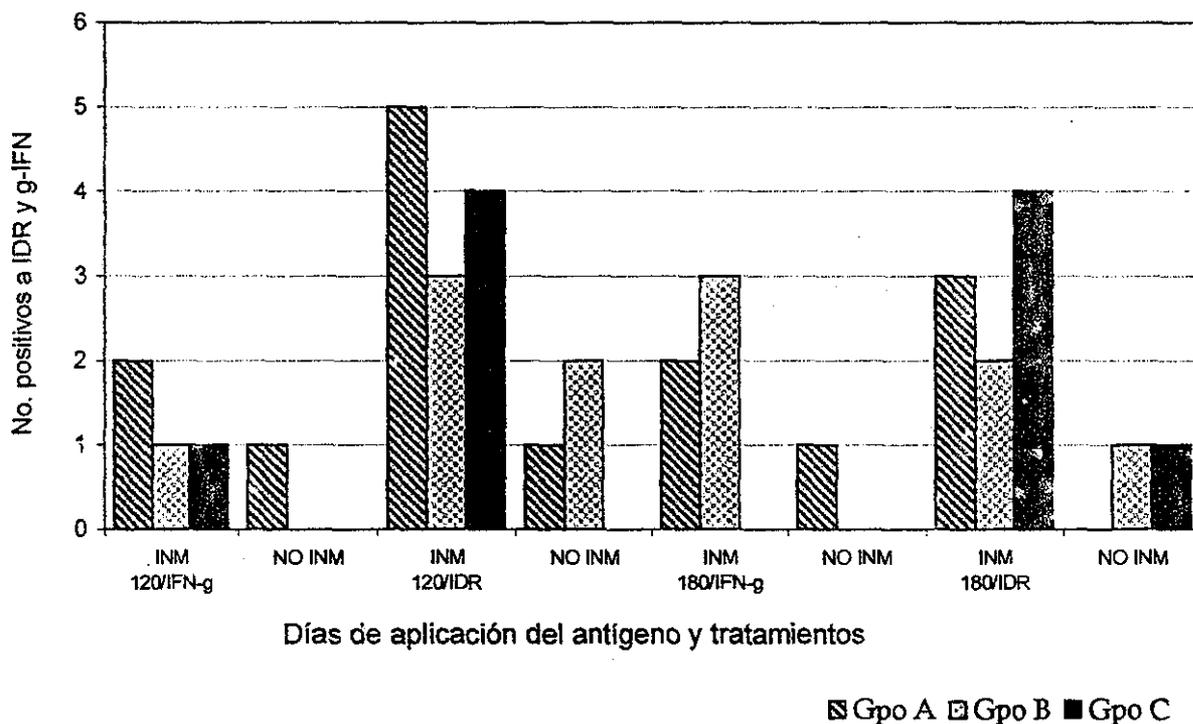


Figura 10. Comparación entre las pruebas de IFN- $\gamma$  e IDR a los 120 y 180 DPI con *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*, en cabritos inmunizados (INM) y no inmunizados (NO INM).

Gpo A: Inoculados con *Map* de origen caprino, Gpo B: inoculados con *Map* ovino, Gpo C: Testigo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### **4. Resultados clínicos y postmortem**

Durante el periodo de experimentación los animales no presentaron signos clínicos de paratuberculosis. Se presentó un problema de pediculosis para lo cual los animales recibieron tratamiento en dos ocasiones, aunque no se logró eliminar totalmente, pues los cabritos sacrificados a los 120 DPI, aún mostraban la presencia de estos parásitos, asimismo, los animales recibieron un tratamiento preventivo contra coccidiosis. Al momento de la necropsia, ninguno de los animales sacrificados a los 120 y 180 DPI, tenían evidencia de pérdida de condición corporal, diarrea, edema, o cualquier otra signología compatible con la PTB. Siempre estuvieron alertas y con una buena actitud.

##### **4.1 Hallazgos macroscópicos**

En el cuadro 1 se presentan las lesiones macroscópicas encontradas con mayor frecuencia en los cabritos sacrificados. Se puede apreciar que el engrosamiento del intestino se encontró con más frecuencia, principalmente en los animales inoculados/inmunizados, 2:2 y 3:3 en los grupos A y B respectivamente, así como 2: en el grupo C no inoculado/no inmunizado, en total 10 de los 12 animales. La linfangiectasia de la serosa y el aumento de tamaño de linfonodos se presentó en la mitad de los animales 6:12. Las lesiones se presentaron tanto en los inmunizados como en los no inmunizados de los tres grupos. Por otra parte, los cabritos del grupo C, tanto inmunizados como no inmunizados, fueron los más afectados, pues todas las lesiones estuvieron presentes en los 4 cabritos, a excepción de uno inmunizado, que no tuvo engrosamiento de la mucosa, cabe mencionar que en todos ellos se encontraron lesiones que sugieren la presencia de coccidias, en los segmentos afectados del intestino.

##### **5.2 Histopatología**

En el cuadro 2 se presenta un resumen de las lesiones asociadas a la infección por PTB encontradas en los cabritos sacrificados. Asimismo en el Apéndice se hace la descripción completa de los cambios anatomopatológicos encontrados. El hallazgo principal en las zonas afectadas fue un acúmulo de macrófagos y linfocitos, se

Cuadro 1. Proporción de cabritos afectados con lesiones macroscópicas en intestino, observadas con mayor frecuencia en animales inmunizados y no inmunizados, inoculados con *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*.

Lesión	Proporción de animales afectados*					
	A		B		C	
	INM	NO INM	INM	NO INM	INM	NO INM
Engrosamiento de intestino	2:2	1:2	3:3	1:1	1:2	2:2
Linfangiectasia en serosa	1:2	0:2	0:3	1:1	2:2	2:2
Linfonodos aumentados	0:2	1:2	1:3	0:1	2:2	2:2

\*Proporción de afectados, de los sacrificados a los 120 y 180 DPI  
 Grupo A: Inoculado con *Map* caprino, Grupo B inoculado con *Map* ovino, Grupo C: Testigo  
 INM: Inmunizados, NO INM: No inmunizados

consideró la extensión y localización de estas lesiones para llevar a cabo su clasificación de acuerdo a la propuesta de Pérez *et al.*, (1996) y empleando también la nomenclatura descrita por Juste *et al.*, (2000c). También se describe cualquier otro hallazgo de la necropsia no relacionado a la PTB. A continuación se menciona brevemente el diagnóstico morfológico y la clasificación correspondiente de las lesiones de cada animal sacrificado.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 2. Localización y órganos donde se apreciaron lesiones granulomatosas\*, en cabritos inmunizados y no inmunizados, sacrificados a los 120 y 180 dpi con *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*.

Gpo	DPI	INMUNIZADOS				NO INMUNIZADOS			
		Órgano	Localización	Lesión	Granul <sup>§</sup>	Órgano	Localización	Lesión	Granul
A	120	VIC	PP, zona IF	Tipo II	DM	IL	FL	Tipo I	AD
A	180	IL	PP, zona basal y apical	Tipo II	DM	VIC	No-PP, Lám propia	Tipo II	DM
						IL	PP, Lámina propia	Tipo II	DM
		Y	PP, zona IF y cúpula	Tipo I	AD	Y	No-PP, vellosidades	Tipo IIIa	DM
B	120	IL	PP, zona IF	Tipo I	AM				
			FL y cúpula	Tipo II	DM				
B	180	VIC	PP, lámina propia	Tipo II	DM	VIC	PP, zona IF y basal	Tipo I	AD
		IL	No-PP, Lám propia y criptas	Tipo II	DM	IL	No-PP, zona basal	Tipo II	DM
						PP, zona basal	Tipo I	AD	
C	120			SL	SL			SL	SL
C	180			SL	SL			SL	SL

\* Clasificación de acuerdo al criterio de Pérez et al (1996)

§ De acuerdo a la nomenclatura propuesta por Juste *et al.*, (2000c): Tipo de granuloma (Granul)  
AD: aislado-delimitado, DM: delimitado-multifocal.

Grupo A: inoculado con *Map* caprino, Grupo B: inoculado con *Map* ovino, Grupo C: Testigo

VIC: válvula ileocecal, IL: ileon, Y: yeyuno, PP: placa de peyer, IF: interfolicular, FL: folículo linfoide, SL: sin lesión.

### **A. Grupo infectado con *Map* caprino.**

De los animales inmunizados, el cabrito 6 sacrificado el día 120 presentó enteritis granulomatosa multifocal en válvula ileocecal (VIC), correspondiente a una lesión de tipo II con granuloma delimitado-multifocal (Figura 11). El cabrito 3 muerto el día 180, mostró enteritis granulomatosa focal en VIC, íleon y yeyuno, asociadas a placas de Peyer (PP), la lesión de tipo II, con granuloma delimitado multifocal. En nódulo vacunal se observó dermatitis granulomatosa multifocal severa.

De los animales que no recibieron la bacterina, el cabrito 8 sacrificado a los 120 DPI presentó enteritis granulomatosa focal en íleon, asociado a PP, ésta lesión es de tipo I, caracterizada por un granuloma aislado-delimitado. Mientras que en el sacrificio al día 180 PI del cabrito 2, las lesiones fueron enteritis granulomatosa focal en VIC, no asociado a PP, y en íleon asociado a tejido linfoide, en yeyuno también fue observada enteritis granulomatosa focal y multifocal, asociada y no asociada a PP. Se encontró linfangiectasia en íleon y yeyuno. En este animal las lesiones fueron de tipo II y IIIa, con granuloma delimitado-multifocal más extenso. En el nódulo vacunal del mismo animal, el hallazgo fue dermatitis perianexal y perivascular.

### **B. Grupo infectado con *Map* ovino.**

En los cabritos inmunizados sacrificados a los 120 días se encontró Enteritis granulomatosa focal en íleon, asociado a PP y linfangiectasia en VIC e íleon del cabrito 11, la lesión es tipo I, cuyo granuloma es aislado-delimitado. En el animal 15, la lesión fue enteritis granulomatosa multifocal y linfangiectasia en íleon, con relación a PP: lesión de tipo II, con granuloma delimitado-multifocal. En nódulo vacunal se halló dermatitis granulomatosa multifocal severa, con necrosis. En el cabrito 18 que fue sacrificado a los 180 DPI, se presentaron granulomas del mismo grado que el anterior, tipo II, delimitado-multifocal, la lesión encontrada fue enteritis granulomatosa focal en VIC con relación a PP y en íleon, pero no asociada a tejido linfoide. También presentó linfangiectasia en VIC e íleon. En nódulo vacunal se encontró dermatitis granulomatosa multifocal con necrosis (Figura 12).

En el cabrito 13 no inmunizado, cuya necropsia fue a los 180 DPI, se encontró enteritis

granulomatosa multifocal en VIC y enteritis granulomatosa focal con linfangiectasia en íleon y yeyuno asociado a PP, de grado tipo II, con granuloma delimitado-multifocal

### **C. Grupo testigo.**

En el sacrificio del día 120, del cabrito 26, inmunizado se encontró enteritis eosinofílica en íleon y yeyuno con edema, y en el cabrito 20 sacrificado a los 180 DPI, sólo se presentó edema discreto en submucosa de VIC y yeyuno.

En los cabritos no inmunizados, el animal 22 sacrificado a los 120 DPI, se vio afectado por enteritis eosinofílica en VIC, íleon y yeyuno, con edema y focos de necrosis, y en el sacrificio a los 180 DPI del cabrito 24 se observó edema moderado en lámina propia de VIC, íleon y yeyuno.

En todos los animales del grupo testigo, los cambios no corresponden a lesiones descritas de la infección por PTB, por lo que no fueron clasificadas como las demás. (Pérez *et al* 1996).

En los cortes histológicos con lesiones también se realizó la tinción de Ziehl-Neelsen, sin embargo, en ninguno de ellos fue posible encontrar bacterias que confirmaran la presencia de *Map* en las lesiones descritas.

En el cuadro 3 se hace un resumen de los resultados obtenidos en las pruebas de inmunidad celular y humoral en los cabritos sacrificados con relación al grado de lesión encontrada, se excluyen a los cabritos del grupo testigo que no mostraron ningún daño relacionado a la PTB. Es importante destacar que en el animal con lesión IIIa, delimitado-multifocal, que fue la más severa, la respuesta a las pruebas fue más pobre, pues únicamente fue positivo a la IDGA.

### **6. Cultivo Bacteriano.**

Los órganos de los cabritos sacrificados a los 120 DPI fueron procesados y cultivados en 2 tubos del medio de Löwenstein-Jensen con micobactina J y uno sin micobactina J, se incubaron a 37-38°C durante 28 semanas, los órganos de los cabritos

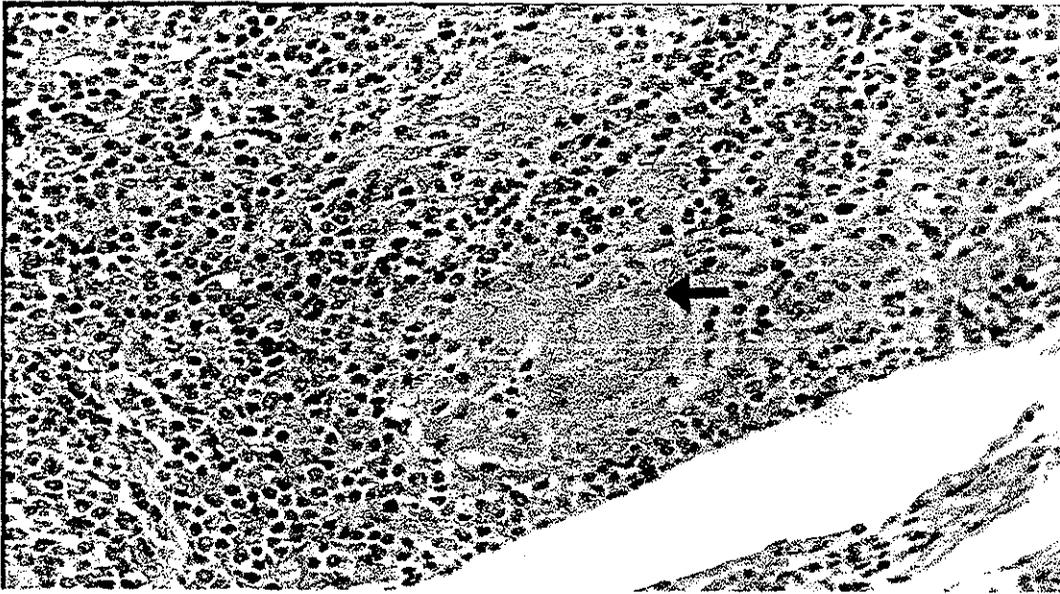


Figura 11. Reacción granulomatosa focal, ↑ en la zona interfolicular del tejido linfoide asociado en la mucosa de válvula ileocecal. Cabrito 6 del grupo A inoculado con *Map* caprino, no inmunizado, sacrificado a los 120 DPI. (HE 320 X)

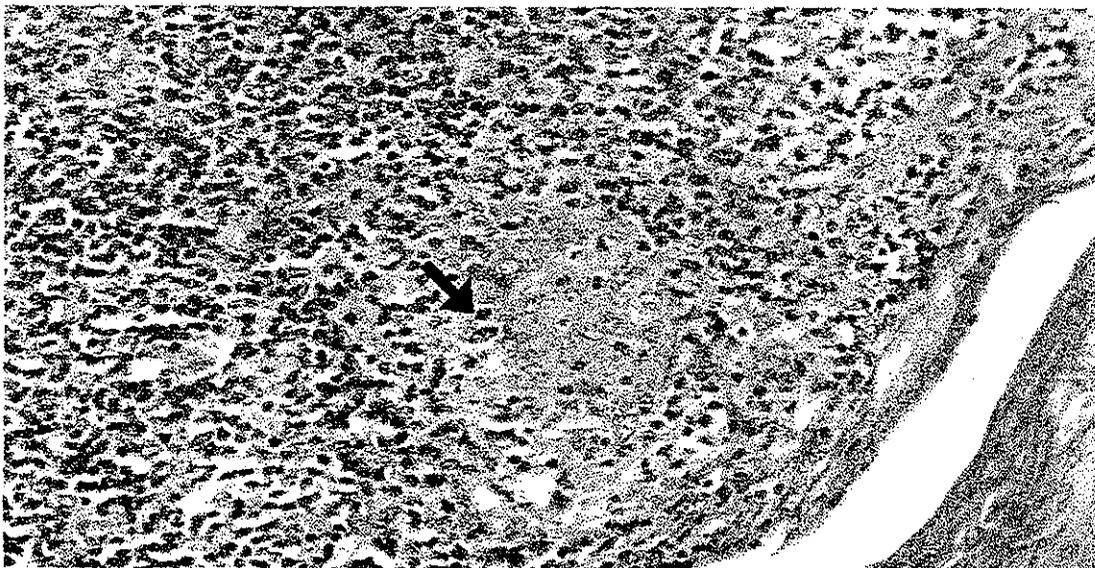


Figura 12. Reacción granulomatosa focal, ↑ en la base del folículo linfoide asociado a la mucosa del íleon, del cabrito 18 del grupo B inoculado con *Map* ovino, sacrificado a los 180 DPI. (HE 400 X)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

sacrificados a los 180 DPI fueron cultivados de la misma forma durante 24 semanas. En ninguno de los tubos se observaron colonias, en algunos que eran sospechosos se hicieron frotis teñidos con ZN, todos fueron negativos. No se logró obtener ningún aislamiento de los órganos de los cabritos sacrificados.

Cuadro 3: Relación entre el grado de lesión y los resultados de las pruebas realizadas en los cabritos inmunizados y no inmunizados, inoculados experimentalmente con *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*.

Grado de Lesión*	Granuloma <sup>†</sup>	Grupo / Tx	Pruebas realizadas				
			IDGA	ELISA	IFN- $\gamma$ <sup>§</sup>	IDR <sup>§</sup>	
III	DM	A / NO INM	P	N	N	N	
II	DM	A/ INM	P	P	P	P	
			P	N	N	P	
			P	P	P	N	
		B/ INM	P	P	P	N	
			P	P	P	N	
I	AD	A / NO INM	P	N	N	P	
			B / NO INM	P	N	P	N
				P	N	N	P

\* Grado de lesión de acuerdo al criterio de Pérez *et al.*, (1996)

<sup>†</sup> De acuerdo a la nomenclatura propuesta por Juste *et al.*, (2000) Tipo de granuloma: AD: aislado-delimitado, DM: delimitado multifocal.

<sup>§</sup> Resultados de las pruebas positivo al PPD-A ó PPD-B ó ambos.

Grupo A: inoculado con *Map* caprino, Grupo B: inoculado con *Map* ovino.

P: Positivo, N: negativo, INM: Inmunizado, NO INM: No inmunizado, Tx: Tratamiento

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## DISCUSIÓN.

### 1. Inoculación

Con la finalidad de estudiar la PTB y encontrar estrategias para su control, se han llevado a cabo infecciones experimentales. La mayor parte de los investigadores han empleado *Map* obtenidas de medios de cultivo (Gilmour *et al.*, 1965; Karpinsky y Zórawsky, 1975; Nisbet *et al.*, 1962; Saxegaard, 1990, Sigurdardóttir *et al.*, 1999) para infectar a becerros, corderos y cabritos aunque no se ha tenido éxito total en la reproducción de la enfermedad, probablemente porque la bacteria sufre cambios en su virulencia y patogenicidad con los pases en cultivos de laboratorio. Chávez, 1993 utilizó como inóculo bacterias purificadas directamente de intestinos de animales infectados. En el presente trabajo se empleó la misma técnica de purificación obteniéndose bacterias en cantidades de  $3.3$  y  $5.6 \times 10^{14}$  de origen caprino y ovino respectivamente, que posteriormente fueron capaces de crecer en medio de cultivo de Löwenstein-Jensen.

Asimismo se han empleado diversas vías para llevar a cabo las inoculaciones experimentales, en éste trabajo se decidió aplicar el inóculo por vía oral, debido a que es la vía de entrada natural de la bacteria. Gran parte de los trabajos de infección experimental han optado por esta vía (Gilmour *et al.*, 1965; Nisbet *et al.*, 1962; Pérez *et al.*, 1994; Saxegaard, 1990, Sigurdardóttir *et al.*, 1999), no obstante que Merkal *et al.* en 1968 obtuvieron mayor respuesta celular y humoral al llevar a cabo la infección por vía intratraqueal, la inoculación intravenosa también arrojó mejores respuestas con las pruebas de IDR y fijación de complemento, sin embargo no fue evaluada la presentación de lesiones. En el presente trabajo, no fue posible obtener aislamientos de los animales inoculados por vía oral, ni observar las bacterias en cortes histológicos con tinciones de ZN, asimismo, los resultados de las pruebas serológicas y los de inmunidad celular no fueron concluyentes para asegurar que se logró la infección experimental, no obstante, el hallazgo de lesiones discretas en todos los animales inoculados y la ausencia de las mismas en el grupo testigo, sugieren que se logró la infección. Los resultados de cada prueba se discutirán posteriormente.

## 2. Inmunización.

Fue comprobada la reacción local al inmunógeno por la persistencia del nódulo formado (Figura 1), el cual sólo se apreció en los animales que fueron inmunizados. La persistencia del mismo durante el tiempo que duró el trabajo podría ser un indicativo de protección celular, pues después de 20 años de experiencia con la vacuna en Francia, Doyle, (1964) menciona que en los animales en los que persiste el nódulo y los bacilos en él, no presentan signología de PTB. García-Marín, 1999b encontró que los nódulos postvacunales se desarrollaron de 1-5 cm con ulceraciones que complicaron el manejo de animales. En el presente estudio, los nódulos fueron de tamaño similar a los descritos por García-Marín y también se ulceraron, sin embargo no representó un problema para manipular a los cabritos y aparentemente éstos no se mostraron afectados por el nódulo. Tampoco se observó efecto secundario por la aplicación de la bacterina, como pérdida de apetito o depresión. López *et al.*, 1999 también describieron la formación de nódulos sin complicaciones posteriores.

## 3. Respuesta inmune humoral.

### 3.1 Inmunodifusión en Gel de Agar (IDGA).

No fueron encontrados animales positivos en ninguno de los grupos en los muestreos los días 1 y 14 PI (Figura 2), pues aun en el día 14 en que los animales habían sido inoculados, no se desarrolló respuesta inmediata, ya que al vivir dentro de las células, las bacterias se escudan de los mecanismos de inmunidad humoral, los cuales sólo empiezan a actuar cuando la infección avanza (Munk *et al.*, 1990; Sweeney 1996a). Cuando los macrófagos fagocitan a la bacteria pueden procesar algunos de los antígenos para presentarlos a los linfocitos T (Edwards y Kirkpatrick, 1986), por lo cual la protección es básicamente por la respuesta celular. En los trabajos de infección experimental no se ha encontrado respuesta humoral en un tiempo de 14 DPI (Pérez *et al.*, 1994; Saaxegard 1990; Sigurdardóttir *et al.*, 1999). La respuesta humoral se apreció a partir del día 30 PI, como se observa en la figura 2, con 4:5 seropositivos en los tres grupos de cabritos inmunizados. Se puede apreciar el efecto de la bacterina,

ya que de los animales no inmunizados, únicamente uno fue positivo a la prueba de IDGA, siendo un cabrito del grupo A infectado con *Map* caprino. Esta reacción temprana a la inmunización fue descrita por García-Marín *et al.*, (1999b) quienes encontraron respuesta humoral desde los 15 DPV, lo cual equivale al día 30 PI del presente trabajo, alcanzando máximos niveles entre los 60 y 120 días PV. Domínguez, (2000) obtuvo 48% de seropositivos 15 días PV, en cabras adultas de un rebaño infectado naturalmente, alcanzando un máximo porcentaje de 50% a los 30 días PV, en el presente estudio se encontró que todos los cabritos inmunizados fueron seropositivos a los 120 DPI, coincidiendo con los trabajos mencionados.

Sólo en los grupos A y B no bacterinizados se presentaron seropositivos, 1:3 y 2:3 respectivamente en el día 120, lo que pudiera indicar un progreso de la infección que estimulara la respuesta humoral. Saxegaard, (1990) infectó becerros y cabritos con *Map* de origen caprino, sólo un cabrito resultó positivo a IDGA 9 meses PI. Por otra parte, Pérez *et al.*, (1994) evaluaron la respuesta en corderos infectados con *Map* y también encontraron un animal seropositivo hasta los 120 DPI, el porcentaje de seropositivos se mantuvo por debajo del 30% hasta 350 DPI. Estas investigaciones que han empleado la prueba de IDGA para evaluar la respuesta humoral coincidirían con los resultados presentados, sin embargo no hubo evidencia estadística para concluir que la respuesta humoral en los grupos infectados fuera diferente de la del grupo testigo, a pesar de la ausencia de seropositivos en los cabritos no infectados, no inmunizados, probablemente esto se deba a que el tamaño de la muestra es muy pequeño.

### 3.2 Inmunoensayo enzimático (ELISA).

Los resultados negativos de ELISA de los dos primeros muestreos, presentados en la Figura 3, son similares a la prueba de IDGA, lo mismo que la presencia de seropositivos a partir del día 30 PI e incrementándose a los 120 y 180 DPI en los cabritos inmunizados. Ésto podría sugerir que el inmunógeno fue capaz de inducir una respuesta humoral temprana en los animales que la recibieron; tal y como lo han informado otros autores (Juste *et al.*, 1994). En los trabajos realizados por Gwózdź *et*

*al.*, (1999) y García-Marín *et al.*, (1999b), la respuesta postinmunización se incrementó ligeramente a partir de los 21 días posteriores a la inmunización (correspondiente a 35 DPI) en el primero y desde los 15 DPV en el segundo. En el presente estudio, todos los cabritos inmunizados del grupo B y C, así como 4:5 del grupo A fueron positivos a los 120 DPV, tal y como se muestra en la figura 3. En el trabajo llevado a cabo por Domínguez, 2000, se emplearon animales adultos, de un rebaño infectado y el porcentaje máximo de positivos después de la inmunización se logró a los 30 días con un 75%, a los 60 DPV, el porcentaje de positivos bajó al 47% y continuó decreciendo paulatinamente hasta los 330 DPV. No obstante la coincidencia con las investigaciones anteriores en cuanto al inicio de respuesta postinmunización, el análisis estadístico no demostró un efecto del inmunógeno y tampoco hubo diferencia estadística significativa entre grupos.

En la Figura 4 se aprecia el promedio de CDO en los tres grupos, en los animales inmunizados hubo un incremento en el CDO desde el día 30 PI, alcanzando niveles máximos a los 120 DPI con CDO de 0.925 en el grupo B. Los resultados presentados son similares a los trabajos realizados por Corpa *et al.*, (1999); García-Marín *et al.*, (1999b) y Gwózdź *et al.*, (1999) en corderos y cabritos, donde el índice de densidad óptica máximo se presenta entre los 60 y 180 días y se mantienen elevados hasta después de un año. El CDO mayor al final del presente estudio pudiera mostrar una respuesta humoral que se mantendría elevada por más tiempo, de la misma manera que los animales inmunizados en los trabajos anteriores. Sin embargo no fue posible mostrar que estas coincidencias en el incremento del CDO y la tendencia en la gráfica similar a los trabajos descritos, se deban a una respuesta inmune producida por la bacterina, ya que no hubo diferencia de medias significativa.

La función de una bacterina es generar una respuesta inmunológica que pudiera proteger al individuo, y aunque en la infección natural, la inmunidad humoral no parece jugar un papel relevante en la protección contra *Map* (Clarke y Little, 1994; Pérez *et al.*, 1994), las diversas bacterinas contra PTB empleadas en investigaciones previas también han mostrado capacidad para inducir una respuesta humoral (García-Marín *et*

*al.*, 1999b; Gwózdź *et al* 1999; Juste *et al.*, 1994). En esta investigación no hubo datos concluyentes sobre la activación del sistema inmune generada por la bacterina, lo cual pudo deberse un tamaño de muestra pequeño ya que hubo gran variabilidad de los resultados obtenidos

Por otra parte, en la figura 4 fue notorio el promedio del CDO que mantuvo bajos niveles en los cabritos que no fueron bacterinizados, aun en los infectados, en los cuales el CDO al día 180 fue de 0.53 y 0.47 en los grupos A y B, estos resultados concuerdan con algunos investigadores quienes han observado que la infección con *Map*, no es capaz de estimular una respuesta humoral temprana (Chiodini, 1996a). En otros estudios Chávez *et al.*, (1993) y Larsen *et al.*, (1999) encontraron un incremento leve en los anticuerpos 15 y 30 DPI respectivamente, pero sólo en algunos de los cabritos y corderos infectados. La mayor parte de los resultados positivos fueron encontrados después de los 220 DPI hasta un año PI. También el trabajo de Stewart *et al.*, (1999), mostró que de 15 animales infectados, 2 tuvieron resultados positivos a los 120 y 150 DPI. En contraste con esos resultados, en los estudios de Gwózdź *et al.*, (1999) y Sigurdardóttir *et al.*, (1999), los corderos y cabritos infectados no inmunizados sólo mostraron un pequeño incremento en el índice de ELISA entre los 237 y 240 DPI.

La técnica de ELISA ha mostrado resultados diferentes en las investigaciones realizadas, algunos mencionan que se comporta de manera semejante a las otras pruebas serológicas en ovinos y caprinos (Burnside, 1994; Hilbink *et al.*, 1994), mientras que en otros donde se ha empleado en bovinos, la prueba de ELISA ha sido superior detectando mayor número de animales con respuestas más tempranas (Jark *et al.*, 1996). Aunque el resultado humoral puede depender del grado de lesión encontrada (Clarke *et al.*, 1996c). A pesar de que las dos pruebas detectan la respuesta humoral a la inmunización, pocos días después de su aplicación, en el presente trabajo, la prueba de IDGA fue capaz de detectar un mayor número de animales positivos con respecto a la de ELISA y también más pronto. Estos resultados discrepan con los reportados en otras investigaciones, donde ELISA ha detectado de manera precoz, un mayor número de animales después de la inmunización

(Domínguez, 2000) o de la infección natural, evaluada por el grado de lesión (Pérez *et al.*, 1993a, Vélez, 1998). Es posible que los resultados obtenidos en este trabajo tengan discrepancias con otros debido a que la técnica de ELISA empleada aun no se encuentre bien estandarizada. Incluso a escala mundial, la prueba que se utiliza varía en cada país, mientras que algunos investigadores emplean el kit comercial de IDEXX (Clarke *et al.*, 1996c, Sigurdardóttir *et al.*, 1999), otros emplean sólo antígenos comerciales (Domínguez, 2000; Vélez, 1996). Algunos investigadores fabrican sus propios antígenos, purificados como johnina (Saaxegard, 1990) o bien emplean metodologías modificadas por el grupo de trabajo (Jark *et al.*, 1996). Por otra parte, debido a las características de la prueba de ELISA, que requiere de mucha precisión en su desarrollo, es más probable que se presenten errores en el procedimiento de ésta, lo cual pudo causar resultados incorrectos.

Ya que la respuesta humoral se mantiene durante un largo periodo, podría representar un problema debido a la dificultad de identificar una reacción al inmunógeno o una respuesta a la infección. En un reporte de Hilbink y West, 1990 concluyen que la inmunización interfiere con las pruebas serológicas IDGA y FC', al menos por 16 y 23 semanas, respectivamente. Evaluando con ELISA, se ha encontrado que la respuesta humoral se mantiene hasta por un año PV (Corpa *et al.*, 1999; Gwózdź *et al.*, 1999). Sería necesario evaluar por un periodo mayor el comportamiento de las pruebas serológicas en animales infectados-inmunizados y cabritos sólo infectados, para determinar si la respuesta al inmunógeno disminuye mientras la reacción a la infección se incrementa.

#### **4. Respuesta inmune celular.**

##### **4.1 Intradermorreacción IDR**

Al llevar a cabo una prueba de intradermorreacción doble comparativa se pretende obtener mejores resultados evitando los falsos positivos. La micobacteria responsable de la PTB es una subespecie del *M. avium* (Juste, 2000a), por lo cual se esperaría que los animales tanto infectados como inmunizados tuvieran reacción al PPD-A o que fuera mayor el número de reactores a ésta que al PPD-B. Se puede apreciar en la

Figura 5 que la reacción al PPD-A fue muy similar a la del PPD-B, sólo fue mayor el porcentaje de animales reactivos al antígeno aviar en el grupo A, a los 180 y en el B a los 120 DPI. Los antígenos empleados en esta prueba no son específicos de la especie *M. avium*, sino que comparten antigenicidad con otras especies de micobacterias e incluso con otros géneros (Chiodini, 1984; Gunnarsson y Fodstad, 1979), por lo tanto es posible que los animales infectados o inmunizados con *Map* tengan reacción a la tuberculina mamífera aunque en menor grado que a la aviar (Collins *et al.*, 1984; García Marín *et al.*, 1999a; Johnson *et al.*, 1977; López *et al.*, 1999). No obstante, en trabajos realizados anteriormente también se ha presentado una reacción similar al PPD-B y PPD-A (Domínguez, 2000), lo cual podría atribuirse a que en la fabricación de la bacterina no se utilizan antígenos purificados, sino micobacterias completas, y lo mismo ocurre con los PPDs, de modo que todos los antígenos que tienen, pueden estimular una reacción inmunogénica. Por otra parte, debido a que estos antígenos son empleados para el diagnóstico de la tuberculosis bovina, la concentración del PPD-B es mayor que el del PPD-A, por lo que se incrementa la posibilidad de una respuesta al primero. Finalmente, estos resultados podrían explicarse como reacciones cruzadas con otros agentes, tales como *Corynebacterium pseudotuberculosis*, la cual parece haber afectado a 3 ó 4 animales durante la investigación, pues aunque no fue aislado el agente etiológico, se encontraron abscesos en linfonodos submandibulares con el exudado pastoso (caseoso) muy similar a lo que se presenta en la linfadenitis caseosa en caprinos.

En las investigaciones realizadas con inmunógenos, los animales siempre muestran reacción a la inmunización, presentándose desde los 30 DPV (Domínguez, 2000; Larsen, 1950), en la Figura 5 se observa que también en el presente estudio hubo reactivos a los 120 DPI, 5:5 en el grupo A, 3:5 en el B y 4:5 en el C, en los cabritos inmunizados, lo cual podría sugerir que se trata de una respuesta inmune celular (RIC) a la bacterinización, sin embargo, por falta de evidencia estadística no es posible concluir que fue generada por la inmunización. En el muestreo a los 180 DPI, el número de reactivos del grupo A bajó a 3:4, mientras que en el control se incrementaron los reactivos a 4:4. Estos resultados podrían coincidir con García Marín

*et al.*, (1999a), quienes obtuvieron mayor número de cabritos reactivos a los 120 DPV que a los 350 días y Domínguez, (2000), que encontró 88% de reactivos al PPD-A y PPD-B desde los 21 DPV, y 4 meses después el porcentaje disminuyó a 78%. Por su parte López *et al.*, (1999) inmunizaron becerros encontrando que la respuesta persistió hasta 350 días posteriores a la misma. No hay evidencia de que la reacción inmune de los animales se deba a la bacterinización, sin embargo, de ser así, indicarían que el inmunógeno estimuló una RIC que se mantuvo por lo menos durante 180 DPI, si bien no es lo suficientemente fuerte, para que se mantenga en todos los animales en una forma constante y por un lapso mayor.

En los estudios realizados anteriormente se ha demostrado que la RIC es la primera en aparecer en las infecciones de *Map* (Larsen *et al.*, 1999; Pérez *et al.*, 1994; Stewart *et al.*, 1999), por lo que en este estudio era esperada una RIC también en los animales infectados no bacterinizados. No obstante, sólo un cabrito fue positivo al PPD-A a los 120 DPI y ninguno a los 180 días y otro positivo al PPD-B en el grupo B a los 180 DPI. Tampoco se observó una adición en la respuesta a la bacteria, que pudiera atribuirse a la infección en los grupos A y B inoculados, que mostrara la inmunidad celular, contrario a los hallazgos de Karpinsky y Zórawsky, 1975 en corderos y Johnson *et al.*, 1977 con becerros, con reactivos desde los 60 DPI y cerca del 95% de positivos entre los 120 y 150 DPI. Por otra parte, no todas las investigaciones han coincidido, Gilmour *et al.*, 1965 obtuvieron reactivos a los 30, 90, 120 y 180 DPI, aunque pocos animales y en forma inconsistente, asimismo, en el trabajo de Sigurdardóttir *et al.*, 1999 una cabra reaccionó sólo a los 90 DPI y una diferente a los 180 y 270 DPI. Siendo éstos resultados semejantes a los del presente estudio. Cabe señalar que hubo un animal no infectado, del grupo C, que resultó positivo a la prueba, lo cual podría atribuirse a una respuesta cruzada con otras bacterias como ya fue mencionado (Clarke, 1997a).

La falta de correlación observada en las Figuras 7 y 8 de las pruebas de IDR y ELISA, quizás muestran la inconsistencia en los resultados obtenidos, principalmente los de ELISA, ya que si bien son pruebas que detectan dos tipos diferentes de inmunidad, ambas deben ser capaces de localizar una respuesta dada por un inmunógeno, por lo

que sólo la correlación media  $r^2=0.41$ , encontrada con el PPD-B muestra parcialmente esa capacidad, la cual no se observó con el PPD-A. Este resultado puede indicar que la respuesta inmune generada por la bacterina no es específica de *Map*, pues como ya se mencionó, comparte antígenos con otras bacterias como micobacterias saprófitas, que pudieran ocasionar falsos positivos al PPD-B. No obstante, esta observación discrepa con los resultados de otras investigaciones, donde los animales bacterinizados reaccionaron más al antígeno aviar (Collins *et al.*, 1984; García Marín *et al.*, 1999a; López *et al.*, 1999). Es probable que la explicación de esta diferencia se deba a la concentración de los PPDs, que como ya se dijo, es 4 veces mayor para el bovino que para el aviar. Por otra parte, la correlación  $r^2=0.62$  con el PPD-A en los animales no inmunizados, ocasiona mayor desconcierto, ya que en los animales que no recibieron inmunógeno, se esperaría una respuesta celular temprana, sin respuesta humoral (Pérez *et al.*, 1994; Sweeney, 1996b), de manera que no debería haber coincidencias entre los resultados obtenidos en este estudio con ambas pruebas. Los resultados encontrados en la correlación se ven afectados por los problemas y variaciones de cada prueba por separado, por lo que no deben ser muy confiables. García Marín *et al.*, 1999a evaluaron ELISA e IDR, ya aunque no se hicieron pruebas de correlación, informaron que ambas pruebas pueden detectar bien a los animales con la enfermedad, pero en diferentes momentos de acuerdo al tipo de lesión presente.

#### 4.2 Interferón gamma (IFN- $\gamma$ )

En trabajos llevados a cabo anteriormente se ha demostrado que la producción del IFN- $\gamma$  por células mononucleares estimuladas por el antígeno específico (*Map*), es útil para llevar a cabo un diagnóstico en animales subclínicos (Stable, 1996). Aunque el kit de Bovigam® fue creado para el diagnóstico de la tuberculosis, ha sido probado también en la detección de PTB, encontrándose resultados positivos correspondientes con otras pruebas (Chávez *et al.*, 1993; Gwózdź *et al.*, 1999).

No fue posible detectar un efecto del inmunógeno en la respuesta del IFN- $\gamma$  como puede verse en la Figura 9, pues la diferencia encontrada en algunos casos es muy pequeña, a los 120 DPI el promedio del CDO fue mayor en los animales bacterinizados que fueron estimulados con el PPD-A, por el contrario en los animales no inmunizados e infectados, el promedio del CDO fue levemente mayor en las muestras expuestas al PPD-B. Los resultados fueron totalmente inconsistentes y no permitieron llegar a una conclusión con respecto al uso de la bacterina, pues aunque fueron 14 animales positivos a la prueba, se encuentran dispersos en diferentes grupos en los dos muestreos y con ambos PPDs, sin mostrar tendencia definida. En esta prueba no existió diferencia estadística significativa entre grupos y tratamientos, lo que podría deberse al número pequeño de muestra y la variabilidad en los resultados obtenidos, también es posible pensar que la reacción individual jugó un papel importante en los resultados por grupo, afectado mayormente por la muestra pequeña.

Los resultados que se obtuvieran de esta prueba eran muy importantes para investigar la acción de la bacterina sobre el sistema inmunológico, en concreto la RIC, de los animales, que pudiera darse en forma temprana. En la investigación llevada a cabo por Gwózdź *et al.*, (1999) se manifestó una respuesta clara en la prueba de IFN- $\gamma$  a la inmunización, encontrando un ligero incremento desde el día 35 PI en animales inmunizados y un nivel máximo 65 DPI que fue disminuyendo posteriormente de manera paulatina manteniendo niveles después de un año PI. Por otro lado en los corderos no bacterinizados, la respuesta se incrementó después de los 120 DPI y se mantuvo hasta los 370 días pero siempre por debajo de los corderos inmunizados. Estos resultados no son similares a los del presente trabajo, donde no hubo diferencia ni con el grupo control, especialmente a los 180 DPI cuando el CDO del PPD-B fue mayor mientras que en el trabajo de Gwózdź *et al.*, (1999) la respuesta decrecía. Se pensó que parte de la diferencia pudo tener su origen en que en ese trabajo, emplearon el PPA-3 para estimular los plasmas obtenidos, lo que podría explicar la falta de estímulo fuerte en el presente, tampoco hizo un comparativo con el PPD-B. No obstante, en un trabajo de Chávez *et al.*, (1993) con infección experimental en

corderos, no se demostró que existiera diferencia entre el uso del PPD-A, PPD-B y el PPA-3 hasta los 220 DPI, cuando ya se observaron resultados diversos. Por su parte, Corpa *et al.*, (1999) sí utilizaron un PPD-aviar para estimular los linfocitos del plasma de cabritos y la respuesta fue similar a la obtenida por Gwózdź *et al.*, (1999), se encontró un incremento significativo desde el día 30 PV, que fue el máximo y posteriormente decreció de manera trascendente a los 90 DPV. La respuesta en el tiempo de ambos trabajos podrían explicar en parte, porqué a los 120 DPI (105 DPV) ya no se encontró una diferencia entre los animales inmunizados y los que no lo fueron, el ensayo a los 30 DPI que no pudo hacerse por la hemólisis de los plasmas, debió ser muy valioso para mostrar una respuesta a la bacterina. En el trabajo de Corpa *et al.*, (1999) hallaron resultados de DO superiores en el grupo inmunizado hasta los 180 DPV, sin embargo no existió diferencia significativa respecto al grupo control cuando los animales fueron inmunizados a los 15 días de edad, mientras que en animales bacterinizadas a los 5 meses de edad, la respuesta se mantuvo por mayor tiempo con diferencias con el grupo control no inmunizado. En dicho trabajo se concluye que cuando se aplica el inmunógeno a los 5 meses de edad se induce una respuesta inmune más fuerte y duradera, lo que podría significar una diferencia relevante con el presente estudio, ya que los cabritos fueron inmunizados alrededor de los 30 días de edad.

Con respecto a la respuesta celular a la infección con *Map*, en la misma Figura 9, se muestra que sólo los del grupo B que no fueron bacterinizados, tuvieron CDO elevado a los 180 DPI. En contraste, en un trabajo realizado por Chávez *et al.*, (1993) empleando el mismo kit comercial para medir IFN- $\gamma$ , los corderos infectados experimentalmente, resultaron positivos entre los 54 y 80 DPI al PPD-A, PPD-B y PPA-3, sin diferencias entre los antígenos, además los animales mantuvieron su respuesta celular por lo menos durante un año. En el trabajo de Chávez se emplearon los PPDs en una concentración de 30 $\mu$ g / 150 $\mu$ l, mientras que en el presente estudio la concentración utilizada fue de 20 $\mu$ g / 150 $\mu$ l, lo que podría significar una estimulación deficiente de los linfocitos.

Por su parte Gwózdź *et al.*, (1999) encontraron que la respuesta de IFN- $\gamma$  en los animales infectados se iniciaba después de los 120 DPI, pero fue hasta los 190 DPI en que se observaron diferencias significativas con corderos no infectados, llegando a un pico a los 250 DPI, este resultado podría explicar parcialmente la falta de respuesta en los cabritos infectados del presente estudio. En un trabajo de Stewart *et al.*, (1999) con infección experimental con *Map* de origen bovino, se notifican resultados positivos a IFN- $\gamma$  a partir de los 3 meses PI, sin embargo los cabritos fueron infectados a los 5 meses de edad, este resultado podría coincidir con el de Corpa *et al.*, 1999 al inmunizar cabritos a la misma edad, donde en ambos se muestra una respuesta inmune celular temprana. Igual que lo ocurrido con la detección de la respuesta humoral, sería necesario un mayor número de observaciones posteriores para obtener un perfil más completo de la RIC generada tanto por el inmunógeno como por la infección experimental.

Al comparar las dos pruebas que miden la respuesta inmune celular en la Figura 10 se observó que la IDR detectó a un mayor número de animales positivos que la IFN- $\gamma$ , se destaca a los 120 DPI que 12 cabritos inmunizados fueron reactivos a IDR contra sólo 3 en la de IFN- $\gamma$ , aunque a 180 DPI el número de positivos fue menor, ésto muestra que la IDR fue más sensible especialmente al inmunógeno. García-Marín *et al.*, 1999a encontraron resultados similares entre ambas pruebas en corderos inmunizados con lesiones tempranas, sólo hubo diferencia en los animales con lesión difusa, siendo mejor la de IFN- $\gamma$ .

Es posible que los resultados poco adecuados obtenidos en el presente estudio con respecto a la prueba de IFN- $\gamma$  se deban a fallas de laboratorio al emplear la técnica, pues a pesar de que no hubo evidencia estadística entre los grupos y tratamientos para las pruebas de IDR, sí fue posible observar a los positivos en grupos definidos, sugiriendo una pequeña respuesta al inmunógeno y la infección experimental. La posible causa de la falla puede encontrarse en la estimulación con los antígenos PPD, ya que fueron dializados para eliminar el exceso de fenol, pero pudo ocurrir que aun

así, no funcionaron apropiadamente. Otra causa como se mencionó anteriormente puede ser que se utilizara una menor concentración de la necesaria para realizar un buen estímulo de los linfocitos. Ya que el protocolo de este ensayo no indicaba que fuera indispensable la incubación las muestras con CO<sub>2</sub>, como recomiendan algunos autores, la estimulación se hizo en un medio aeróbico, sin embargo en una investigación anterior\* se encontró que si el plasma no se incubaba con CO<sub>2</sub>, no se obtenían resultados adecuados. Por otra parte, también hubo diferencia en la forma de interpretar los resultados, ya que en el presente estudio se empleó el criterio establecido por los fabricantes del equipo comercial, para diagnosticar tuberculosis, pero considerando el plasma incubado con el PPD-A como el principal, mientras que en otros trabajos como el de García-Marín *et al.*, 1999a, se obtuvo un índice con el cociente resultante de la DO del PPD-A entre la DO del plasma con PBS, obteniéndose valores diferentes. Finalmente, el hecho de que IDR mostrara más positivos pudiera deberse a la menor especificidad de esta prueba, por lo que pudieran ser reacciones cruzadas, como ya se había mencionado. A semejanza de lo ocurrido con las pruebas que detectan anticuerpos, también los resultados pudieron afectarse debido a que es también una prueba de ELISA, y el desarrollo de la ésta es más delicado y con mayor posibilidad de error que la IDR.

##### **5. Estudios clínicos y postmortem**

A pesar de haber empleado una dosis muy elevada de bacterias en la inoculación, el estudio finalizó a los 180 DPI, cuando los animales contaban con un máximo de 8 meses de edad, por lo cual, no se esperaba encontrar signos clínicos característicos de la enfermedad que se presentan en adultos jóvenes (Nakamatsu *et al.*, 1968, Pérez *et al.*, 2000), tal y como ocurrió.

---

\* Gutiérrez PJA, comunicación personal.

### 5.1 Hallazgos macroscópicos

En el Cuadro 1 se observan los cambios macroscópicos más comunes, encontrados en los cabritos sacrificados. Se observó engrosamiento de la mucosa intestinal en 10 de los 12 cabritos sacrificados, éste hallazgo fue más común en íleon y algunas porciones del yeyuno, sólo en un cabrito del grupo B se observó la VIC dilatada, mientras que en tres animales del grupo C también se apreció el incremento en el grosor de la válvula ileocecal. Únicamente hubo un cabrito del grupo A (Figura 13) donde se encontró, en forma discreta, la mucosa gruesa y arrugada transversalmente característico de la PTB. Además se apreció linfangiectasia y los linfonodos aumentados de tamaño y/o fusionados en 6:12 animales, 1 del grupo A, 1 del B y los 4 del C, aunque no siempre en el mismo cabrito.

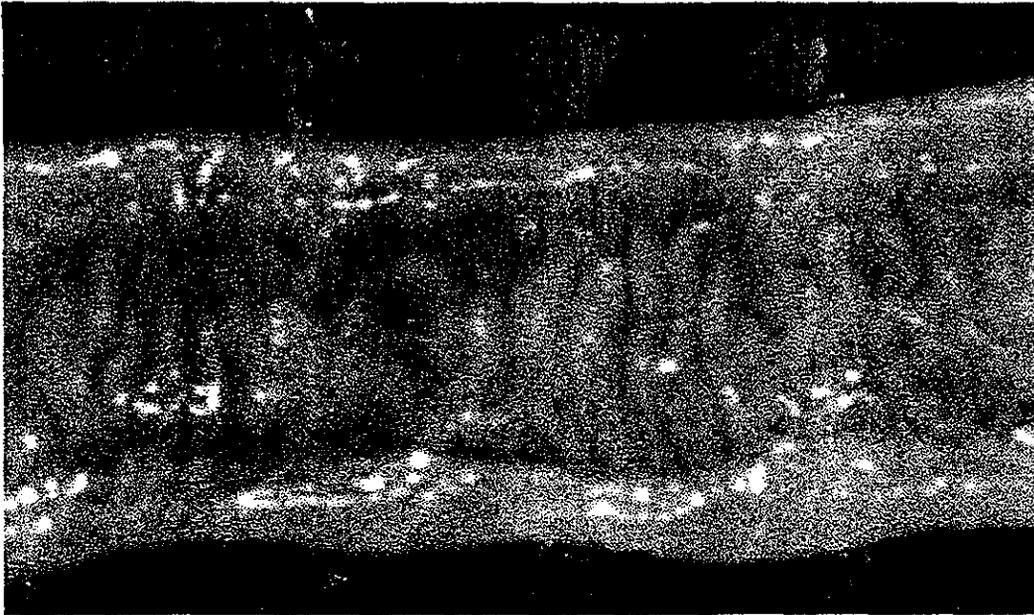


Figura 13. Sección de íleon de un cabrito del grupo A inoculado/inmunizado, donde se muestra un engrosamiento discreto de la mucosa.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Ya que no existió diferencia en las lesiones macroscópicas encontradas en los cabritos infectados, con respecto a los no infectados del grupo C, y que éstos fueron los que presentaron más lesiones macroscópicas, éstas no pueden ser adjudicadas a la PTB, es probable que los cambios macroscópicos apreciados se deban a otra enfermedad, pudiendo relacionarse con un problema de coccidiosis, pues en 8:12 animales se encontraron los puntos blanquecinos compatibles con nidos de esquizoontes, asimismo en la histopatología se encontró enteritis eosinofílica y la presencia de los parásitos. El engrosamiento de la mucosa se relaciona con el edema presente en las muestras de intestino. Por otra parte, algunos estudios con animales adultos infectados naturalmente, han revelado diversos cambios como emaciación, edema submaxilar, ascitis e hidropericardio y congestión intestinal, que no fueron encontrados en los animales del presente estudio, ya que corresponden a lesiones en una etapa más avanzada de la enfermedad (Rajya y Singh, 1961). Por tal motivo, a excepción del cabrito 6 del grupo A, las lesiones macroscópicas encontradas, no son indicativas de la infección por *Map*. Sigurdardóttir *et al.*, (1999), no encontraron lesiones macroscópicas en cabritos infectados experimentalmente y sacrificados hasta los 12 meses de edad, excepto en un animal, donde sólo se observaron ligeras nodulaciones que se unían en una porción del intestino. Por su parte, Juste *et al.*, (1994) encontraron lesiones macroscópicas sólo en dos corderos que fueron sacrificados a los 220 DPI.

## 5.2 Histopatología

En el Cuadro 2, se puede ver que todos los animales infectados (Grupos A y B), presentaron algún grado de lesión característica de PTB, mientras que de los cabritos no infectados (Grupo C), ninguno presentó este tipo de lesiones. Como puede apreciarse, la lesión más severa encontrada fue IIIa, con granuloma delimitado multifocal, en un cabrito muerto a los 180 DPI, del resto la mayoría fueron lesión II que corresponde también a granuloma delimitado multifocal pero de menor extensión y sólo un animal, tuvo lesión I, correspondiente a granuloma aislado-delimitado. De igual manera, Sigurdardóttir *et al.*, (1999) encontraron lesiones en los cabritos sacrificados a

partir de los 120 DPI, las lesiones descritas por estos investigadores, corresponderían más con el tipo II, siendo multifocales y localizadas principalmente en submucosa y lámina propia en las PP aunque de mayor extensión. Nisbet *et al.*, 1962 encontraron en corderos infectados, cambios muy similares a las del presente estudio a los 120 DPI, en tanto que a los 180 DPI, uno de los animales no tuvo lesiones y en el otro fueron muy extensas desde el Y a la VIC, aunque confinadas principalmente al tejido linfoide del intestino. Fueron encontradas, además de los linfocitos, muchas células epitelioides y gigantes tipo Langhans y de cuerpo extraño. Éste último hallazgo, difiere con lo que se observó en la presente investigación, pues las células encontradas con mayor frecuencia fueron macrófagos y linfocitos y fue raro encontrar células gigantes, la lesión descrita coincide con la del tipo IIIa, delimitado-multifocal. Por su parte Chávez *et al.*, 1992, describieron lesiones granulomatosas focales, limitadas a la zona IF del IL y Y, en corderos infectados y sacrificados a los 120 DPI, coincidiendo con las lesiones tipo I encontradas en los cabritos de este estudio.

Es importante enfatizar que los cabritos del grupo B que fueron infectados con *Map* de origen ovino, tuvieron lesiones similares a las encontradas en los animales inoculados con *Map* caprino. Uno de los objetivos de este trabajo era tratar de investigar si existía especificidad de especie, y de acuerdo a los resultados histopatológicos obtenidos se sugiere que al menos los caprinos inoculados con *Map* de origen ovino, pueden desarrollar lesiones compatibles con PTB. Las lesiones observadas en los cabritos inoculados no se encuentran suficientemente desarrolladas y no parecen una evidencia total de la infección, sin embargo, la ausencia de este hallazgo en todos los animales del grupo C, no inoculado, apoyan la propuesta de que dichas lesiones son consecuencia de una infección por *Map*. En un estudio de Collins *et al.*, (1990) los aislamientos provenientes de caprinos, ovinos y bovinos fueron analizados por medio de restricción de endonucleasas e hibridización. De acuerdo al patrón de ADN que encontraron, fueron clasificadas en dos grupos, todos los de bovino eran del grupo denominado C, mientras que la mayor parte de las cepas ovinas, son del grupo S, de las 10 cepas caprinas, 9 fueron del grupo C y sólo una del S, mostrando que las bacterias aisladas de ovinos son las diferentes. Aunque desde hace tiempo se había

sospechado la diferencia de los bacilos de ovinos debido a la dificultad para su aislamiento (Hole, 1958), las lesiones encontradas en los cabritos de los grupos A y B inoculados, podría mostrar que las bacterias de origen ovino tienen capacidad de infectar a las cabras. Asimismo, Chiodini *et al.*, 1985 no encontraron ácidos grasos específicos que diferenciaron a las bacterias de cabras, bovinos y ovejas, esto implica, que a pesar de existir diferencias, las cepas aisladas de las tres especies comparten muchas características, explicando el hallazgo de lesiones en los dos grupos inoculados. Por otra parte, Collins *et al.*, (1984) y Saaxegard, (1990) fueron incapaces de reproducir la enfermedad en becerros infectados experimentalmente con bacterias aisladas de caprinos, sin embargo, ambos lograron aislar *Map* de linfonodos e intestino delgado. Este hecho podría plantear una diferencia en susceptibilidad de especie, más importante que la variación de las cepas. Más recientemente, Djønné *et al.*, (1999), plantean la posibilidad de que las cabras sean una fuente de infección para el ganado vacuno en Noruega, donde no habían sido reportados casos de PTB por años en los bovinos, pero sí en caprinos. Existen muchas discrepancias como se mostró en las investigaciones anteriores. En el presente estudio no es posible concluir que los caprinos tuvieron una reacción inmunológica (humoral y celular) al ser inoculados con *Map* procedente de ovinos, aunque los resultados de IDGA y ELISA parecen insinuarla, pues además de la respuesta al inmunógenos, sólo en los grupos A y B, con animales inoculados hubo seropositivos. La presencia de lesiones encontradas en los dos grupos a los que se les administró el inóculo, sugieren una susceptibilidad de la especie caprina a las bacterias procedentes de la especie ovina, como una forma de confirmar la infección, pues no existe otro proceso patológico que produzca este tipo de lesiones. No obstante, es necesario llevar a cabo estudios más profundos para identificar y/o diferenciar los aislamientos empleados en el experimento.

Con respecto al tratamiento con inmunógeno, no se logra apreciar un efecto claro de éste sobre las lesiones encontradas en los cabritos de cada grupo, ya que se encontraron lesiones tipo I, aislado-delimitado y tipo II, delimitado-multifocal, tanto en los que fueron inmunizados como en los que no lo fueron. Asimismo, los cambios se hallaron en porciones similares del IL, Y y VIC, así como la localización, cuyo

predominio fue en el tejido linfoide especialmente en la zona interfolicular, probablemente porque es el lugar donde predominan los linfocitos T (Larsen y Landsverk, 1986). Sólo en el cabrito 2 del grupo A, el cual no recibió la bacterina, se encontró una lesión IIIa que pudiera indicar que tuvo menos protección. Por otra parte, es posible percibir una diferencia en la presentación del daño con relación al momento del sacrificio, pues tanto en el grupo A como en el B, los animales sacrificados a los 180 días, tuvieron un mayor grado de lesión, que los muertos a los 120 días, fueran o no bacterinizados. Además en éstos últimos, las lesiones fueron localizadas sólo en VIC e IL en su parte distal. Juste *et al.*, (1994), hallaron lesiones desde los 45 DPI, encontrando diferencias en los inmunizados con los no inmunizados. Mientras que en los primeros, se encontraron focos granulomatosos en la zona interfolicular de las PP y en linfonodos, en los segundos se observó principalmente infiltración polimorfonuclear también en las PP, no obstante, cuando los corderos fueron sacrificados a los 120 DPI, ambos grupos presentaron una reacción granulomatosa que fue más extensa en el grupo bacterinado, éste resultado coincide parcialmente con el presente estudio. Resultados similares encontraron García Marín *et al.*, (1996) observando lesiones a los 150 y 350 DPI, concluyendo que la inmunización contra PTB limita el desarrollo de las lesiones en los animales infectados. Los resultados del presente estudio no concuerdan con las investigaciones anteriores sobre el uso de un inmunógeno, no es posible concluir que la bacterina fue eficiente en el control de lesiones o de la infección. Sin embargo, dado que el lapso de tiempo en que se realizó esta investigación es muy corto para una enfermedad crónica como PTB, sería necesario hacer un seguimiento por más tiempo para observar la presentación de signos o el desarrollo de lesiones menos severas o bien la regresión de las mismas en los animales inmunizados en comparación con los que no recibieron ese tratamiento, como han encontrado algunos investigadores (Gwózdź *et al.*, 1999; Juste *et al.*, 1994)

La ausencia de bacilos ácido-alcohol resistentes en los cortes histológicos, no permitió confirmar la presencia de *Map* en las lesiones características de PTB, sin embargo, pudiera ser que el agente etiológico no fuera detectado por medio de la tinción ZN. En

la descripción de las lesiones de Pérez *et al.*, (1996), hace referencia a que no pueden ser detectados los bacilos ácido-alcohol resistentes en el granuloma aislado-delimitado de las lesiones tipo I, y en las de tipo II son muy escasos. Ésto podría deberse a la transformación de *Map* a formas celulares de pared deficiente, que no pueden detectarse con la tinción de ZN y que han sido descritas por Hulten *et al.*, (2000).

Por otro lado, los resultados que se muestran en el Cuadro 3, indican que los animales con lesión de granuloma delimitado-multifocal, grado II, son los que tuvieron más respuestas positivas a las pruebas realizadas. Estos resultados podrían relacionarse más con el inmunógeno que con el daño en la mucosa, pues 5 cabritos de los 6 con este grado de lesión eran inmunizados. No obstante, destaca el cabrito con lesión IIIa, cuya respuesta a las pruebas fue muy pobre, lo cual podría advertir un sistema inmune poco estimulado, especialmente en la RIC, que permitió un mayor desarrollo de lesiones, notablemente, este animal resultó positivo a la IDGA, siendo un animal no inmunizado. Como ya se mencionó anteriormente, la respuesta humoral a la infección se presenta en pocas ocasiones en etapas tempranas de la infección (Pérez *et al.*, 1994; Saaxegard, 1990). García-Marín *et al.*, (1999b), encontraron un alto porcentaje (89%) de animales con lesiones del tipo IIIb positivos a las pruebas de IDGA, y aunque en el trabajo presente la lesión máxima fue IIIa, siendo éste positivo a la misma prueba, pudiera indicar que la infección iba evolucionando, lo mismo que las lesiones intestinales, pues se ha observado que cuando ocurre esto, hay una disminución de los linfocitos T, mientras que la población de linfocitos B se incrementa (García-Marín *et al.*, 2000).

## **6. Cultivo Bacteriano.**

No se logró ningún aislamiento a partir de los órganos procesados de los cabritos, después de 28 y 24 semanas de cultivo, correspondiendo a los animales sacrificados a los 120 y 180 DPI.

Juste *et al.*, 1991b, encontraron que el uso del medio de Löwenstein-Jensen (LJ) con micobactina J era el más adecuado para realizar el aislamiento a partir de muestras de

caprinos y ovinos, aunque la mayoría de los investigadores han empleado diversos medios de cultivo (Bastianello y Huchzermeyer, 1994; Sigurdadóttir, 1999).

Fue comprobada la utilidad de los tubos con el medio de cultivo, pues una pequeña cantidad (200  $\mu$ l) de los inóculos que se emplearon con los grupos experimentales también fueron cultivados en ellos, obteniendo crecimiento de colonias con abundantes bacterias, 4 y 6 semanas posteriores al cultivo. De este modo, también se demostró que el inóculo empleado en el experimento continuaba viable después de la descongelación. Por otra parte, el hallazgo de lesiones compatibles con PTB sugieren que se logró la infección de los cabritos, y ya que las lesiones a los 180 DPI fueron más severas que las encontradas a los 120 días, se podría pensar que la infección inicial progresaba paulatinamente.

A pesar de no lograr el aislamiento bacteriano, no es posible descartar el crecimiento posterior, pues aunque algunos investigadores han obtenido aislamientos entre las 6 y 16 semanas, éstos han sido a partir de animales adultos que mostraban lesiones más severas e incluso signología (Domínguez, 2000; Fodstad y Gunnarson, 1979; Juste 1991b), o bien cuando son positivos a alguna prueba serológica (Sherman y Gezon, 1980)

En 1990 Saaxegard obtuvo solamente un cultivo positivo de cuatro cabritos infectados empleando el medio de Dubos agar-suero, después de 68 semanas de incubación, Sigurdadóttir *et al.*, (1999) consiguieron aislamientos de dos cabritas sacrificadas a las 24 y 37 semanas PI, pero no pudieron demostrar crecimiento antes de ese tiempo. En infección experimental de corderos, Juste *et al.*, (1994) lograron aislar bacterias en Löwenstein-Jensen desde 45 DPI, sin embargo, no reporta el tiempo que las muestras permanecieron en cultivo. Por su parte, Karpinsky y Zórawsky, (1975) obtuvieron aislamientos a partir de heces en el 50% de los corderos infectados, pero el primer resultado positivo fue en 2 animales a los 12 meses PI. Aunque el cultivo de heces no es equiparable al de órganos debido a la eliminación intermitente de bacterias, estos datos proporcionan una idea de la dificultad para el aislamiento. En bovinos Gilmour *et al.*, (1965) fueron capaces de aislar *Map* desde un mes PI, alcanzando el pico a los 3 meses, y Johnson *et al.*, (1977) aislaron en un 50% de los becerros infectados 120

DPI. Ambos trabajos podrían demostrar que las bacterias provenientes de bovinos son menos exigentes en su crecimiento. El estudio realizado por Stewart *et al.*, (1999), podría también sugerir la aseveración anterior, pues obtuvieron cultivos positivos a partir de heces en corderos, cabritos y becerros dos meses después de ser infectados con bacterias provenientes de bovino, aunque para ese trabajo se empleó el cultivo convencional y el radiométrico, no se especifica si sólo fueron detectadas las bacterias con el segundo.

El lapso tan prolongado para que se desarrollen colonias en los medios de cultivo, a partir de muestras provenientes de animales en etapa subclínica de la enfermedad, puede deberse a un período de bacteriostasis que se presenta, aunque posteriormente se iniciará un periodo de replicación (Sigurdardóttir *et al.*, 1999), tal periodo de bacteriostasis podría estar dado por la transformación de las bacterias inoculadas, a formas celulares de pared deficiente, también llamadas esferoplastos, las cuales sólo pueden ser detectadas con técnicas muy específicas, dando el resultados de muestras de tejidos ZN negativas (Hulten *et al.*, 2000).

Varios de los trabajos en los que se llevó a cabo la infección experimental, no tuvieron éxito en el aislamiento o bien este se logró muchas semanas después de cultivo, es probable que en el presente trabajo no se haya obtenido resultado positivo debido a que no fue suficiente tiempo para observar el crecimiento de colonias y por lo tanto, a pesar de que se hicieron frotis de varios tubos con medios, para evaluar si existían microcolonias, no hubiera sido fácil obtener la asada específicamente del lugar apropiado. El uso de algunas alternativas como la técnica de cultivo radiométrica, en la cual se evalúa el metabolismo bacteriano, independientemente de que puedan ser observadas las colonias (Hietela, 1992), podría evitar los problemas de no haber encontrado cultivos positivos, por ser más rápida en la detección del crecimiento bacteriano. O bien, la utilización de técnicas más avanzadas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual ha proporcionado buenos resultados tanto en tejidos como en heces (Caracappa *et al.*, 1999; Garrido *et al.*, 1999; Secott *et al.*, 1999).

También se ha determinado que para obtener aislamientos de *Map* se requiere una concentración bacteriana superior a  $10^2$  (Zaatari, 1996). Sería posible que la concentración obtenida a partir de los tejidos procesados no tuviera ese mínimo de microorganismos, ya que aunque los cabritos fueron inoculados con concentraciones muy superiores a esa, es sabido que una gran cantidad de bacterias son eliminadas en los primeros días postinfección, los cuales nunca se establecen. Asimismo, al inicio de la investigación, la carga bacteriana en el ambiente debe ser baja, pues fuera de la reinoculación por las *Map* eliminadas en los primeros días, los animales dejan de excretar bacterias aproximadamente a los 10 días, dejando de ser eliminadores, por lo cual la reinfección es muy baja en comparación con animales infectados naturalmente en un rebaño con PTB, con hembras adultas en etapas diferentes de la enfermedad, las cuales pueden estar eliminando una gran cantidad de *Map*. Finalmente, no se puede comprobar el éxito de la inoculación, pues el aislamiento bacteriano es una prueba definitiva para asegurar el establecimiento de la infección (Hietala, 1992), no obstante, como ha sido mencionado con anterioridad, en cuestión de diagnóstico, existe una posibilidad de que el fracaso se deba a una o varias de los motivos mencionados anteriormente y no necesariamente a que la infección no fue exitosa.

## BIBLIOGRAFÍA CITADA

Abbas B, Riemann H, Hird D. Diagnosis of Johne's disease (paratuberculosis) in North California cattle and note on its economic significance. *California Vet* 1983;8: 20-24. *Citado por Hutchinson 1996.*

Adams JL, Collins MT, Czuprynski CJ. Polimerase chain reaction analysis of TNF-alfa and IL-6 mRNA levels in whole blood from cattle naturally or experimentally infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Can J Vet Res* 1996; 60: 257-262.

Aduriz JJ, Juste JR, Marco JC, Sáez de Ocáriz C, García AL, Cuervo L. Diagnóstico de paratuberculosis en el SIMA: Análisis epidemiológico. ITEA, Boletín Técnico vol extra 1991; II: 653-655.

Aduriz JJ, Juste RA, Sáez de Ocáriz C. An epidemiologic study of sheep paratuberculosis in the Basque Country of Spain: Serology and productive data. *Proceedings of the fourth international Colloquium on Paratuberculosis*; 1994 July 17-21; Cambridge UK Chiodini RS Collins MT Bassey EOE editors, 1994: 19-26

Alzuherri HM, Clarke CJ, Woodall CJ, Little D. Cytokine profile changes in the intestine of ovine paratuberculosis. *Proceedings of the fourth international Colloquium on Paratuberculosis*; 1994: July 17-21; Cambridge UK. Chiodini RS Collins MT Bassey EOE editors, 1994: 209

Angus KW. Intestinal lesions resembling paratuberculosis in a wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *J Comp Path* 1990; 103: 101-105.

Badiola JJ, Vargas MA, Fernández de Luco D. Enfermedades de importancia emergente en el ganado ovino y caprino en España. ITEA, Boletín Técnico vol extra 1991; II: 631-640.

Bang B. Chronische pseudotuberkulose darmentzündung beim rinde. *Berl Tierärztl Wsch.* 1906; 42: 759-763. (*Citado por Chiodini 19984*).

Barajas JA, Bermúdez RM, Rieman H, Monge F, Gutiérrez J, Gómez RA, Arreola J. Seroepidemiología de la paratuberculosis en ganado de lidia en el estado de Tlaxcala. *Memorias del XIII Congreso Nacional de Buiatría*, 1987 México D.F. Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos A. C, 1987: 341-345

Barclay R, Ratledge C. Iron-binding compounds of *Mycobacterium avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum* and micobactin-dependent *M. paratuberculosis* and *M. avium*. *J Bacteriol* 1983; 153: 1138-1146.

Bassey EOE, Collins MT, Czuprynski CJ. Contribution of T cell subsets to the immune response to *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in normal and infected cattle. *Proceedings of the Fifth International Colloquium on Paratuberculosis*; 1996 September 29- October 4, Madison, USA. Hines ME, Collins MT editors, 1996: 43-47

Bastianello SS Huchzermeyer HF. Pathological, bacteriological and serological findings in 100 ewes and their fetuses from a paratuberculosis sheep flock in South Africa. *Proceedings of the Fifth International Colloquium on Paratuberculosis*; 1996 September 29- October 4; Madison, USA. Hines ME, Collins MT editors, 1996: 83-90.

Bauerfeind R, Benazzi, Weiss R, Schliesser T, Willems H, Baljer G. Molecular characterization of *Mycobacterium paratuberculosis* isolates from sheep, goats, cattle by hybridization with a DNA probe to insertion element IS900. J.Clin.Microb. 1996; 34: 1617-1621.

Beard PM, Henderson D, Daniels MJ, Pirie A, Buxton D, Greig A, Hutchings MR, McKendrick I, Rhind S, Stevenson K, Sharp JM. Evidence of paratuberculosis in fox (*Vulpes vulpes*) and stoat (*Mustela erminea*). Vet Rec 1999; 145: 612-613.

Bendixen PH, Bloch B, Jørgensen B. Lack of intracellular degradation of *Mycobacterium paratuberculosis* by bovine macrophages infected *in vitro*: light microscopic and electron microscopic observations. Am J Vet Res 1981; 42: 109-113.

Bendixen PH. Immunological reactions caused by infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. Nord Vet Med 1978; 30: 163-168.

Benedictus G, Dijkhuizen AA, Stelwagen J. Economic losses due to paratuberculosis in dairy cattle. Vet Rec 1987; 121: 142-146.

Bercovier H. Molecular basis of pathogenicity in mycobacterial infections. Proceedings of the Fifth International Colloquium on Paratuberculosis; 1996 September 29- October 4; Madison, USA: Hines ME, Collins MT editors, 1996: 5-29.

Bernardelli A, Torres P. Bovine paratuberculosis and tuberculosis in a field study. Proceedings of the sixth International Colloquium on Paratuberculosis; 1999 February 14-18; Melbourne, Australia: Manning EJB, Collins MT editors 1999: 252.

Billman-Jacob H, Carrigan M, Cockram F, Corner LA, Gill JJ, Hill JF, Jessep T, Milner AR, Wood PR. A comparison of the interferon gamma assay with the absorbed ELISA for the diagnosis of Johne's disease in cattle. Aust Vet J 1992; 69: 25-28.

Brees DJ, Reimer SB, Cheville F, Florence A, Thoen CO. Immunohistochemical detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in formalin-fixed, paraffin embedded bovine tissue sections. J Vet Diagn Invest 2000; 12: 60-63.

Brennan PJ, Nikaido H. The envelope of mycobacteria. Ann Rev Biochem 1995; 64:29-63. (Citado por Bercovier 1996).

Buergelt CD, Hall CE, Merkal RS, Whitlock RH, Duncan JR. Lymphocyte transformation: an aid in the diagnosis of paratuberculosis. Am J Vet Res 1977; 38: 1709-1715.

Buergelt CD, De Lisle G, Hall CE, Merkal RS, Duncan JR. In vitro lymphocyte transformation as a herd survey method for bovine paratuberculosis. Am J Vet Res 1978; 39: 591-595.

Buergelt CD, Duncan JR. Age and milk production data of cattle culled from a dairy herd with paratuberculosis. JAVMA 1978; 173: 478-480.

Buergelt CD, Pontzer CH, Williams E. Phagocytic and killing capacity of bovine bone marrow-derived macrophages infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. Proceedings of the fourth international Colloquium on Paratuberculosis; 1996 September 29- October 4; Madison, USA: Hines ME, Collins MT editors, 1996: 155-160.

Burnsaide DM, Rowly BO. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of paratuberculosis in goats. *Am J Vet Res* 1994; 55: 465-466.

Bustamante J. Detección de anticuerpos a *Mycobacterium paratuberculosis* por medio de la prueba de fijación de complemento (tesis de Licenciatura) México D.F., México: UNAM, 1974.

Camphausen RT, Jones R, Brennan PJ, Kito J. *Mycobacterium paratuberculosis* glycolipid antigens: identification and diagnostic applications. 28 Annual Proceedings; 1965; Amer Assn Veterinary Laboratory Diagnosticians, 1965:

Caracappa S, Lillini E, Reale S, Vitale F, Borghese A, Fagiolo A. Comparison between PCR and standard test for *M avium* subsp *paratuberculosis* infection diagnosis in different animal species in a farm. Proceedings of the sixth International Colloquium on Paratuberculosis; 1999 February 14-18. Melbourn, Australia: Manning EJB, Collins MT editors 1999:476-483.

Clarke CJ, Burrels C, Little D, Colston A, Kay J, Sharo JM. Local and systemic cellular and humoral immune response and cytokine changes in ovine paratuberculosis. Proceedings of the Fifth International Colloquium on Paratuberculosis; 1996 September 29- October 4; Madison, USA: Hines ME, Collins MT editors, 1996: 64.

Clarke CJ, Colston A, Little D, Kay J, Alzuherri HM, Sharp JM, Burrels C. The immune response in paratuberculosis infection of small ruminants. *Vet.Immunol.Immunopath.* 1996b; 54,321.

Clarke CJ, Little D. Histopathological and morphometric changes in the intestine in the ovine paratuberculosis. Proceedings of the fourth international Colloquium on Paratuberculosis; 1994 July 17-21, Cambridge UK: Chiodini RS Collins MT Bassey EOE editors, 1994:202-208

Clarke CJ, Patterson IAP, Armstrong KE, Low JC. Comparison of the absorbed ELISA and agar gel immunodiffusion test with clinicopathological findings in ovine clinical paratuberculosis. *Vet Rec* 1996; 139: 618-621. (c)

Clarke CJ. Paratuberculosis and molecular biology. *Vet J* 1997; 153: 245-247. (b)

Clarke CJ. The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminant and other species. *J Comp Path* 1997; 116, 217-261. (a)

Clemens DL, Horwitz MA. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. *J Exp Med* 1995; 181: 257-270.

Collins DM, Gabric DM, Lisle GW. Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. *J Clin Microb* 1990; 28: 1591-1596.

Collins MT, Lisby G, Moser C, Chicks D, Christensen S, Reichel Derfer M, Høiby N, Harms BA, Thomsen OØ, Skibsted U, Binder V. Results of multiple diagnostic test of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in patients with inflammatory bowel disease and in controls. *J Clin Microb* 2000; 38: 4373-4381.

Collins MT. Clinical approach to control of bovine paratuberculosis. *JAVMA* 1994; 204: 208-210

Collins MT. Diagnosis of paratuberculosis. *Vet Clin North Am* 1996 12: 357-372.

Collins MT. Selling Jonhe's disease control as a preventive medicine program. 7<sup>th</sup> Annual School of Veterinary Medicine Postgraduate Conference; 1991 June 14-15: University of Wisconsin, 1961.

Collins P, Davis DC, Mathews RJ. Mycobacterial infection in goats: diagnosis and pathogenicity of the organism. *Br Vet J* 1984; 140: 196-201.

Cooper M, Robert AD, Rhoades ER, Callahan JE, Getzy DM, Orme MI. The role of interleukin-12 in acquired immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunol* 1995; 84: 423-432.

Corpa JM, Pérez V, García Marín JF. Differences in the immune response in lambs and kids vaccinated against paratuberculosis, according to the age of vaccination. Proceedings of the sixth International Colloquium on Paratuberculosis; 1999 February 14-18. Melbourne, Australia: Manning EJB, Collins MT editors 1999: 225-233

Cranwell MP. Control of Johne's disease in a flock of sheep by vaccination. *Vet Rec* 1993; 133: 219-220.

Chávez GG, García-Marín JF, Adúriz G, Moreno B, Gutiérrez M, Badiola JJ. Preliminary results of the comparative study of early response to *M avium* and *M. paratuberculosis* in experimentally infected lambs. *Med Vet* 1992; 9: 16-18.

Chávez GG, García-Marín JF, Adúriz G, Moreno B, Gutiérrez M, Juste JR, Badiola JJ. Comparación de la respuesta inmune humoral y celular en ovinos inoculados experimentalmente con *M avium sylvaticum* y *M paratuberculosis*. *Boletín Técnico vol extra ITEA* 1993; 13: 504-506

Chávez GG. Estudio comparativo de las lesiones y de la respuesta inmunológica observada en corderos infectados experimentalmente con *Mycobacterium paratuberculosis* y *Mycobacterium avium* subsp *sylvaticum*. (tesis doctoral). Zaragoza, España: Universidad de Zaragoza, 1993.

Chiodini RJ. Abolish *Mycobacterium paratuberculosis* Starin 18. Letters to the editor. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1956-1958.

Chiodini RJ. Biochemical characterization of various starins of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am J Vet Res* 1986b; 47: 1442-1445.

Chiodini RJ, Rossitier CA. Immunology: Resistance to paratuberculosis *Vet Clin North Am*. 1996a; 12: 313-344.

Chiodini RJ, Rossitier CA. Paratuberculosis: A potential zoonosis?. *Vet Clin North Am* 1996b; 12: 457-468.

Chiodini RJ, Van Kruiningen HJ, Merkal RS. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease) the current status and future prospects. *Cornell Vet* 1984a; 74: 218-269.

Chiodini RJ, Van Kruiningen HJ, Merkal RS, Thayer WR, Coutu JA. Spheroplastic phase of *Mycobacteria* isolated from patients with Crohn's disease. *J Clin Microb* 1986a; 24: 357-363.

Chiodini RJ, Van Kruningen HJ, Thayer WR, Coutu JA. Characteristics of an unclassified *Mycobacterium* species isolated from patients with Crohn's disease. *J Clin Microb* 1984b; 20: 966-971.

Chiodini RJ, Van Kruningen HJ. Characterization of *Mycobacterium paratuberculosis* of bovine, caprine and ovine origin by gas-liquid chromatography analysis of fatty acid in whole-cell extracts. *Am J Vet Res* 1985; 46: 1980-1989.

Davies DH, Corbeil D, Ward, Duncan JR. A humoral suppressor of in vitro lymphocyte response in cattle with Johne's disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 1974; 145: 1372-1377. *Citado por Bendixen 1978.*

De Lisle GW, Milestone BA. The economic impact of Johne's disease in New Zealand. In *Johne's disease* CISRO 1989 East Melbourne Australia: Milner A, Wood P editors, 1989: 41-45. *Citado por Hutchinson 1996.*

De Lisle GW. Debate: Paratuberculosis control vaccination vs eradication by on farm control and test-and-slaughter (Pro-vaccination). *Proceedings of the Fifth International Colloquium on Paratuberculosis*; 1996 September 29- October 4 Madison, USA: Hines ME, Collins MT editors, 1996: 213-218

Djønne B, Holstad Ø, Kolbjørnsen, Nyberg O, Schönheit J, Thraldsen J, Ødeggard Ø. Is paratuberculosis in goats a source of infection to cattle? Some preliminary results from a national surveillance program in Norway. *Proceedings of the sixth International Colloquium on Paratuberculosis*; 1999 February 14-18. Melbourn, Australia: Manning EJB, Collins MT editors 1999: 253.

Domínguez PMC. 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). México D.F, México: UNAM, 2000.

Doyle TM, Spears HN. A Johne's disease survey. *Vet Rec* 1951; 63: 355-359.

Doyle TM. Susceptibility to Johne's disease in relation to age. *Vet Rec* 1953; 65: 363-365.

Doyle TM. Vaccination against Johne's disease. *Vet Rec* 1964; 76: 73-76.

Dunkin GW. A diagnostic agent for the detection of Johne's disease and its method of preparation. *J Comp Path* 1928; 41: 94-108. *Citado por Bendixen 1978.*

Eamens G. Diagnostic approaches to paratuberculosis *Proceedings of the Fifth International Colloquium on Paratuberculosis*; 1996 September 29 - October 4, Madison, USA: Hines ME, Collins MT editors, 1996: 227-231.

Edwards D, Kirkpatrick CH. The immunology of Mycobacterial Disease. *Am Rev Respir Dis* 1986; 134: 1062-1071.

Ellner JJ, Wallis RS. Immunologic aspects of Mycobacterial infections. *Reviews of Infection Diseases* 1989; 11: S455-S459.

Elsaghier A, Prantera C, Moreno C, Ivany J. Antibodies to *Mycobacterium paratuberculosis*-specific protein antigens in Crohn's disease. Clin Exp Immunol 1992; 90: 503-508.

Elsken LA, Nonnecke BJ. In vitro transformation of lymphocytes from blood and milk of cows with subclinical paratuberculosis. Am J Vet Res 1986; 47: 1513-1516.

Elsken, LA Lewis-Hintz AM, Whipple DL. The pathogenesis, diagnosis and control of paratuberculosis (Johne's disease) in goats. 28<sup>th</sup> Annual Proceedings 1965; Amer Assn Veterinary Laboratory Diagnosticians, 1965: 121-130.

Faldyn M, Toman M, Pavlik I. Leukocyte counts and lymphocyte subpopulations in the peripheral blood of pygmy goats from herd infected with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. Vet Med Czech 1999; 44: 259-262.

Ferhel C, Chastellier C, Lang T, Rastogi N. Evidence of inhibition of fusion of lysosomal and prelysosomal compartments with phagosomes in macrophages infected with pathogenic *Mycobacterium avium*. Inf Imm 1996; 52: 252-262.

Fodsstad FH, Gunnarson E. Post-mortem examination in the diagnosis of Johne's disease in goats. Acta vet scand 1979; 20: 157-167.

Follows GA, Munk ME, Gatrill AJ, Conradt P, Kaufmann SHE. Gamma Interferon and Interleukin 2, but not Interleukin 4, are detectable in  $\gamma/\delta$  T-Cell cultures after activation with bacteria. Inf Immun 1992; 60: 1229-1231.

Francis J. Infection of laboratory animals with *Mycobacterium johnei*. J Comp Path 1943; 53: 140-150.

García-Marín JF, Benazzi S, Pérez V, Badiola JJ. Study of the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* in the lamb's intestinal mucosa using immunohistochemical methods for antigen detection. Proceedings of the third International Colloquium on Paratuberculosis; 1992 Providence USA: Chiodini RJ, Kreeger JM editors. 1992: 379-377.

García-Marín JF, Chavez GG, Pérez PV, Aduriz JJ. Estudio de lesiones intestinales en caprinos procedentes de rebaños afectados de paratuberculosis y comparación de métodos de diagnóstico. Boletín Técnico vol extra 1991: ITEA, 1991: II: 650-652.

García-Marín JF, Pérez PV, García de Jalón JA, De las Heras M, Barberán M, Fernández de Luco D, Badiola JJ. Diagnóstico de casos clínicos de paratuberculosis ovina y caprina. Med Vet 1994; 11:9.

García-Marín JF, Pérez PV, González J. La interacción bovino-bacteria y los mecanismos de enfermedad. En Juste JRA editor. Paratuberculosis. Bovis Luzan 2000; 93: 29-38.

García-Marín JF, Tellechea J, Corpa JM, Gutiérrez M, Pérez V. Relation between ovine paratuberculosis lesions and cellular and humoral immune response in diagnostic tests. Proceedings of the sixth International Colloquium on Paratuberculosis; 1999a February 14-18. Melbourne, Australia: Manning EJB, Collins MT editores 1999: 593-599. (a)

García Marín JF Tellechea J Gutiérrez M Corpo JM Pérez V. Evaluation of two vaccines (killed and attenuated) against small ruminant paratuberculosis. Proceedings of the sixth International Colloquium on Paratuberculosis; 1999b February 14-18. Melbourn, Australia: Manning EJB, Collins MT editores 1999: 234-241. (b)

García-Marín FF, Tellechea J, Gutiérrez M, Pérez V, Juste RA. Paratuberculosis vaccination in sheep modifies and limits the development of lesions. Proceedings of the Fifth International Colloquium on Paratuberculosis; 1996 September 29 - October 4; Madison, USA: Chiodini RJ, Hines ME, Collins MT editors, 1996: 296-298.

Garibay VM. Prueba doble comparativa intradérmica a la tuberculina aviaria y mamífera para identificación de reactores a *Mycobacterium paratuberculosis* en un hato de ovinos. (tesis de licenciatura). México D.F., México: UNAM, 1974.

Garrido JM, Cortabarría N, Aduriz G, Juste RA. Use of a PCR method on fecal samples for diagnosis of sheep paratuberculosis. Proceedings of the sixth International Colloquium on Paratuberculosis; 1999 February 14-18. Melbourn, Australia: Manning EJB, Collins MT editores 1999: 407-413.

Gezon HM, Bither HD, Gibbs HC, Acher EJ, Hanson LA, Thompson JK, Jørgensen RD. Identification and control of paratuberculosis in a large goat herd. Am J. Vet Res 1988; 49: 1817-1822.

Gilmour NJL, Niesbet DI, Brotherstone JG. Experimental oral infection of calves with *Mycobacterium Johnei*. J. Comp Path 1965; 75: 281-286.

Gunnarsson E, Fodstad F. Analysis of antigens in *Mycobacterium paratuberculosis*. Acta vet scand 1979; 20: 200-215

Goudswaard J, Terporten-Pastors WWM. Johne's Disease in goat; comparison of serological tests. Neth J vet Sci 1972; 4: 993-1112.

Grant IR, Ball HJ, Rowe MT. High temperature, short time (HTST) pasteurization of milk containing low levels of *Mycobacterium paratuberculosis*. Proceedings of the Fifth International Colloquium on Paratuberculosis; 1996 September 29 - October 4, Madison, USA: Hines ME, Collins MT editors, 1996: 333-338.

Grieg A, Stevenson K, Pérez V, Pirie AA, Grant JM, Sharp JM. Paratuberculosis in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). Proceedings of the Fifth International Colloquium on Paratuberculosis; 1996 September 29 - October 4, Madison, USA: Hines ME, Collins MT editors, 1996: 190-195.

Gwózdź JM, Manktelow BW, Murray A, West DM, Thompson KG. Vaccination against paratuberculosis of lambs already infected experimentally with *Mycobacterium paratuberculosis*. Proceedings of the sixth International Colloquium on Paratuberculosis; 1999 February 14-18. Melbourn, Australia: Manning EJB, Collins MT editores 1999: 630-634.

Gwózdź JM, Reichel MP, Murray A, Manktelow W, West DM, Thompson KG. Detection of *Mycobacterium avium* subsp paratuberculosis in ovine tissues and blood by the polymerase chain reaction. Vet Microb 1997; 51:233-244.

- Hagan WA, Zeissig A. Age as a factor in susceptibility to Johne's disease. JAVMA 1935; 87:34-40.
- Harding HP. The histopathology of *Mycobacterium johnei* infection in small laboratory animals. J Path Bact 1959; 78:157-169.
- Hietela SK. The options in diagnosing ruminant paratuberculosis. Vet Med 1992; November: 1122-1139.
- Hilbink F, West DM, de Lisle G, Kittelberger R, Hosie BD, Hutton J, Cooke MM, Penrose M. Comparison of a complement fixation test, a gel diffusion and two absorbed ELISAs for the diagnosis of paratuberculosis in sheep. Vet Microb 1994; 41: 107-116.
- Hirsch A. Infection of hamsters and rabbits with *Mycobacterium johnei*. J Com Path 1956; 66: 260-269.
- Hole NH. Johne's Disease. Adv Vet Sci 1958; 4: 341-387.
- Hubbard RD, Collins FM. Immunomodulation of mouse macrophage killing of *Mycobacterium avium* in vitro. Infection and immunity 1991; 59: 570-574.
- Hulten K, Karttunen TJ, El-Zimaity HMT, Naser SA, Collins MT, Graham DY, El-Zaatari FAK. Identification of cell wall deficient forms of *M avium* subsp *paratuberculosis* in paraffin embedded tissues from animals with Johne's disease by *in situ* hybridization. J Microb Method. 2000; 1:1-11.
- Hutchinson LJ. Economic impact of paratuberculosis. Vet Clin North Am. 1996; 12: 373-382.
- Hutchinson LJ. Review of estimated economic impact and control of Johne's disease in cattle. Agri-Parctice 1988; 9: 7-8.
- Huttema H. Johne's disease in cattle and vaccination. Bull Off Int Epiz 1967; 68:1-7. J
- Jark U, Franz B, Gerlach GF. Development of an ELISA technique for the detection of subclinical paratuberculosis in cattle. Proceedings of the Fifth International Colloquium on Paratuberculosis; 1996 September 29- October 4, Madison, USA: Hines ME, Collins MT editors, 1996: 254-261.
- Johne HA, Frottingham L. Ein eigenthuemlicher fall von tuberkulose beim rind. Dtsch Ztschr. Tiermend Path 1895; 21:438-454. (Citado por Chiodini 1984).
- Johnson DW, Muscoplat CC, Larsen AB, Thoen O. Skin testing, fecal culture and lymphocyte immunostimulation in cattle inoculated with *Mycobacterium paratuberculosis*. Am J Vet Res 1977; 38:2023-2015.
- Jørgensen JB. Paratuberculosis in pigs. Experimental infection by oral administration of *Mycobacterium paratuberculosis*. Acta vet scand 1969; 10:275-287.
- Juste JRA, Badiola JJ, Arnal MC, Balaguer L, García-Marín JF, Sáez de Ocáriz C, Marco JC. The Paratuberculosis Newsletter 1991; 3: 3-4.

Juste RA, Casal J. An economic and epidemiologic simulation of different control strategies for ovine paratuberculosis. *Prev Vet Med* 1993; 15: 101-115.

Juste RA, García-Marín JF, Peris B, Sáez de Ocáriz C, Badiola JJ. Experimental infection of Vaccinated and non-vaccinated lambs with *Mycobacterium paratuberculosis*. *J Comp Pathol* 1994; 110 :185-194.

Juste RA, Garrido JM, Aduriz G. El agente causal de la paratuberculosis y su situación taxonómica. En Juste JRA editor. *Paratuberculosis. Bovis Luzan* 2000; 93: 13-28. (a)

Juste RA, Garrido JM, Aduriz G. Un siglo de progreso y controversia sobre la paratuberculosis: I La situación actual del conocimiento sobre la infección. *Med Vet* 2000; 17:88. (c)

Juste RA, Marco JC, Sáez de Ocáriz C, Adúriz JJ. Comparison of different media for isolation of small ruminant strains of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet Microb* 1991; 28: 385-390.

Juste RA, Portu J, Aldamiz M, Sáez de Ocáriz C, Chiodini R. Seroreactivity of Crohn's disease patients to mycobacterial antigens: original data and analytical review of the literature. *The paratuberculosis Newsletter* 2000; 12:14-22. (b)

Kalis CHJ, Hesselink JW, Barkema HW. Long-term use of a killed vaccine does not prevent fecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Proceedings of the sixth International Colloquium on Paratuberculosis; 1999 February 14-18. Melbourn, Australia: Manning EJB, Collins MT editores* 1999: 153-156.

Karpinsky T, Zórawsky. Experimental paratuberculosis of sheep. I Clinical, allergic bacteriological and post mortem examinations. *Bull vet Inst Pulway* 1975; 19: 59-63.

Kauffman SHE. CD8+ T lymphocytes in intracellular microbial infections. *Immunol Today* 1988; 9:168-174. *Citado por Munk* 1990.

Kauffman SHE. Immunity to intracellular microbial pathogens. *Immunol Today* 1996; 16: 338-342

Kreeger JM. Ruminant paratuberculosis a century of progress and frustration. *J Vet Diagn Invest.* 1991; 3: 273-283.

Kunze ZM, Wall S, Appelberg R, Silva MT, Portaels F, Mc Fadden JJ. IS900, a new member of a wide spread class of atypical insertion sequences, is associated with pathogenicity of *M avium*. *Mol Microbiol* 1991; 5:2265-2272.

Larsen AB, Moyle AI, Himes EM. Experimental vaccination of cattle against paratuberculosis (Jonhe's disease) with killed bacterial vaccines: a controlled field study. *Am J Vet Res* 1978; 39: 65-69.

Larsen AB, Merkal RS, Vardman TH. Survival time of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am J Vet Res.* 1956; 549-551

Larsen AB, Moon HW, Merkal RS. Susceptibility of swine to *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am J Vet Res* 1971; 32: 589-595.

Larsen AB, Hawkins, WW, Merkal RS. Experimental vaccination of sheep against Johne's disease. *Am J Vet Res* 1964; 25: 974-976.

Larsen AB. Vaccination against Johne's disease. Proceedings of American Veterinary Medical Association. 87<sup>th</sup> Annual Meeting; 1960 August 21-24. 1950: 201-206.

Larsen HJ. Distribution of T and B lymphocytes in jejunal and ileocecal Peyer's patches of lambs. *Res Vet Sci* 1986; 40:105-111.

Larsen HJS, Storset AK, Hasvold H, Knagenhjelm SKH, Berntsen G, Brun-Hansen H, Holstad G. Immune response of goats experimentally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*. Proceedings of the sixth International Colloquium on Paratuberculosis; 1999 February 14-18. Melbourne, Australia: Manning EJB, Collins MT editors 1999: 674.

Little D, Alzuherri HM, Clarke CJ. Phenotypic characterisation of intestinal lymphocytes in ovine paratuberculosis by immunohistochemistry. *Vet Immunol Immunopath* 1996; 55: 175-187.

López CA, Perales FA, Sánchez-Prieto BM, Franco CFJ, Puentes CE. Vaccination of cattle against paratuberculosis with an inactivated vaccine. A controlled field study in an infected herd. Proceedings of the sixth International Colloquium on Paratuberculosis; 1999 February 14-18. Melbourne, Australia: Manning EJB, Collins MT editors, 1999: 219-224.

Mackenzie DWR, Philpot CM. Counterimmunoelectrophoresis as a routine mycoserological procedure. *Mycopathologia* 1975; 57:1-7.

Mainar-Jaime RC, Vázquez-Boland JA. Factors associated with seroprevalence to *Mycobacterium paratuberculosis* in small ruminant farms in the Madrid region (Spain). *Prev Vet Med* 1998; 34:17-327.

Marshall DJ, Keams C, Whittington RJ, Eamens GJ, Manchester PE. Performance of an absorbed ELISA in the detection of Johne's disease in sheep flocks in New South Wales, Australia. Proceedings of the sixth International Colloquium on Paratuberculosis; 1999 February 14-18. Melbourne, Australia: Manning EJB, Collins MT editors, 1999: 502.

Marshall DJ, Fraser CA, Seaman JT, Moloney BJ, Bailey GD. Importance of sample site in histological diagnosis of Johne's disease in sheep. Proceedings of the sixth International Colloquium on Paratuberculosis; 1999 February 14-18. Melbourne, Australia: Manning EJB, Collins MT editors, 1999: 511.

Mateo A, Garrido JJ, Llanes D, Pintado CO, Garrido JM, Juste RA. Characterization of lymphocyte subpopulations in paratuberculosis vaccinated and non-vaccinated sheep. Proceedings of the Fifth International Colloquium on Paratuberculosis; 1996 September 29-October 4, Madison, USA: Hines ME, Collins MT editors, 1996: 55-62.

Merkal RS, Curran BJ. Growth and metabolic characteristics of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Appl Microb* 1974; 28: 276-279.

Merkal RS, Larsen AB, Kopecky KE, Kluge JP, Monlux WS, Lehmann RP, Quinn LY. Experimental paratuberculosis in sheep after oral, intratracheal or intravenous inoculation: serologic and intradermal test. *Am J Vet Res* 1968; 29: 963-969.

Merkal RS, Larsen AB Bopth GD. Analysis of the effects of inapparent bovine paratuberculosis. Am J Vet Res 1975; 36:837-838.

Mokresh AH, Buttler DG. Granulomatous enteritis following oral inoculation of newborn rabbits with *Mycobacterium paratuberculosis* of bovine origin. Can J Vet Res 1990; 54:313-319.

Molina A, Crespo M, Morera L, Llanes D. Paratuberculosis in goats. Serological diagnosis by ELISA test. The paratuberculosis Newsletter. 1990; 2: 11-14.

Molina A, Madueno R, Fernández J, Llanes D. Incidence of serological positivity in goat paratuberculosis in southern Spain by ELISA. The paratuberculosis Newslette 1989: 4-5

Molina JM, Anguiano A, Ferrer O. Study on immune response of goats vaccinated with a live strain of *Mycobacterium paratuberculosis*. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 1996; 19: 9-15.

Momotani E, Whipple E, Thiermann A, Cheville N. Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches in calves. Vet Pathol 1996; 25: 131-137.

Momotani E, Whipple DL Thiermann AB. The distribution of ferritin, lactoferrin and transferrin in granulomatous lymphadenitis of bovine paratuberculosis. J Comp Path 1988; 99: 205-214.

Moreira AR, Spath EJA, Morsella C. Seroprevalence of Johne's disease in eleven districts of Buenos Aires, Argentina. Proceedongs of the fourth international Colloquium on Paratuberculosis; 1994 July 17-21, Cambridge UK: Chiodini RS Collins MT Bassey EOE editors. 1994: 33-34.

Munk ME, Gatril AJ, Schoel B, Gulle H, Pfeffer K, Wagner H, Kauffman SHE. Immunity to mycobacteria: possible role of alpha/beta and gamma/delta T lymphocytes. APMIS 1990; 98: 669-673.

Nakamatsu M y Fijimoto Y, Satoh H. The pathology study of paratuberculosis in goats, centred around the formation of remote lesions. Jap J Vet Res 1968; 16:103-135.

Nathan CF. Secretory product of macrophages. J clin Invest 1987; 79:319-326.

Navarro JA, Ramis G, Seva J, Pallarés FJ, Sánchez J. Changes in lymphocytes subsets in the intestine and mesenteric lymph nodes in caprine paratuberculosis. J Comp Pathol 1998; 118: 119-121.

Nisbet DI, Gilmour JL, Brotherston JG. Quantitative studies of *Mycobacterium johnei* in tissues of sheep. J Comp Path 1962; 72: 80-92.

Nordlund KV Goodger WJ Pelletier J Collins MT. Association between subclinical paratuberculosis and milk production, milk components and somatic cell counts in Wisconsin dairy herds. Proceedings of the Fifth International Colloquium on Paratuberculosis; 1996 September 29- October 4; Madison, USA. Chiodini RJ, Hines ME, Collins MT editors, 1996:296-298.

Oviedo FGT. Ensayo de una bacterina oral de *Mycobacterium paratuberculosis* en un rebaño ovino infectado naturalmente. Tesis de Maestría. Facultad de Estudios Superiores Cuaututlán. UNAM. Edomex. 1991.

Paliwal OP Rajya BS Krishna SG. Comparative evolution of diagnostic test for paratuberculosis in goats. *Indian J Anim Sci* 1984; 54: 657-659.

Pavlik I Horvathova A Fischer O. Bart J Dvorska I Matlova I, Maine R. Impact of contaminated environment, low vertebrates and invertebrates by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* on the spread of the disease in ruminant herds with different prevalences. Proceedings of the sixth International Colloquium on Paratuberculosis; 1999 February 14-18. Melbourne, Australia: Manning EJB, Collins MT editores 1999: 508. (a)

Pavlik I, Vesely T, Barty J, Horvathova A, Matlova L, Vrabs V, Valent L, Miskovic P, Hirko M. Reliability of diagnostic methods (clinical examination, fecal culture, skin and serological test) for paratuberculosis of cattle and sheep during the 1988-1998 eradication and control programme. Proceedings of the sixth International Colloquium on Paratuberculosis; 1999 February 14-18. Melbourne, Australia: Manning EJB, Collins MT editores 1999: 371-381. (b)

Payne JM, Rankin JD. The pathogenesis of experimental Johne's disease in calves. *Res vet Sci* 1961; 2:167-174.

Pérez PV, Badiola JJ, García-Marín JF. Evaluación de técnicas diagnósticas de la paratuberculosis ovina y su relación con el tipo de lesiones. *Boletín Técnico ITEA vol extra* 1993; 13: 510-512. (a)

Pérez PV, Benazi S, García-Marín JF. Causa de desecho en ganado ovino. *Boletín Técnico ITEA vol extra* 1991; II: 665-667.

Pérez V, Corpa JM, García-Marín JF. Pathology observed in natural cases of paratuberculosis in goats. Proceedings of the sixth International Colloquium on Paratuberculosis; 1999 February 14-18. Melbourne, Australia: Manning EJB, Collins MT editores 1999: 484-493.

Pérez V, Corpa JM, García-Marín JF. El cuadro clínico y lesiones de la paratuberculosis bovina. En Juste JRA editor. *Paratuberculosis. Bovis Luzan* 2000; 93: 39-47. (a)

Pérez V, Chávez G, Gutiérrez M, Tellechea J, Badiola JJ, García Marín JF. Evaluation of the AGID and  $\gamma$ -interferon test in lambs infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Proceedings of the fourth International Colloquium on Paratuberculosis; . 1994 July 17-21, Cambridge UK: Chiodini RS, Collins EOE editors, 1999: 91-96.

Pérez V, García Marín JF, Badiola JJ. Description and classification of different types of lesion associated with natural paratuberculosis infection in sheep. *J Comp Path* 1996; 114: 107-122.

Praxedis MJ. Determinación de la prevalencia de paratuberculosis en caprinos y ovinos sacrificados en cuatro rastros periféricos al D.F. (tesis de licenciatura). Estado de México, México: UNAM, 1985.

Quesada F. Diagnóstico inmunológico de la tuberculosis. *Salud Pública México* 1983; 25:601-611.

Rajya BS, Singh CM. Studies on the pathology of Johne's disease in sheep. III. Pathological changes in sheep with naturally occurring infections. *Am J Vet Res* 1961; March: 189-202.

Ralph W. *Rural Res* 1989; 144: 1-9.

Ramírez C, Tenorio V, Valero G, Ramírez G, Trigo E, Merkal R. Presencia de anticuerpos contra *Mycobacterium paratuberculosis* en ovinos y caprinos. *Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México 1982* México DF, SAGAR, 1982: 177-181.

Ramírez C, Trigo E, Suárez F, Merkal R. Aislamiento e identificación de *Mycobacterium paratuberculosis* en México. *Tec Pec Mex* 1979; 36:74-76.

Rankin JD. The experimental infection of cattle with *Mycobacterium johnei*. I,II,III,IV. *J Comp Path* 1958; 68:331-337. 1961; 71:6-15 y 72:113-117. (Citados por Chiodini 1984).

Rathnamohan TN, Spencer TL. A technique for the purification of *Mycobacterium paratuberculosis* from the ileal mucosa of infected cattle. *Aus Vet J* 1986; 63:133-134.

Riemann HP, Abbas B. Diagnosis and control of bovine paratuberculosis (Johne's Disease). *Adv Vet Sci Comp Med* 1983; 27: 481-506.

Richards WD, Thoen CO. Effect of freezing on the viability of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine feces. *J Clin Microbiol* 1977; 6:392-395. (Citado por Chiodini 1984).

Rossitier CA, Burhans WS. Farm-specific approach to paratuberculosis (Johne's disease) control. *Vet Clin North Am* 1996; 12: 383-416.

Rubin JL, Whitlock RH, Habecker PL, Reilly LK, Freeman WA. Hepatic encephalopathy associated with paratuberculosis in a goat. *JAVMA* 1999; 215: 236-238.

Sánchez-Vizcaino, Cambra. Técnicas inmunoenzimáticas ELISA en patología animal y vegetal. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias OIE, 2º serie técnica 1987: 7.

Sanderson JD, Moss MT, Tizard MVC, Hermon-Taylor J. *Mycobacterium paratuberculosis* DNA in Crohn's disease tissue. *Gut* 1992; 33:890-896.

Saxegaard F, Fodstad, FH. Control of paratuberculosis (Johne's disease) in goats by vaccination. *Vet Rec* 1985; 116: 39-441.

Saxegaard F. Experimental infection of calves with an apparently specific goat-pathogenic strain of *Mycobacterium paratuberculosis*. *J Comp Path* 1990; 102: 149-156.

Saxegaard F. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from intestinal mucosa and mesenteric lymph nodes of goats by use of selective Dubos medium. *J Clin Microb* 1985; 2: 312-313

Secott TE, Ohme AM, Barton KS, Rommel FA. *Mycobacterium paratuberculosis* detection in bovine feces is improved by coupling agar culture enrichment to an IS900 specific polymerase chain reaction assay. *J Vet Diagn Invest* 1999; 11: 441-447.

Shaik van G, Kalis CHJ, Benedictus G, Dijkhuizen AA, Huime RBm. Cost-benefit analysis of vaccination against paratuberculosis in dairy cattle. *Vet Rec* 1996; 139:624-627.

Sharp JM Epidemiology and control of paratuberculosis. Proceedings of the Fifth International Colloquium on Paratuberculosis; 1996 September 29- October 4; Madison, USA: Hines ME, Collins MT editors, 1996: 119-120

Sherman DM Gezon HM. Comparison of agar gel immunodiffusion and fecal culture for identification of goats with paratuberculosis. *JAVMA* 1980; 177:1208-1211.

Shome R, Krishnappa G, Shome B. Studies on cross-reactions among *Mycobacterium paratuberculosis*, *Mycobacterium phlei*, and *Corynebacterium renale* by Agar Gel Immunodiffusion test and counter Immunoelectrophoresis. *Indian J Anim Hlth.* 1996; 35:129-131.

Sigurdadóttir ÓG, Press CMcL, Saxegaard F, Evensen Ø. Bacterial isolation, immunological response and histopathological lesions during the early subclinical phase of experimental infection of goat kids with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Path* 1999; 36:542-550.

Sigurdsson B, Tryggvadóttir AG. Immunization with heat-killed *Mycobacterium paratuberculosis* in mineal oil. *J Bact* 1950; 59: 541-544.

Sigurdsson B. Killed vaccine against paratuberculosis. *Am J Vet Res* 1960; 21:45-67.

Silva CL Faccioli LH. Tumor necrosis factor (Cachectin) mediates induction of cachexia by cord factor from *Mycobacteria*. *Infection and Immunity* 1988; 50:3067-3071.

Smith K. Electron microscopic observations on *Mycobacterium johnei*. *Res Vet Sci* 1969; 10: 1-3

Sockett DC. Debate: Paratuberculosis control. Vaccination vs eradication by on-farm control and test-and-slaughter (Against vaccination) Proceedings of the Fifth International Colloquium on Paratuberculosis; 1996 September 29- October 4, Madison, USA: Hines ME, Collins MT editors, 1996: 219-222. (a)

Sockett DC. Johne's disease eradication and control. Regulatory implications. *Vet Clin North Am* 1996; 12: 431-440. (b)

Spangler I, Bech-Nielsen S, Heidr LE. Diagnostic performance of two serological test and fecal culture for subclinical paratuberculosis and association with production. *Prev Vet Med* 1992; 13: 185-192.

Spears HN. Vaccination against Johne's disease: The results of a field trial experiment. *Vet* 1959; 71:1154-1156.

St Jean G. Treatment of clinical paratuberculosis in cattle. *Vet Clin North Am* 1996; 12: 417-430.

Stabel JR. Production of  $\gamma$ -interferon by peripheral blood mononuclear cells: An important diagnostic tool for detection of subclinical paratuberculosis. Proceedings of the Fifth International Colloquium on Paratuberculosis. 1996 September 29- October 4, Madison, USA: Hines ME, Collins MT editors, 1996: 262-269. (a)

Stable JR. Temporal effects of tumor necrosis factor- $\alpha$  on intracellular survival of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet Immunol Immunopath* 1995; 45: 321-332.

Stable JR. Transitions in immune response to *M. paratuberculosis* infections. Proceedings of the sixth International Colloquium on Paratuberculosis; 1999 February 14-18. Melbourn, Australia: Manning EJB, Collins MT editores 1999: 579-584.

Stevenson K Grieg A Henderson D Pérez V Huges V Pavlik I Hines ME McKendrik I Sharp JM. An epidemiologic study of paratuberculosis in wild rabbit in Scotland. Proceedings of the sixth International Colloquium on Paratuberculosis; 1999 February 14-18. Melbourn, Australia: Manning EJB, Collins MT editores 1999: 253.

Stewart V, Vaughan J, Noske P, Jones S, Tizzard M, Prowsw S. Immunological and bacteriological time course studies on experimental *Mycobacterium paratuberculosis* infections in sheep, goats and calves. Proceedings of the sixth International Colloquium on Paratuberculosis; 1999 February 14-18. Melbourne, Australia: Manning EJB, Collins MT editores 1999: 679.

Stheman SM. Paratuberculosis in small ruminant. Deer and South American camelids. *Vet Clin North Am*. 1996; 12: 441-456.

Stuart P. Vaccination against Johne's disease in cattle exposed to experimental infection. *Br Vet J*. 1965; 121:289-318.

Sweeney RW, Jones DE, Whitlock RH, Scott P. Cytokine expression in intestinal tissue of cows infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. Proceedings of the Fifth International Colloquium on Paratuberculosis; 1996 September 29- October 4; Madison, USA: Chiodini RJ, Hines ME, Collins MT editors, 1996: 48-51. (a)

Sweeney RW. Pathogenesis and immunity of paratuberculosis. Proceedings of the Fifth International Colloquium on Paratuberculosis. 1996 September 29- October 4, Madison, USA: Chiodini RJ, Hines ME, Collins MT editors, 1996: 1-4. (b)

Sweeny RW. Transmission of paratuberculosis. *Vet Clin North Am*. 1996; 12: 305-312.(c).

Tanaka S, Sato M, Taniguchi T, Yokomiso Y. Relationship of acid phosphatase activity to ultrastructure features in mice inoculated with *Mycobacterium paratuberculosis*. *J Comp Path* 1996; 1: 81-91.

Taylor AW. The experimental infection of cattle with varieties of *Mycobacterium johnei* isolated from sheep. *J Comp Path* 1953; 63: 368-373.

Thoen CO and Moore LA. Control of Jonhe's disease in a comercial dairy herd in Iowa. *J Vet Diagn Invest* 1989; 1: 223-226

Thorel MF, Krichevsky M, Lévy-Frébault VV. Numerical taxonomy of mycobactin-dependent *Mycobacteria*, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp *avium* subsp nov., and *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* subsp nov., and *Mycobacterium avium* subsp *silvaticum* subsp nov. *Int J Syst Bact* 1990; 40: 254-260.

Thorel MF. Relationship between *Mycobacterium avium*, *M paratuberculosis* and Mycobacteria associated with Crohn's disease. *Ann Rech Vet* 1989; 20: 417-429.

Tizzard M. Biology of *M. paratuberculosis*. Proceedings of the Fifth International Colloquium on Paratuberculosis. 1996 September 29 - October 4; Madison, USA: Chiodini RJ, Hines ME, Collins MT editors, 1996; 48-51.

Twort FW, Ingram GLY. A method for isolation and cultivating the *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis johne* and some experiments on the preparation of a diagnostic vaccine for pseudo-tuberculosis enteritis of bovines. *Proc Royal Soc London* 1912; 84:517-543. Citado por Chiodini 1984.

Unzueta RJ. Contribución al estudio de la enteritis paratuberculosa bovina en México. (tesis de licenciatura). México D.F. México: UNAM; 1936.

Valheim M, Hasvold H, Larsen HJ. Local and immune response after vaccination against *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in goats. Proceedings of the sixth International Colloquium on Paratuberculosis. 1999 February 14-18; Melbourn, Australia. Manning EJB, Collins MT editores 1999: 677.

Vélez HM. Comparación de diferentes técnicas de diagnóstico en paratuberculosis caprina (*Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*). (tesis de maestría). México D.F. México: UNAM; 1996.

Velez HM, Chávez GG, Suárez GF. Caprine paratuberculosis: gross and histological changes in the intestine and other tissues. Proceedings of the sixth International Colloquium on Paratuberculosis; 1999 February 14-18; Melbourn, Australia: Manning EJB, Collins MT editores, 1999: 657-664. (a)

Vélez M Domínguez MC Rio del J Trigo F Suárez F Chávez G. Control of paratuberculosis in two goat flocks. Proceedings of the sixth International Colloquium on Paratuberculosis; 1999b February 14-18; Melbourn, Australia: Manning EJB Collins MT editores, 1999: 121-125. (b)

Wentink GH, Bongers JH, Vos JH, Zeeuwen AAP. Relationship between negative skin test with Johnin after vaccination and postmortem findings. *Vet Rec* 1993;132: 38-39.

Westendorf ML, Zirkle EW. No hay soluciones rápidas para controlar la enfermedad de Jonhe. *Howard's Dairyman* 1995; agosto; 86-787.

Whitlock RH, Buergelt C. Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *Vet Clin North Am* 1996; 12: 345-356.

Wilson DJ, Rossitier C, Han HR, Sears M. Association of *Mycobacterium paratuberculosis* infection with reduced mastitis, but with decreased milk production and increased cull rate in clinically normal dairy cows. *Am J Vet Res* 1993; 54: 1851-1857.

Wilson DJ, Rossitier CA, Han HR, 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 29-October 4; Madison, USA: Hines ME, Collins MT editors, 1996: 296-298.

Willesmith JW. Jonhe's disease: a retrospective study of vaccinated herds in Great Britain. *British Vet J* 1981; 138: 4.

Williams ES, Snyder SP, Martin KL. Pathology of spontaneous and experimental infection of North American wild ruminant with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet Pathol* 1983; 20: 274-291.

Wittington R. Jonhe's disease diagnosis: recent advances and challenge for the future. *Proceedings of the sixth International Colloquium on Paratuberculosis*; 1999 February 14-18; Melbourne, Australia: Manning EJB, Collins MT editors, 1999: 333-343.

Wren G. What's new with Jonhe's disease? *Bovine Vet* 1993; November: 40-44.

Zaho BY, Czuprinsky CJ, Collins MT. Study of intracellular survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in monocytes from uninfected and infected cows using a radiometric method. *Proceedings of the Fifth International Colloquium on Paratuberculosis*; 1996 September 29-October 4; Madison, USA: Chiodini RJ, Hines ME, Collins MT editors, 1996: 296-298.

Zaatari EI, FAK, Naser SA, Engstrand L, Markesich DC, Kalter DC, Graham DY. Identification of *Mycobacterium avium* complex in sarcoidosis. *J Clin Microbiol* 1996;34: 2240-2245.

Zubbrick BG, Czuprinsky CJ. Ingestion and intracellular growth of *Mycobacterium paratuberculosis* within bovine blood monocytes and monocyte-derived macrophages. *Inf Immun* 1987; 55:1588-1593.

ANEXO 1.  
TÉCNICAS DE LABORATORIO

**1.1 Técnica de purificación de micobacterias a partir de mucosa intestinal.**

1. Se eligen las porciones de intestino (íleon y yeyuno) que muestran lesiones severas características de PTB y se comprueba la presencia de micobacterias mediante un raspado de la mucosa teñida con ZN.
2. Se abre el intestino fresco o congelado, previamente lavado con agua corriente.
3. Con una navaja de bisturí estéril se hace el raspado de la mucosa colocándolo en un tubo falcon.
4. Se agregan 2 ml de una solución de ampicilina al 20% para cada 5 mg de mucosa y se dejan por un tiempo mínimo de 24 h (puede ser en refrigeración).
5. Macerar la mezcla de mucosa con antibiótico empleando un Tenbroek.
6. Mezclar el macerado con una solución de Tripsina al 0.5% (Gibco) PBS a 23°C, durante 60 min. manteniendo la misma temperatura. La proporción de es 2:1 (Tripsina: mucosa).
7. Centrifugar durante 20 in a 1200 G.
8. Separar el sedimento y resuspender en 20 ml de agua destilada a 28-30°C.
9. Centrifugar durante 20 in a 800 G.
10. Desechar el sobrenadante y corroborar la presencia de bacterias del sedimento mediante tinción de ZN en un frotis.

Adaptado de Chávez, (1994) y Rathnamohan y Spencer, (1996).

## 1.2 Cuantificación de bacterias en un inóculo

Hacer un frotis en un  $\text{cm}^2$  utilizando  $1 \mu\text{l}$  del inóculo.

Realizar tinción de ZN.

Observar 10 campos contando en cada uno las bacterias encontradas.

Obtener un promedio de bacterias por frotis.

Para tener el total de bacterias por mililitro (ml) de inóculo, se utiliza la siguiente fórmula:

$$N \text{ bacterias} \times 360241 = \text{bacterias} \times 10^6.$$

De la concentración obtenida se multiplica por la cantidad de ml que se tienen para conocer la cantidad total de bacterias.

### 1.3 Técnica de la elaboración de gel para la prueba de IDGA.

#### Solución Amortiguada de Fosfatos (PBS)

Cloruro de sodio	NaCl	8.5 g
Cloruro de Potasio	KCl	0.2 g
Fosfato disódico de sodio	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44 g
Fosfato monobásico de potasio	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24 g
Agua destilada		1000 ml

Todos los reactivos se colocan en una matraz con el agua estilada, una vez que se han disuelto, se esteriliza el PBS.

#### Elaboración del gel.

Hacer una solución de agarosa al 1% (*Sigma*) con una solución amortiguada (PBS) mezclando continuamente en platina caliente hasta la ebullición.

Usar pipetas de cristal para agregar 13 ml en cada caja de petri.

Una vez solidificado el gel, hacer 4 rosetas utilizando un sacabocados de 6 orificios y uno central.

Las cajas con el gel se utilizan el mismo día para evitar la deshidratación.

## 1.4 Protocolo para la elaboración de soluciones de la prueba de Inmunoensayo Enzimático (ELISA)

### Elaboración de soluciones

Solución de lavado

#### Solución Amortiguada de Fosfatos-Tween Gelatina (PBS-TG)

Cloruro de sodio	NaCl	8.5 g
Cloruro de Potasio	KCl	0.2 g
Fosfato disódico de sodio	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44 g
Fosfato monobásico de potasio	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24 g
Tween 80		0.25 ml
Agua destilada		1000 ml
Gelatina microbiológica		0.5 g

Nota.- Se debe esterilizar el PBS-T después se agrega la gelatina, cuando todavía está tibia

#### Tampón carbonato

Para diluir el antígeno

Bicarbonato de sodio	NaCO <sub>3</sub>	530 mg
Agua destilada		100 ml
Ajustar pH a 9.6		

#### Tampón citrato

Solución A:

Ácido cítrico monohidratado	(C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> )	22.97g
Agua destilada		1000 ml

Solución B

Citrato sódico tribásico bihidratado	Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ·2H <sub>2</sub> O	29.41
Agua Destilada		1000 ml

Mezclar:

Solución A	600 ml
Solución B	479 ml
Agua destilada	cbp 2000 ml
Ajustar pH a 4 al momento de utilizarlo.	

#### Suspensión de *M. phlei*.

Para adsorber sueros

Solución salina al 8.5%	1000 ml
Liofilizado de <i>M. phlei</i>	5 g

### Dilución del antígeno

Tampón carbonato	1 ml
Antígeno PPA-3	10 $\mu$ l

El antígeno ya debe estar diluido de acuerdo a instrucciones del fabricante (Allied Monitor) 20 mg/5 ml de agua estéril para obtener concentración de 4 mg/ml, concentración final: 0.04 mg/ml

### Sustrato de Enzima

Tampón citrato	50 ml
ABTS	5.48 mg
Solución Madre (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1:25)	19 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 30%	5 $\mu$ l
Agua destilada	120 $\mu$ l

Nota.- debe mantenerse cubierto de la luz

### 1.5 Técnica de diálisis del Derivado Proteico Purificado (PPD)

1. Se emplea una membrana de 14 000 d (*Spectrum Medical Industries, INC*), de 10 cm la cual se hierve durante unos 10 min. Amarrar un extremo de la membrana
2. El PPD se coloca en la membrana y se cierra amarrando el otro extremo donde se coloca un contrapeso.
3. La membrana con el PPD se sumerge completamente en agua bidestilada y se deja durante 24 h a 1°C, cambiando el agua a las 12 h.
4. Se retiran las membranas y se introducen en un PBS al 0.01m pH 7.2 y se refrigera nuevamente durante 24 h en agitación constante, cambiando también la solución a las 12 h.
5. Se saca el PPD de las membranas y se pone en alicuotas y se refrigera hasta su uso.

#### Cuantificación de proteínas.

1. Se hace una curva estándar para lo cual se prepara una solución de albúmina sérica bovina 1 mg/ml en agua destilada.
2. En una microplaca se coloca de 0-10  $\mu$ l de la solución estándar adicionando cbp 10  $\mu$ l de agua destilada y 190  $\mu$ l de Solución de Bradford hasta el final.
3. En otra fila de la microplaca, se pone la muestra (PPD-A y PPD-B) diluida con agua destilada 1:0, 3:1, 1:1, 1:3 con volumen final de 10  $\mu$ l adicionando al final 190  $\mu$ l de solución de Bradford.
4. Se hace una lectura en un espectrofotómetro de 5-10 min. posteriores.
5. Se obtiene la diferencia con el "Blanco".
6. Se hace una curva de regresión con los resultados de la curva estándar y la cantidad correspondiente de la solución para obtener 'r'.

Utilizando 'r' se calcula la cantidad de proteínas en  $\mu$ g correspondiente a la cantidad que se midió

## 1.6 Protocolo para la prueba de Interferón gamma (IFN $\gamma$ )

1. Las muestras de sangre se obtienen en tubos con heparina y se trabajan rápidamente después de ser obtenidas.

### Estimulación de la sangre.

2. Dividir la sangre en microtubos de 1.5 ml y ponerlos en una gradilla.
3. Agregar a los viales con la sangre de cada muestra 100  $\mu$ l de PBS, a otro 100  $\mu$ l de PPD-B y a otro 100  $\mu$ l de PPD-A, la concentración de ambos PPD es de 2:100 y deben emplearse sin fenol, mezclando por pipeteo muy suave, 3-4 veces.
4. Sin tapar los microtubos, se cubren con un papel para evitar la desecación y se incuban durante 16-24 h a 37°C.
5. Centrifugar los microtubos 4500 rpm durante 20 min.
6. Separar cuidadosamente los plasmas y colocarlos en microtubos.
7. Almacenar en congelación hasta realizar la prueba.

### Realización de la prueba

Utilizar el Kit de *Bovigam CSL veterinary para la prueba de IFN $\gamma$* .

Previo al inicio de la prueba deben ser preparados los reactivos en cantidad adecuada para el número de placas que se probarán, de acuerdo a las instrucciones.

## 1.7 Protocolo para la elaboración de medio de cultivo Löwenstein-Jensen.

### Material

Tubos de cristal con tapón de rosca de 15 ml

1 matraz de cristal de 2 l con tapón de algodón y gasa

1 probeta de cristal de 500 ml con tapón de algodón y gasa.

Licuada con vaso de aluminio

Embudo de cristal con gasa

5 pipetas de cristal de 10 ml

2 jeringas de 5 ml

Todo el material se esteriliza en autoclave (120°C/121 lb/15min).

### Reactivos

Medio de Löwenstein-Jensen	23 g
Agua destilada	372.2 ml
Huevos	620.34 ml (12-15 piezas)
Micobactina J	2 mg
Glicerina	7.44 ml
Ciclohexamida	0.75 g
Penicilina	200 000 UI
Cloranfenicol	0.1 g
Alcohol isopropílico	2 l
Alcohol etílico	4 ml

## Procedimiento para hacer el medio de cultivo

1. Poner el agua bidestilada en el matraz, colocarlo sobre platina caliente en agitación constante y agregar el medio LJ y la glicerina. Mezclar constantemente hasta la ebullición.
2. Tapar el matraz y esterilizar en autoclave (120°C/121 lb/15min).
3. Lavar los huevos con agua y jabón, enjuagarlos muy bien y dejar a secar sobre gasa.
4. Desinfectar los huevos en el alcohol isopropílico al 75% por 30 min. Colocarlos sobre gasa limpia hasta que sequen.

### **Los siguientes pasos se realizan en campana estéril.**

5. Licuar los huevos durante 2 min. y dejar reposar.
6. Colocar el matraz con el medio sobre la platina en agitación, debe estar a 55°C.
7. Agregar los antibióticos: cloranfenicol: 20 ml (0.5 g/100 ml) de Cloranfenil Ofteno (*Sophia*), Penicilina: 200 000 UI (*Tomel*) y Ciclohexamida 0.75 g de (*Sigma*) y dejar disolver.
8. Agregar la micobactina J (*Allied Monitor Inc.*) previamente disuelta en el alcohol etílico, en el caso que lo requiera.
9. Medir el huevo batido en la probeta filtrándolo con ayuda del embudo y la gasa.
10. Agregar el huevo al matraz.
11. Dejar que se mezcle bien.
12. Con las pipetas poner de 8-10 ml de la mezcla en los tubos.
13. Colocar los tubos inclinados, sin apretar totalmente el tapón en baño maría a 85°C durante 45 min. para que coagulen (también puede usarse el autoclave).
14. Secar a 37°C durante 12 h y cerrar bien los tapones.
15. Almacenar los tubos a 2-8°C

## ANEXO 2

### Clasificación de lesiones de paratuberculosis\*

#### **Lesión tipo 1.**

Granulomas formados por varios macrófagos mezclados con algunos linfocitos y células epitelioides, localizados únicamente en tejido linfoide, principalmente en placas de Peyer y en ocasiones en linfonodos mesentéricos. Localizadas en la zona interfolicular, principalmente en la zona basal y hacia el ápice conforme la lesión se hace más severa. No se observa la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes.

#### **Lesión tipo 2.**

Granulomas que se extienden a lo largo de la porción basal en la zona interfolicular, extendiéndose hacia el área del ápice y de la lámina propia. Esta lesión está bien delimitada, encontrándose varios focos, pero en poca cantidad de manera que no producen enteritis difusa. Principalmente se localiza en el tejido linfoide y zonas adyacentes a las placas de Peyer. En los linfonodos los granulomas son más pequeños, semejantes a la lesión tipo 1. Tampoco se demostró la presencia de micobacterias.

#### **Lesión tipo 3.**

En este grado la lesión afecta tanto placas de Peyer y tejido adyacente, como a la mucosa no asociada al tejido linfoide. Se subdivide en tres tipos de lesión.

##### **Subtipo 3a.**

Los granulomas en placas de Peyer y mucosa adyacente son como del tipo 2, pero de mayor extensión especialmente en lámina propia, afecta más las vellosidades lo que produce incremento de tamaño. Hay granulomas bien delimitados en áreas ausentes de tejido linfoide, invadiendo todas las zonas, con una distribución multifocal, principalmente en íleon y menos en yeyuno. Se pueden observar algunos focos con escasas células inflamatorias, principalmente linfocitos y macrófagos en la submucosa y

---

\* Criterio de Pérez et al 1996

serosa asociados a vasos linfáticos y sanguíneos. Es frecuente encontrar lesiones en linfonodos caudales. El hallazgo de microorganismos no es frecuente.

### **Subtipo 3b.**

En este se encuentra una enteritis granulomatosa difusa, formada por grupos de células epitelioides y algunos linfocitos mezclados. Se puede apreciar la lesión en las placas de Peyer, en la zona interfolicular, en los domos o folículos, de manera que se nota una modificación de su estructura, la infiltración de macrófagos le da una apariencia de mosaico, también se observan algunas células gigantes. La severidad puede variar, pero siempre hay un cambio en la morfología, las vellosidades se ven engrosadas y achatadas, en ocasiones fusionadas. Es frecuente encontrar infiltrados linfocitarios con células plasmáticas en la submucosa y serosa, principalmente perivasculares y mientras más severo, estos infiltrados se extienden a la capa muscular con dilatación de vasos linfáticos. En la serosa se aprecia linfangitis y linfangiectasia. También los linfonodos presentan lesiones difusas y multifocales. Las micobacterias se encuentran en la mayoría de las lesiones.

Macroscópicamente se presenta un engrosamiento en algunas zonas de la pared intestinal, principalmente en el íleon y en menor medida en yeyuno. Con frecuencia puede haber linfangiectasia, también los linfonodos se encuentran aumentados de tamaño y edematosos. Los animales ya muestran signos de emaciación con ascitis e hidropericardio en diferentes grados, algunos pueden cursar con diarrea.

### **Subtipo 3c.**

También se caracteriza por enteritis granulomatosa difusa, la diferencia radica en el tipo de células presentes, en las placas de Peyer se observa un mayor número de macrófagos y células gigantes y en general en toda la mucosa las células predominantes son los linfocitos, de manera difusa en la lámina propia, en vellosidades y zona basal, también se encuentran algunos macrófagos que pueden estar de manera difusa o como granulomas bien delimitados, pueden encontrarse algunas células plasmáticas. El infiltrado linfocitario se observa en la submucosa y serosa, pero también puede apreciarse edema. En los linfonodos se encuentran granulomas multifocales, lo

más notable es la presencia de células gigantes de Langhans asociadas a pequeños focos necróticos con o sin calcificación. Es poco frecuente el hallazgo de bacterias en este tipo de lesión en cuyo caso se encuentran en pequeños números. Las lesiones macroscópicas son similares a las del subtipo 3b, pero la inflamación de la pared intestinal es más evidente en el subtipo 3c.

## APÉNDICE

### Descripción de lesiones macroscópicas y microscópicas encontradas en los cabritos del estudio.

#### **A1. Grupo infectado con Map caprino, inmunizado.**

Sacrificio día 120: Cabrito 6.

*Macroscópico:* Ligeramente engrosamiento de la mucosa del íleon (IL) y algunas porciones del yeyuno (Y).

*Microscópico.* Focos de reacción granulomatosa en válvula ileocecal (VIC) e IL con placa de Peyer (PP), localizados en zona interfolicular y la base del tejido linfóide. Los granulomas están compuestos principalmente por macrófagos y linfocitos, mientras que las células gigantes se encontraron en forma escasa sólo en algunos focos.

Sacrificio día 180: Cabrito 3

*Macroscópico.* VIC normal, IL con engrosamiento moderado aparente aunque no generalizado, sólo en pequeñas porciones. También se observó engrosamiento del Y en la porción proximal, así como linfangiectasia en la serosa, especialmente en la porción media, relacionado a estas lesiones se hallaron estructuras que sugieren nidos de esquizoontes en cantidad discreta, en porciones del intestino hemorrágicas o congestionadas. Hígado con cápsula reactiva, zona endurecida y con puntillado blanquecino

*Microscópico.* Reacción granulomatosa focal en VIC e IL, localizada en la base de vellosidades asociadas a PP, en las mismas porciones pero en la porción apical de las vellosidades, se observó dilatación de vasos linfáticos. El Y presentó escasos focos granulomatosos en zona interfolicular y relacionados a la cúpula.

Perihepatitis granulomatosa focal, localizada en la cápsula, con presencia de macrófagos y células gigantes.

En el nódulo vacunal dermatitis granulomatosa multifocal severa con áreas de necrosis rodeadas por macrófagos y linfocitos, se observó infiltrado mononuclear perivascular y perianexal en dermis superficial y profunda.

#### **A2. Grupo infectado con Map caprino, no inmunizado.**

Sacrificio día 120: Cabrito 8

*Macroscópico.* Engrosamiento ligero en algunas porciones del IL y Y asociadas a nidos de esquizoontes de coccidias. Algunos linfonodos mesentéricos ligeramente aumentados de tamaño y fusionados, en la corteza se observó una zona blanquecina más aparente.

*Microscópico.* En IL un foco granulomatoso con presencia de macrófagos y linfocitos, localizado en folículo linfóide.

Sacrificio a los 180 días: Cabrito 2.

*Macroscópico.* Intestino sin engrosamiento aparente, solo algunas PP se encontraron más voluminosas, en IL y Y. Otras porciones intestinales presentaron escasos nidos de esquizoontes. Linfonodos normales, excepto algunos caudales con

fusión incipiente. Pulmones con pequeñas zonas consolidadas, localizadas en porción ventral de lóbulos apicales, de tipo crónico, presentó adherencias a la cavidad torácica.

*Microscópico.* Enteritis granulomatosa focal en VIC, localizada en lámina propia sin relación a PP y en IL en zona apical de lámina propia, en esta porción también hubo linfangiectasia. En Y se presentó enteritis granulomatosa multifocal, ubicada principalmente en la base de las vellosidades, pero sin relación PP, formados por linfocitos, escasos macrófagos y células plasmáticas. También presentó linfangiectasia en las crestas de vellosidades. Se presentó algún foco granulomatoso en zona interfolicular, constituido por macrófagos.

En el nódulo vacunal del pliegue anocaudal se observó un infiltrado mononuclear compuesto por macrófagos y células plasmáticas con relación a vasos sanguíneos en piel ocasionando dermatitis perianexal y perivascular.

En pulmón se observó infiltrado por neutrófilos en espacios alveolares y bronquiolos con congestión moderada difusa, compatible con bronconeumonía supurativa discreta.

### **B 1. Grupo infectado con *Map* ovino, inmunizado.**

Sacrificio a los 120 días: Cabrito 11

*Macroscópico.* Engrosamiento discreto de la mucosa de VIC e IL. Linfonodos mesentéricos mediales fusionados, asimismo en algunos se observaron zonas blanquecinas y ligero agrandamiento.

Los otros órganos no presentaron cambios.

*Microscópico.* Reacción granulomatosa focal en IL, localizada en la zona interfolicular y linfangiectasia en la submucosa, este hallazgo fue común a la porción apical de vellosidades en VIC.

En hígado se encontró un foco granulomatoso periportal con células gigantes y eosinófilos.

Sacrificio día 120: Cabrito 15.

*Macroscópico.* Engrosamiento discreto de VIC, parte adyacente del IL y una porción del Y. El riñón presentaba ligera congestión en la pelvícula.

*Microscópico.* La VIC mostró un infiltrado de células plasmáticas, abundantes eosinófilos y células polimorfonucleares con vasos de neoformación y fibroblastos, este tejido de granulación se localizó en la submucosa. En IL, reacción granulomatosa multifocal con relación a PP, localizados en la base de folículos y en cúpulas.

En nódulo vacunal se encontró dermatitis granulomatosa multifocal severa, con necrosis central circundada por macrófagos, linfocitos y células gigantes, en dermis, hipodermis y en algunos vasos sanguíneos.

Sacrificio día 180: Cabrito 18

*Macroscópico.* IL engrosado y congestionado de manera moderada pero en casi toda la superficie, principalmente sobre PP, en Y sólo una pequeña porción distal ligeramente más voluminosa.

*Microscópico.* Lesión granulomatosa focal en VIC caracterizada por infiltración de macrófagos localizados en lámina propia, linfangiectasia en crestas vellositarias. En IL enteritis granulomatosa focal sin relación a PP, localizada en criptas intestinales. En

epitelio de crestas vellositarias, asociado a folículo linfoide hubo linfangiectasia y edema en lámina propia

En nódulo vacunal dermatitis granulomatosa multifocal con áreas centrales de necrosis. La piel anocaudal presentó dermatitis linfocitaria perivascular moderada.

## **B2. Grupo infectado con *Map* ovino, no inmunizado.**

Sacrificio día 180: Cabrito 13

*Macroscópico.* Engrosamiento y congestión discretos de PP en el Y, vasos linfáticos de la submucosa aparentes en la porción media.

*Microscópico.* Enteritis granulomatosa multifocal en VIC, caracterizada por macrófagos infiltrados en zona interfolicular y basal En IL fue hallada reacción granulomatosa multifocal en la base de vellosidades sin relación a PP. Linfangiectasia en vellosidades relacionadas a tejido linfoide. El Y presentó focos granulomatosos con relación a PP, ubicados en la base de vellosidades con linfangiectasia en crestas.

## **C1. Grupo control, inmunizado.**

Sacrificio día 120: Cabrito 26.

*Macroscópico.* Engrosamiento de VIC y del IL, de manera discreta en algunas porciones del IL y Y, se encontraron puntos blanquecinos como nidos de esquizoontes de eimerias. Los linfonodos fusionados a lo largo de toda la cadena mesentérica, linfangiectasia en algunas porciones del intestino

Pulmones congestionados ligeramente, con zonas de consolidación pequeñas principalmente en lóbulo apical.

*Microscópico.* Enteritis eosinofílica discreta en lámina propia de IL, con edema en subserosa. En Y se apreció linfangiectasia y edema en zona basal de vellosidades, se observaron focos granulomatosos con infiltrado eosinofílico, localizados en vellosidades, asociados a nidos de esquizoontes.

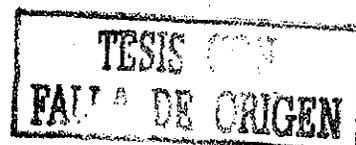
Pulmón con edema discreto, colapso de los espacios alveolares con presencia de polimorfonucleares en bronquiolos, sugerente de un foco de bronconeumonía supurativa discreta.

Sacrificio día 180: Cabrito 20

*Macroscópico.* Presencia de nidos de esquizoontes en IL y en menor cantidad en una porción medial del Y. Vasos linfáticos engrosados ligeramente en Y medial. Linfonodos mesentéricos congestionados y fusionados con un incremento discreto de tamaño. En hígado se encontraron parásitos calcificados, presencia de cisticercos en toda la cavidad abdominal. Pulmones con zonas de consolidación y otras porciones muy congestionadas, compatibles con broncoaspiración en el momento del sacrificio.

*Microscópico.* Edema discreto en submucosa de VIC y Y.

Edema pulmonar y hemorragia, hiperplasia linfoide peribronquiolar severa. En nódulo vacunal se encontró una dermatitis granulomatosa severa con necrosis central rodeada de células gigantes.



## **C2. Grupo control, no inmunizado.**

Sacrificio día 120: Cabrito 22

*Macroscópico.* VIC bastante voluminosa, engrosamiento de la mucosa del IL y Y con presencia de nidos de esquizoontes de coccidias, en Y se observó linfangiectasia. Los linfonodos de esa porción se encontraron aumentados de tamaño.

*Microscópico.* En VIC, IL y Y se presentó reactividad de las criptas intestinales con infiltrado eosinofílico, con algunas células plasmáticas y linfocitos localizados en lámina propia y edema en submucosa. En la mucosa de VIC y algunas porciones de IL se apreciaron focos de necrosis infiltrados por eosinófilos, asociados a la presencia de coccidias.

Sacrificio día 180: Cabrito 24

*Macroscópico.* La mayor parte del intestino con engrosamiento generalizado, vasos linfáticos dilatados, cadena ganglionar fusionada con linfonodos aumentados ligeramente, el tejido conectivo que los rodea, se apreció más grueso y blanquecino. Se encontraron coccidias en VIC e IL.

*Microscópico.* Edema moderado en lámina propia de VIC, IL y Y. Linfangiectasia en algunas partes del Y.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN