

01664

2<sup>es.</sup>



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

División de Estudios de Posgrado e Investigación  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Comparación de Diferentes Técnicas de  
Diagnóstico en Paratuberculosis Caprina  
(*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*).

T E S I S

Para obtener el Grado de

MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS:

P A T O L O G I A

Presenta

M.V.Z. MAYRA ELIZABETH VELEZ HERNANDEZ



Asesores: Dr. Gilberto Chávez Gris  
Dr. Francisco Suárez Güemes  
Dr. Michael T. Collins

México, D. F. 1998

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

25-9584



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

*A mi querido Mario con todo mi amor.*

*A toda mi familia, gracias por su amor y apoyo, los quiero mucho.*

*Con cariño a Fabiola (q.e.p.d.).*

## **AGRADECIMIENTOS**

A Gilberto Chávez, agradeciendo su invaluable enseñanza, su acertada orientación, su inagotable paciencia y su infinita comprensión, gracias por todo.

Al Dr. Francisco Suárez por sus enseñanzas y orientación durante el desarrollo de mis estudios de maestría.

Al Dr. Michael Collins, por su cooperación y orientación para la realización de este estudio.

A la MVZ. Irasema Yela Miranda, por su invaluable ayuda en el desarrollo del Estudio Bacteriológico.

Al M.V.Z. Jaime Campuzano por sus consejos siempre útiles para la elaboración del trabajo escrito.

A los MVZ. Abel Trujillo, Adriana Alarcón y al personal del área caprina del C.E.P.I.E.R. por su entusiasmo y por las facilidades otorgadas para la obtención del material biológico necesario para el desarrollo del presente estudio.

Al MVZ. Vicente Lemus, Director Técnico del C.E.I.E.P.B.C., por su constante interés y cooperación en el desarrollo de este estudio.

Al personal del área caprina del C.E.I.E.P.A.G., por su colaboración en la recolección del material biológico necesario para el desarrollo de esta tesis.

A los MVZ. Alhelí Flores y Mario Bautista por su valiosa ayuda en la organización del material biológico y en la realización de las necropsias y del estudio serológico, así como por su compañía siempre grata.

A Luis Antonio Morales Arreola, Histotecnólogo del Departamento de Patología de la F.M.V.Z., quien realizó las preparaciones histológicas correspondientes al estudio anatomopatológico.

A mis compañeros del Laboratorio de Microbiología Molecular, gracias por hacer placentera mi estancia en este laboratorio.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (D.G.A.P.A.), por brindarme la oportunidad de realizar los estudios de maestría como becario de esta Dirección.

# ÍNDICE

	<b>Páginas</b>
<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>Summary</b>	<b>2</b>
<b>Introducción</b>	
1. Antecedentes históricos	2
1.1. Antecedentes en México	3
2. Generalidades	4
3. Etiología	5
4. Patogenia	7
5. Aspectos anatomopatológicos	9
6. Aspectos inmunológicos	11
6.1. Inmunidad celular	12
6.2. Inmunidad humoral	14
7. Diagnóstico	15
7.1. Estudio bacteriológico	15
7.1.1. Cultivo convencional	15
7.1.2. Cultivo radiométrico	15
7.2. Detección de la respuesta inmune celular	16
7.2.1. Intradermorreacción	16
7.2.2. Interferón gamma	16
7.3. Detección de la respuesta inmune humoral	17
7.3.1. Fijación de complemento	17
7.3.2. Inmunodifusión en gel de agar	17
7.3.3. Inmunoensayo enzimático	17
7.4. Estudio anatomopatológico	18
7.5. Técnicas moleculares	19
8. Control de la paratuberculosis	20
9. Paratuberculosis y enfermedad de Crohn	25
<b>Objetivos</b>	<b>27</b>

<b>Material y métodos</b>	<b>28</b>
1. Estudioserológico	28
1.1. Inmunodifusión en gel de agar.	28
1.2. Inmunoensayo enzimático.	29
2. Estudio anatomopatológico.	30
3. Estudio bacteriológico.	30
3.1. Método convencional	30
3.2. Aislamiento previa tripsinización de los tejidos	30
3.3. Cultivo radiométrico	31
4. Aislamiento y eliminación	31
5. Análisis estadístico	31
<b>Resultados</b>	<b>32</b>
1. Estudio serológico	32
2. Estudio anatomopatológico	38
3. Estudio bacteriológico	42
3.1. Método convencional	42
3.2. Aislamiento previa tripsinización de los tejidos	42
3.3. Cultivo radiométrico	46
4. Aislamiento y eliminación	47
5. Análisis estadístico	49
<b>Discusión</b>	<b>56</b>
<b>Literatura citada</b>	<b>70</b>

## Lista de cuadros y figuras

		Página
Cuadro 1	Lesiones asociadas a los diferentes estados de la infección por <i>M. a. paratuberculosis</i> (Pérez <i>et al</i> , 1993).	11
Cuadro 2.1.	Identificaciones de los caprinos positivos a IDGA y ELISA en cada uno de los muestreos realizados en el rebaño I.	33
Cuadro 2.2.	Identificaciones de los caprinos positivos a IDGA y ELISA en cada uno de los muestreos realizados en el rebaño II.	35
Cuadro 2.3.	Identificaciones de los caprinos positivos a IDGA y ELISA en cada uno de los muestreos realizados en el rebaño III.	37
Cuadro 3	Comparación entre la respuesta serológica, la presencia de baar y el tipo de lesión en los caprinos procedentes de los 3 rebaños a los que se les realizó estudio anatomopatológico.	41
Cuadro 4.1.	Resultados del estudio bacteriológico correspondientes al rebaño I (CEPIER).	42
Cuadro 4.2.	Resultados del estudio bacteriológico correspondientes al rebaño II.	44
Cuadro 4.3.	Resultados del estudio bacteriológico correspondientes al rebaño III.	44
Cuadro 5	Respuesta serológica de los caprinos de los que se aisló <i>M. a. paratuberculosis</i> a partir de heces.	45
Cuadro 6	Comparación entre los aislamientos de <i>M. a. paratuberculosis</i> obtenidos de heces a partir de cultivo convencional y radiométrico.	47
Cuadro 7.1.	Valores Predictivos (VPP, VPN) de la IDGA en el rebaño I	51
Cuadro 7.2.	Valores Predictivos (VPP, VPN) del ELISA en el rebaño I.	51
Cuadro 7.3.	Valores Predictivos (VPP, VPN) de la IDGA en el rebaño II.	53
Cuadro 7.4.	Valores Predictivos (VPP, VPN) del ELISA en el rebaño II.	53
Cuadro 7.5.	Valores Predictivos (VPP, VPN) de la IDGA en el rebaño III.	55
Cuadro 7.6.	Valores Predictivos (VPP, VPN) del ELISA en el rebaño III.	55

		<b>Páginas</b>
Figura 1	Diagnóstico serológico de paratuberculosis a través de la IDGA.	78
Figura 2	Diagnóstico serológico de paratuberculosis a través del ELISA.	78
Figura 3	Comparación del porcentaje de caprinos positivos a paratuberculosis detectados por IDGA y ELISA en el rebaño I.	34
Figura 4	Comparación del porcentaje de caprinos positivos a paratuberculosis detectados por IDGA y ELISA en el rebaño II.	35
Figura 5	Comparación del porcentaje de caprinos positivos a paratuberculosis detectados por IDGA y ELISA en el rebaño III.	38
Figura 6	Tejidos de los que se obtuvieron los aislamientos de <i>M. avium paratuberculosis</i> .	45
Figura 7	Densidad de incidencia en los 3 rebaños.	49
Figura 8	Intestino de caprino con lesiones graves asociadas a <i>Map</i> .	79
Figura 9	Intestino de caprino con lesiones moderadas asociadas a <i>Map</i> .	79
Figura 10	Linfonódulo mesentérico de caprino con reacción granulomatosa asociada a <i>Map</i> .	80
Figura 11	Histopatología de intestino con lesión granulomatosa moderada, tipo II (HE).	80
Figura 12	Histopatología de intestino con lesión tipo IIIa (HE).	81
Figura 13	Histopatología de intestino con lesión tipo IIIb (HE).	81
Figura 14	Histopatología de intestino con lesión tipo IIIc (HE).	82
Figura 15	Histopatología de linfonódulo con lesión granulomatosa (HE).	82
Figura 16	Histopatología de hígado con lesión granulomatosa (HE).	83
Figura 17	Histopatología de hígado con bacilos ácido-alcohol resistentes (ZN).	83
Figura 18	Histopatología de hígado con focos de células mononucleares (HE).	84
Figura 19	Reacción granulomatosa con abundantes bacilos ácido-alcohol resistentes ( ZN).	84

Figura 20	Reacción granulomatosa con cantidad moderada de bacilos ácido-alcohol resistentes (ZN).	85
Figura 21	Cultivo de <i>M. a. paratuberculosis</i> en medio de Löwenstein-Jensen con micobactina.	85

## **Anexos**

		<b>Página</b>
Anexo 1.	Imunodifusión en gel de agar (IDGA), para el diagnóstico de paratuberculosis caprina.	<b>88</b>
Anexo 2.	Inmunoensayo enzimático (ELISA), para el diagnóstico de paratuberculosis caprina.	<b>89</b>
Anexo 3.	Metodología para la elaboración del medio de cultivo Löwenstein-Jensen	<b>90</b>

## RESUMEN

Vélez Hernández Mayra Elizabeth. "Comparación de diferentes técnicas de diagnóstico en Paratuberculosis caprina (*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*)". Bajo la dirección de los Doctores Gilberto Chávez Gris, Francisco Suárez Güemes y Michael T. Collins.

Diversas técnicas de diagnóstico se han desarrollado para identificar a los rumiantes infectados con *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*). Cada una de éstas técnicas presentan defectos y limitaciones. Aunado a lo anterior, la información acerca de la utilidad de éstas en caprinos es limitada, lo que hace necesario identificar técnicas que detecten el mayor número de caprinos infectados con *Map*. El presente estudio se realizó en 3 rebaños caprinos con antecedentes clínicos, serológicos, anatomopatológicos y bacteriológicos de paratuberculosis (ptb). En los 3 rebaños se tomaron muestras de sangre de los caprinos mayores de 1.5 años de edad, cada 3 meses. Todos los sueros obtenidos fueron examinados a través del inmunoensayo enzimático (ELISA) y de la inmunodifusión en gel de agar (IDGA). En el rebaño I se realizaron 7 tomas de muestras, en 110 caprinos aproximadamente, en las que se detectaron 47 caprinos positivos a ELISA y 45 a IDGA; en el rebaño II se realizaron 5 tomas de muestras, en 100 animales aproximadamente, en las que se detectaron 10 caprinos positivos a ELISA y 8 positivos a IDGA; en el rebaño III se realizaron 5 tomas de muestras, a 130 caprinos aproximadamente, en las que se identificaron 81 caprinos positivos a ELISA y 42 positivos a IDGA. Los valores predictivos positivo y negativo de ambas técnicas de diagnóstico fueron determinados con el Teorema de Bayes. Posteriormente se realizó el estudio anatomopatológico de 13 cabras del rebaño I positivas a IDGA, en las que se observaron lesiones macroscópicas y microscópicas compatibles con ptb; así también se estudiaron 5 caprinos con sospecha clínica de ptb, únicamente 3 de estos presentaron lesiones sugestivas. En el rebaño II se realizó el estudio anatomopatológico de 3 caprinos positivos a IDGA, en los 3 se observaron lesiones macroscópicas y microscópicas discretas compatibles con ptb; de igual forma se realizó este estudio a un caprino positivo a ELISA y con manifestaciones clínicas de ptb, el cual también presentó lesiones sugestivas. En el rebaño III se estudiaron 7 caprinos positivos a IDGA, los 7 presentaron lesiones macroscópicas compatibles con ptb; un caprino no presentó cambios microscópicos. Al momento de realizar el estudio anatomopatológico se tomaron las muestras necesarias para el cultivo bacteriológico, en el que se utilizó el medio de Löwenstein-Jensen con y sin micobactina, obteniéndose resultados positivos en el rebaño I entre la 4ª y 16ª semanas de incubación a partir de diversos fragmentos intestinales, linfonódulos mesentéricos y heces, procedentes de 13 caprinos. En el rebaño II se obtuvieron aislamientos de *Map* entre la 12ª y 16ª semanas de incubación a partir de diversos fragmentos intestinales y linfonódulos mesentéricos procedentes de 2 caprinos. En el rebaño III se lograron 2 aislamientos del *Map* en la 12ª semana de incubación, a partir de diferentes fragmentos intestinales procedentes de 2 caprinos. En los 3 rebaños los aislamientos se lograron en el medio de Löwenstein-Jensen con micobactina. Se intentó el aislamiento del *Map* a partir de heces utilizando el cultivo bacteriológico convencional y el cultivo radiométrico, obteniéndose 7 aislamientos con el cultivo convencional y 4 con el radiométrico. Se adoptó en los 3 rebaños el programa "Probar y Eliminar" con el que los caprinos que resultaron positivos a IDGA en cada una de las tomas de muestras fueron separados y eliminados del resto del rebaño. Las variaciones de las prevalencias estimadas a través del ELISA y la IDGA de cada una de las tomas de muestras fueron analizadas con el estadístico  $\chi^2$ .

Palabras clave: paratuberculosis, *M. a.* subsp. *paratuberculosis*, caprinos.

## SUMMARY

Vélez Hernández Mayra Elizabeth: "Comparison among different diagnosis techniques on caprine paratuberculosis (*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*)". Under the supervision of Gilberto Chávez Gris MVZ, PhD. Francisco Suárez Güemes MVZ, PhD. Michael T. Collins DVM, PhD.

Several diagnosis techniques have been developed in order to identify ruminants infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*). Each of these techniques shows limitations. On this sense, information about usefulness of these techniques applied on caprines is scarce, and it is necessary to look for alternate methods to detect the higher possible numbers of caprines infected with *Map*. The present study was carried out on 3 caprine flocks with clinical, serological, anatomopathological and bacteriological evidences of paratuberculosis (ptb). Each three months, the goat population from each flock older than 1.5 years old was sera sampled. The collected sera were tested by enzyme linked immunoabsorbent assay (ELISA) and agar gel immunodiffusion (AGID). Seven sera samples were collected on flock I, 47 caprines were positive to ELISA and 45 to AGID; on flock II, 5 sera samples were collected, 16 caprines were positive to ELISA and 8 to AGID; on flock III, 5 sera samples were also collected, 91 caprines were positive to ELISA and 42 to AGID. The positive and negative predictive values of each diagnosis technique were determined by the Baye's Theorem. Subsequently, the anatomopathological study was carried out on 13 positive to AGID goats, from flock I, macroscopical and microscopical lesions suggestive of ptb were observed; also 5 goats with clinical evidence of ptb were studied, only 3 goats showed lesions that suggested ptb. On flock II, the postmortem study was carried out on 3 goats positive to AGID, the 3 goats showed discrete macroscopical and microscopical ptb lesions; one goat with ptb clinical evidence was necropsied, ptb lesions were observed. On flock III, 7 goats positive to AGID, were anatomopathologically studied, 7 goats macroscopically showed discrete paratuberculosis lesions; one goat did not show microscopical changes. When necropsies were made the necessary samples for the bacteriological culture were collected. The bacteriological cultivation was carried out on Löwenstein-Jensen media with and without mycobactin. On flock I, positive growth was observed between the 4<sup>th</sup> and 16<sup>th</sup> incubation weeks. The isolations were obtained from intestine, mesenteric lymph nodes and faeces from 13 goats. On flock II *Map* growth was detected between the 12<sup>th</sup> and 16<sup>th</sup> incubation weeks. The isolations were obtained from 2 intestines and a mesenteric lymph nodes. On flock III, positive growth was observed on the 12<sup>th</sup> incubation week, the growth were detected on 2 intestines. All isolations were observed on Löwenstein-Jensen media with mycobactin. The *Map* isolation from faeces was carried out with the conventional bacteriologic culture and the radiometric culture, 7 isolations were detected by the conventional culture and 4 with the radiometric one. On the three flocks the "Test and Cull" program was adopted, the caprines which were positive to AGID on each sera sampling were separated and eliminated from each flock. The different prevalences estimated through ELISA and AGID on each sampling were analysed by the Chi square statistic method.

**Key words:** paratuberculosis, *M. a.* subsp. *paratuberculosis*, caprines.

# INTRODUCCIÓN

## 1. Antecedentes históricos

En 1895 el profesor alemán Heinrich Albert Johne y su asistente Langdon Frothingham, describen un caso de enteritis crónica en una vaca que había presentado diarrea por un período prolongado; al realizar el examen *posmortem* encontraron bacilos ácido alcohol resistentes (baar) en la mucosa intestinal la cual estaba notablemente engrosada ( Johne y Frothingham, 1895, citado en Bendixen *et al*, 1981). Johne y Frothingham enviaron dicho material a R. Koch, quien al igual que Markus, años mas tarde (1903) pensó que se trataba de una infección por el tipo aviar del bacilo tuberculoso. Sin embargo, B. Bang en 1906, produjo una infección experimental en cuyes y becerros al inocularlos con fragmentos intestinales de una vaca con “enfermedad de Johne” y demostró que se trataba de una nueva enfermedad. El bacilo pseudotuberculoso como fue llamado, no era idéntico a ninguna de las tres micobacterias patógenas conocidas (*M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. avium*). En 1912, los investigadores británicos Tworth e Ingram logran el primer aislamiento del bacilo pseudotuberculoso. Un año más tarde estos mismos investigadores publicarán la primer monografía de la “enfermedad de Johne”, en la que entre diversos temas se discuten las infecciones experimentales logradas con la inoculación intravenosa e intraperitoneal de cultivos puros de *M. johnei* en becerros y cabras (Goudsward *et al*, 1972).

### 1.1. Antecedentes en México

En México la Paratuberculosis fue diagnosticada por primera vez en ganado bovino lechero en el año de 1936 por R.J. Unzueta, a través de la johnina y tuberculina aviar, y de la observación del bacilo en frotis de heces con la tinción de Ziehl Neelsen (Alemón, 1988; Hernández 1991; Oviedo, 1991; Praxedis, 1985; Trigo, 1979). Años después, en 1974, X. Bustamante y M. Garibay realizan fijación de complemento y la prueba doble comparativa intradérmica para tuberculosis aviar y mamífero en ovinos (Alemón 1988; Hernández, 1991; Oviedo, 1991; Praxedis, 1985). Posteriormente en 1979, Ramírez *et al* logran el primer aislamiento de *M. a. paratuberculosis* en bovinos lecheros, a partir de linfonódulos mesentéricos e intestino delgado (Ramírez *et al*, 1979). En 1982, este mismo grupo de

investigadores logran el aislamiento de *M. a. paratuberculosis* en cabras de los estados de Querétaro y Guanajuato (Alemón, 1988; Hernández, 1991; Oviedo, 1991). En 1983, Praxedis identifica el bacilo en heces de un ovino y en 1985 este mismo autor determina la prevalencia de paratuberculosis en ovinos y caprinos sacrificados en cuatro rastros periféricos al D.F., obteniendo valores que oscilan entre 1.2-8.4% en caprinos y 0.8 –4.4% en ovinos (Praxedis, 1985). En el año de 1984, De Lucas informa sobre cuatro técnicas de diagnóstico de Paratuberculosis caprina (Hernández 1991; Oviedo, 1991) y en 1988, Alemón determina la prevalencia de la enfermedad en una explotación comercial ovina mediante las técnicas serológicas de contraelectroforesis y doble inmunodifusión en gel (Alemón 1988).

En 1991, Hernández Valle realiza un ensayo de inmunización subcutánea con una bacterina oleosa de *M. a. paratuberculosis* en un rebaño ovino infectado naturalmente. En este mismo año, Oviedo Fernández desarrolla una prueba de una bacterina oral de *M. a. paratuberculosis* en el mismo rebaño ovino. Ambos autores concluyen que no es posible evaluar la protección que brindan las bacterinas ya que 2 borregos del grupo vacunado y uno del grupo control enfermaron durante el desafío natural al que estuvieron expuestos (Hernández, 1991; Oviedo 1991).

Desafortunadamente, en la actualidad no se cuenta con información concerniente a la distribución de la enfermedad en el país ni sobre las pérdidas económicas asociadas a ésta, por lo que en 1995 el Consejo Técnico Consultivo de Salud Animal hace énfasis en la necesidad de realizar un estudio seroepidemiológico en la República Mexicana, para establecer las áreas de mayor y menor seroprevalencia de Paratuberculosis en los ganados bovino, ovino y caprino (Anónimo, Conasa 1995).

## **2. Generalidades**

Aunque la mayor atención en la paratuberculosis se ha enfocado a los rumiantes domésticos, esta también afecta a rumiantes silvestres como los venados, antílopes, cabras montañosas, bisontes , camellos y llamas (Anderson *et al*, 1993; Belknap *et al*, 1994; Cocito *et al*, 1994; Johnson *et al*, 1993; Kreeger, 1991; Trigo, 1979).

Esta enfermedad representa actualmente un grave problema para las explotaciones de rumiantes domésticos teniendo un impacto económico importante a nivel mundial (Cocito *et al*, 1994; Julian 1975). Sin embargo, este impacto no ha sido bien documentado, en parte por las dificultades para el diagnóstico de los animales infectados por lo que en muchos casos únicamente se valoran las pérdidas ocurridas por mortalidad, la que en el caso de los caprinos oscila entre el 8-10% anual asociada a paratuberculosis (García Marín, 1993).

La paratuberculosis se disemina lentamente y requiere un período prolongado para el desarrollo de signos clínicos, por lo que al momento de detectar a un individuo clínicamente enfermo el 38-42% del hato pueden estar infectados y las muertes anuales pueden ser hasta del 10% (Collins 1991). La presentación clínica se asocia generalmente con animales adultos mayores de 2 años de edad, los bovinos adultos se han llegado a considerar resistentes a la enfermedad. En los caprinos la edad no es considerada como un factor determinante en la susceptibilidad a la enfermedad ya que se han presentado signos clínicos y lesiones en animales jóvenes (Cocito *et al*, 1994; Elsken *et al*, 1985).

### 3. Etiología

El agente etiológico de la paratuberculosis, *Mycobacterium avium subsp paratuberculosis* (Thorel *et al*, 1990), pertenece al grupo CMN ( Géneros: *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*) el cual recientemente incluye también a *Rhodococcus* (Cocito *et al*, 1994). Es un microorganismo Gram positivo, ácido alcohol resistente, que mide 0.5 a 1.5  $\mu\text{m}$ . Bioquímicamente esta micobacteria se caracteriza por formar una catalasa termoestable, no reducir los nitratos, no producir niacina, ser negativa a aril sulfatasa,  $\beta$ -glucosidasa y ureasa e hidrolizar el Tween en 10 días. Sin embargo, algunas cepas de *M. a. paratuberculosis* no presentan estas características bioquímicas ya que puede haber variación entre cepas de *M. a. paratuberculosis*, además de que puede haber coincidencias con las especies *M. avium* y *M. wood pigeon* (Nyange 1990). En los medios de Herrold con yema de huevo y Löwenstein-Jensen con micobactina forma colonias rugosas no pigmentadas, crece lentamente y requiere estrictamente micobactina para su crecimiento (Lambrecht *et al*, 1992), el cual tarda aproximadamente 4 meses.

Aunque es bien sabido que todas las bacterias dependen de los metales para su desarrollo, las micobacterias patogénicas requieren en especial de una fuente orgánica de hierro para su crecimiento. El hierro es quelado por sideróforos y de esta forma se transporta a través de la membrana y se realiza el intercambio citoplásmico. Se conocen dos sideróforos: las micobactinas y las exoquelinas, las primeras, agentes internos producidos por la propia micobacteria bajo condiciones donde el hierro es limitado (Snow 1970, citado en Lambrecht *et al*, 1992), son compuestos liposolubles de alto peso molecular, formadas por un corazón de hierro y cadenas de diferentes longitudes con grupos alquilo, que se presume están asociados a la pared celular y cuya función es secuestrar al hierro (Macham *et al*, 1975; Ratledge *et al*, 1982 citados en Lambrecht *et al*, 1992). Estas micobactinas son únicas de las micobacterias y las nocardias, no han sido encontradas en otros actinomicetos por lo que son de importancia taxonómica. Las exoquelinas son vectores externos de origen proteínico presentes en los fluidos extracelulares las cuales se liberan en altas concentraciones por la micobacteria cuando existen deficiencias de hierro. En los animales el principal almacén del ión férrico es la ferritina y las moléculas transportadoras de este metal son la transferrina y la lactoferrina. Las exoquelinas micobacterianas remueven el hierro de estos quelantes de origen animal y lo transportan a través de la pared micobacteriana. Es importante mencionar que únicamente las micobacterias presentan micobactinas y exoquelinas (Cocito *et al*, 1994; Kreeger, 1991).

Se ha descrito la ausencia de micobactinas en algunos aislamientos de *M. a. paratuberculosis*, esta observación es interesante ya que estas bacterias requieren de la micobactina únicamente para su crecimiento *in vitro*, por lo que algunos autores consideran que la dependencia a la micobactina no es determinante para la identificación del *M. a. paratuberculosis* (Cocito *et al*, 1994). Por su parte Lambrecht *et al*, mencionan que el crecimiento del *M. a. paratuberculosis in vitro*, en ausencia de micobactina no existe y que lo que sucede es que la micobacteria incorpora rápidamente a su pared a la micobactina, la cual puede utilizar posteriormente cuando un cultivo no está adicionado con ésta, resultando así en una aparente pérdida de la dependencia a la micobactina (Lambrecht *et al*, 1992).

La identificación de *M. a. paratuberculosis* a través de tinciones para baar, se basa en la unión de la fucsina con los ácidos en el interior de la micobacteria, así como a la unión con residuos de ácidos micólicos localizados en las capas externas de lípidos de la pared bacteriana, la cual impide la salida de la fucsina integrada durante la tinción (Barksdale *et al*, 1977, citado en Condrón *et al*, 1994). La importancia de una pared bacteriana intacta para mantener la ácido alcohol resistencia de las micobacterias ha sido demostrada por la pérdida de esta propiedad al extraer los lípidos de superficie con KOH y etanol o bien, interfiriendo la síntesis de ácidos micólicos con tratamientos con ácido isonicotínico (Barksdale *et al*, 1977, citado en Condrón *et al*, 1994).

#### 4. Patogenia

La patogénesis de la paratuberculosis no se ha esclarecido completamente, sin embargo a través del tiempo ha habido diversas propuestas de cómo este organismo provoca signos y lesiones. En el periodo de 1967-1969 Patterson *et al* (citado en Julian, 1975), sugieren que las células inflamatorias que infiltran la mucosa y submucosa traen como resultado aumento de la motilidad intestinal, tiempo de tránsito intestinal reducido, disminución en la absorción intestinal con la consecuente pérdida de proteínas. Por su parte, Merkal demostró que la diarrea es el resultado de una reacción antígeno-anticuerpo que tiene lugar en el tejido intestinal y que va acompañada de la liberación de histamina (Merkal, 1970 citado en Julian, 1975). En 1971, Merchant *et al* (citado en Julian, 1975) indica que los grupos de microorganismos que aparecen en la mucosa intestinal actúan como cuerpos extraños produciendo reacción inflamatoria. En 1973, Merkal (citado en Julian, 1975) sugiere que la inmunidad de tipo celular es la responsable de las reacciones febriles, la emaciación y la anemia que se presenta en algunos casos de paratuberculosis. Asimismo, demostró que la hipersensibilidad a la johnina puede producir fiebre y diarrea en becerros sensibilizados pasivamente con sangre completa de un bovino hipersensibilizado anteriormente con *M. a. paratuberculosis*. En 1974, Bellamy *et al* (citado en Julian, 1975) sugieren que el intestino puede resistir reacciones antígeno-anticuerpo bajo condiciones normales, es decir, cuando los canales linfáticos no están obstruidos y el sistema vascular es capaz de eliminar las enzimas lisosomales liberadas por

los neutrófilos y prevenir la formación de edema. Así el infiltrado inflamatorio y la linfangiectasia que se presentan en la paratuberculosis pueden invalidar estos mecanismos provocando un estado de hipersensibilidad inmunomediado (tipo III) a nivel intestinal.

Actualmente se reconoce que la infección con *M. a. paratuberculosis* ocurre por la vía oral, generalmente al ingerir los organismos a través de leche o pastura contaminada con heces. En el caso particular de los rumiantes jóvenes la enfermedad puede transmitirse de manera vertical al estar en contacto con el organismo a través de la ingestión de leche contaminada con heces de la madre. La transmisión *in utero* también se presenta, pero es de menor importancia que la horizontal (Collins, 1994d; Gay *et al*, 1992; Kreeger, 1991; Paliwal *et al*, 1985). Posterior a la infección oral el primer sitio en que los organismos pueden ser aislados y existen lesiones histológicas son los linfonódulos suprafaríngeos, mesentéricos y las tonsilas, de manera casi inmediata se desarrollarán lesiones intestinales y los organismos se estarán diseminando intermitentemente a través de las heces por largos periodos. Se sugiere que el *M. a. paratuberculosis* entra al intestino por medio de las células M en las cúpulas del íleon y que posteriormente el organismo pasa de éstas células M a los macrófagos subepiteliales donde se multiplica y es transportado a los linfonódulos (Momotani *et al*, 1988). Tanto en los linfonódulos como en el intestino se observarán lesiones caracterizadas por abundantes histiocitos, macrófagos epitelioides y áreas de necrosis lo que corresponderá a una enteritis y linfadenitis granulomatosa respectivamente. Estas lesiones son similares y siguen el mismo espectro que las causadas por la lepra en los humanos en la que se presenta el espectro tuberculoide con pocos organismos, abundantes células gigantes tipo Langhans, necrosis y fibrosis; por otro lado se presenta el espectro lepromatoso en el que se encuentran abundantes bacilos (multibacilar), pocas células gigantes, abundantes histiocitos y macrófagos epitelioides; la necrosis y fibrosis son mínimas (Cocito *et al*, 1994; Weigand-Valentin 1992). No está bien claro si estas diferencias histológicas en las lesiones corresponden a diferentes estados inmunológicos del rumiante, como se ha establecido en la lepra humana (Cocito *et al*, 1994). En el caso de los caprinos, experimentalmente se ha comprobado que la mayor respuesta inmune (evaluada a través de medición de anticuerpos y de prueba intradérmica), corresponde a los estadios subclínicos de la enfermedad y que cuando la enfermedad se manifiesta clínicamente ambas respuestas

humoral y celular disminuirán progresivamente (Paliwal *et al*, 1985). El papel del hierro en la patogénesis de la paratuberculosis es importante y como se mencionó anteriormente el *M. a. paratuberculosis* requiere el hierro para su crecimiento, por lo que la presencia de grandes cantidades de hierro en el interior de la célula así como la presencia del *M. a. paratuberculosis* también intracelular aporta una correlación positiva en las lesiones. La hipoferremia así como el incremento del hierro en los tejidos afectados es también una correlación positiva con la eliminación del *M. a. paratuberculosis* en las heces de los rumiantes infectados (Kreeger 1991).

### **5. Aspectos anatomopatológicos**

Existe poca correlación entre la gravedad del síndrome clínico y la severidad de las lesiones. Muchos animales que llegan clínicamente a estadios terminales de la enfermedad presentan lesiones macroscópicas y microscópicas tan discretas que podrían pasar desapercibidas (Barker *et al*, 1993; Berbanabé *et al*, 1991; Sherman *et al*, 1980); por otro lado, las lesiones severas pueden encontrarse en animales aparentemente saludables (Barker *et al*, 1993).

En los ovinos y caprinos la paratuberculosis se caracteriza por un desgaste crónico en el que se presenta pelo y lana quebradizos y edema submandibular debido a la hipoproteïnemia. Generalmente, la heces son normales, aunque pueden estar un poco más suaves y perder su forma característica, los cuadros de diarrea son raros, excepto en los estadios terminales donde se pueden presentar episodios intermitentes (Barker *et al*, 1993; Juste, 1994). En el estudio *posmortem* el intestino de los ovinos y caprinos está marcadamente engrosado, y los vasos linfáticos pueden dar la apariencia de pequeños nudos y cordones, correspondiendo estas estructuras a reacciones granulomatosas focales formadas por células epitelioides y linfocitos. En los caprinos y en algunos ovinos, se desarrollan focos de caseificación en la mucosa y submucosa intestinal, así como en la superficie peritoneal y los vasos linfáticos similares a los tuberculosos. Estos focos macroscópicamente son de color blanco y tienen de 1 a 4 mm de diámetro, y presentan escasa fibrosis rodeándolos. Los tubérculos en los linfonódulos de las cabras y venados se pueden mineralizar y ser lo suficientemente grandes para sustituir al tejido (Barker *et al*,

1993). En las cabras y borregos se ha observado que diversos linfonódulos del organismo, el hígado, el bazo y el pulmón pueden presentar focos granulomatosos, algunos de estos mineralizados. Asimismo, se han descrito en caprinos lesiones similares a las de la lepra lepromatosa, como la degeneración axonal de los nervios ciáticos y del plexo braquial y amiloidosis del glomérulo renal (Barker *et al*, 1993; Cocito *et al* 1994).

En los venados la paratuberculosis es clínicamente similar a la de los ovinos y caprinos, pero puede presentarse en animales menores a 1 año de edad (Barker *et al*, 1993). El cuadro *posmortem* es el de un animal emaciado con el pelo seco, áreas alopécicas, piel seca, atrofia serosa de la grasa y efusiones serosas en las cavidades corporales; en los casos más severos se puede observar edema subseroso en el intestino delgado y el mesenterio (Bourgeois, 1940; Vance 1961; Libke y Walton, 1975; Williams *et al*, 1983; Gumbrell, 1987, citados en Nyange 1990). La mucosa intestinal puede estar ligeramente engrosada (Barker *et al* 1993; Vance 1961 citado en Nyange 1990) y enrojecida, también se han descrito petequias y erosiones extensas de la mucosa (Vance 1961 citado en Nyange 1990). Los linfonódulos mesentéricos y los vasos linfáticos pueden presentar aumento de tamaño (Bourgeois, 1940; Vance, 1961 citados en Nyange 1990). Las lesiones microscópicas son inconsistentes posiblemente debido a la variación en las características de las cepas infectantes o bien a la susceptibilidad de cada individuo a la infección (Nyange 1990). Sin embargo, los cambios más notables son enteritis, linfadenitis y linfangitis granulomatosas (Libke y Walton 1975 citados en Nyange 1990), aunque también se han descrito necrosis y mineralización (Williams *et al*, 1983; Jorgensen *et al*, 1987 citados en Nyange 1990).

Con el objetivo de ampliar el conocimiento de las lesiones asociadas a los diferentes estados de la infección Pérez *et al* (1993) presentan 3 tipos de lesiones microscópicas en paratuberculosis ovina (Cuadro no. 1), en la lesión tipo I se incluyen las lesiones en las que se observan pequeños granulomas, localizados en el área interfolicular de la placa de Peyer, en los que no se observan micobacterias y sugieren que los ovinos que presentan este tipo de lesión son siempre negativos a la IDGA. En el tipo II se observan lesiones granulomatosas focales, localizadas tanto en la placa de Peyer como en la mucosa relacionada con la misma; algunos de los ovinos con este tipo de lesión serán positivos a la IDGA. En el tipo III las lesiones afectan a la mucosa no asociada a placas de Peyer y

existen 3 subtipos, subtipo IIIa son las lesiones que presentan pequeños granulomas en la mucosa no asociada a las placas de Peyer; algunos de los ovinos con este tipo de lesión serán positivos a la IDGA. Subtipo IIIb es una enteritis granulomatosa difusa conformada por abundantes macrófagos en la mucosa que provocan la alteración de ésta y poseen abundantes micobacterias; los ovinos que presentan este tipo de lesión se presume que serán claramente positivos a la IDGA. Subtipo IIIc conformadas por una enteritis granulomatosa difusa acompañada con infiltrado de abundantes linfocitos y células gigantes, se observan escasas micobacterias; los ovinos que presentan este tipo de lesión serán siempre negativos a IDGA. La clasificación de las lesiones bajo el criterio anteriormente descrito es similar substancialmente a otras clasificaciones realizadas anteriormente para lesiones intestinales provocadas por *M. a. paratuberculosis* (Stamp y Watt, 1954; Rajya y Singh, 1961; Reddy *et al*, 1984 citados en Clarke *et al*, 1994 y Clarke 1997).

**Cuadro no. 1:** Lesiones asociadas a los diferentes estados de la infección por *M. a. paratuberculosis*. (Pérez *et al*, 1993).

TIPO DE LESIÓN	DESCRIPCIÓN	BACILOS ÁCIDO ALCOHOL RESISTENTES	RESPUESTA A LA IDGA
I	Pequeños granulomas en área interfolicular de la placa de Peyer	No se observan	Negativa
II	Lesiones granulomatosas focales en la placa de Peyer y en la mucosa asociada con la misma	Se observan escasos bacilos en algunas lesiones	Algunos serán positivos
IIIa	Pequeños granulomas en mucosa no asociada a placa de Peyer	Se pueden observar en algunas lesiones	Algunos serán positivos
IIIb	Enteritis granulomatosa difusa	Abundantes	Claramente positivos
IIIc	Enteritis granulomatosa difusa, con abundantes linfocitos y células gigantes.	No se observan	Negativa

## 6. Aspectos inmunológicos

Después de la infección oral con *M. a. paratuberculosis*, el animal infectado puede eliminar al organismo del intestino o, después de una fase subclínica prolongada o una infección persistente puede convertirse en un animal hipersensible o tolerante (Gilmour *et*

*al.*, 1978 citado en Clarke, 1997) El espectro de inmunidad está relacionado con las manifestaciones de la enfermedad: resistencia, infección subclínica, control parcial con eliminación fecal intermitente de la micobacteria y enfermedad clínica con una pronunciada eliminación fecal (Bendixen, 1978 citado en Chiodini *et al*, 1992).

Inmunológicamente existen similitudes entre la paratuberculosis y la lepra humana, ya que ambas presentan formas hiperreactivas y anérgicas. En la forma hiperreactiva, la cual es característica de los estadios tempranos de la enfermedad, hay una respuesta celular muy marcada lo que limita la proliferación del *M. a. paratuberculosis*; este estadio semeja a la forma tuberculoide de la lepra humana y es en esta etapa temprana de la infección cuando las pruebas cutáneas con johnina o con tuberculina aviar y  $\gamma$ -interferón arrojan una respuesta positiva (Kreeger 1991) . La forma anérgica se presenta en la fase terminal de la paratuberculosis y semeja a la fase lepromatosa de la lepra humana (Bendixen *et al*, 1978, citado en Cocito *et al*, 1994; Chiodini *et al*, 1992; Elskén *et al*, 1985; Nyange 1990). Entre estas dos formas existe un estadio intermedio correspondiente al límite en la lepra humana, el cual está caracterizado por debilitamiento progresivo de la respuesta celular e incremento de los niveles sanguíneos de anticuerpos antimicobacterianos (Cocito *et al*, 1994).

#### 6.1. Inmunidad celular

En la paratuberculosis, igual que en otras micobacteriosis, la respuesta inmune celular está considerada como el principal mecanismo para controlar la infección. Los anticuerpos se consideran de poca ayuda en contra de la micobacteria intracelular y las altas concentraciones séricas de anticuerpos son a menudo observadas en la presencia de enfermedad clínica avanzada (Bendixen , 1978 citado en Clarke, 1997; Chiodini *et al.*, 1984). Una relación recíproca es reconocida entre la respuesta inmune humoral y la celular en los estadios subclínicos y clínicos de las enfermedades micobacterianas, incluyendo la paratuberculosis (Chiodini *et al.*, 1984; Chiodini *et al*, 1992; Lepper *et al.*, 1989).

La respuesta inmune celular se desarrolla relativamente temprano en la infección y, si es efectiva eliminará al organismo y evitará un estado de resistencia (Brotherson *et al.*, 1961, citado en Clarke,1997). Esta respuesta puede decaer a lo largo del prolongado periodo de una infección persistente, dando lugar a la proliferación micobacteriana y a la enfermedad asociada con lesiones multibacilares. Sin embargo, una respuesta inmune

celular excesiva, que puede desarrollarse en respuesta a una micobacteria resistente, promueve una inflamación constante asociada a un estado paucibacilar (Chiodini *et al*, 1984).

Los linfocitos T que presentan TCR  $\alpha\beta$  (incluyendo las subpoblaciones  $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ,  $CD4^+$  y  $CD8^+$ ) y TCR  $\gamma\delta$  son funcionalmente activos en las infecciones micobacterianas (Chávez Gris, 1993). En los ovinos con lesiones paucibacilares sugestivas de una intensa respuesta inmune celular, el intestino presenta una población notablemente mayor de linfocitos T  $CD4^+$  y un ligero aumento en los  $\gamma\delta$  (Little *et al*, 1996). En esta misma especie la subpoblación  $CD4^+$  es la responsable de la respuesta principal hacia un antígeno específico indicando una respuesta inmune celular activa (Little, Clarke y Burrels resultados no publicados, citados en Clarke 1997). Asimismo, se ha descrito que los casos del tipo paucibacilar tienden a presentar una respuesta linfocítica intensa hacia un antígeno específico. Esta respuesta es tanto periférica como a nivel intestinal y va acompañada de una manifestación intensa de un patrón Th1 en el que predominan los efectos de la IL-2 y del interferón  $\gamma$ ; contrario a lo anterior, en los casos del tipo multibacilar las respuestas linfocítica y la de las citocinas del patrón Th1 son débiles, favoreciendo la persistencia y proliferación micobacteriana (Little, Clarke y Burrels resultados no publicados, citados en Clarke 1997).

En algunas infecciones micobacterianas los linfocitos T  $CD8^+$  desempeñan un papel defensivo importante dentro de la respuesta inmune celular y tienden a acumularse en la periferia de las lesiones granulomatosas observadas en tuberculosis y lepra (Modlin *et al*, 1986, citado en Clarke 1997), sin embargo, este patrón de distribución no se ha observado en la paratuberculosis ovina (Little *et al*, 1996). Algunos estudios sugieren un papel más bien modulador o hasta supresivo de estos linfocitos en la lepra y paratuberculosis (Chiodini *et al*, 1992).

Los linfocitos T  $\gamma\delta$  se localizan en superficies epiteliales y pueden reaccionar con antígenos presentados por el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I y II así como con antígenos no presentados por estas moléculas (Boom *et al*, 1992 citado en Clarke 1997). Las funciones efectoras de estos linfocitos incluyen citotoxicidad hacia células infectadas con micobacterias, producción de interferón  $\gamma$ , IL-2 y factor de necrosis

tumoral  $\alpha$  (Munk *et al*, 1990 citado en Clarke 1997). En los ovinos esta población linfocitaria puede reaccionar con las proteínas de choque térmico(hsp), como la 60-kDa de *M. a. paratuberculosis* (Colston *et al*, 1994). Así también esta población linfocitaria se incrementa en el intestino de ovinos con lesiones tuberculoideas (Little *et al*, 1996). Se ha sugerido que estos linfocitos tienen una acción supresiva sobre la actividad de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> en la paratuberculosis así como en otras infecciones micobacterianas (Chiodini *et al*, 1992).

La función de las células asesinas naturales (NK), no ha sido estudiada en animales infectados con *M. a. paratuberculosis* (Clarke 1997).

## 6.2. Respuesta inmune humoral

La respuesta inmune humoral en la aratuberculosis parece mostrar una relación inversa con la respuesta inmune celular (Pérez *et al*, 1994b). La concentración de anticuerpos generalmente se incrementa posteriormente a la aparición de la respuesta inmune celular. Se presume que al decaer la respuesta inmune celular, las micobacterias intracelulares proliferan y en este momento los anticuerpos se incrementan. Esta observación tiene lugar muchos meses después de la infección, cuando las células afectadas han destruido y liberado al antígeno. Sin embargo, los mecanismos efectores de los anticuerpos son de poca utilidad en contra de las micobacterias intracelulares. Así, los casos clínicos con lesiones multibacilares tienden a presentar una concentración de anticuerpos elevada (Merkal *et al*, 1970 citado en Clarke 1997). En el suero de bovinos con infección crónica por *M. a. paratuberculosis* se encuentran IgG, IgM y escasas IgA (Abbas y Riemann, 1988 citado en Clarke 1997). A través del marcaje inmunohistológico de intestinos de bovinos se mostró incremento únicamente en IgG e IgM, la IgA no mostró incremento (Momotani *et al*, 1986). Algunos autores han sugerido que los anticuerpos locales provocan reacciones de hipersensibilidad inmediata y liberación de histamina, las cuales son causantes de las lesiones entéricas (Buergelt *et al*, 1978; Merkal *et al*, 1970 citado en Clarke 1997 y en Julian 1975). Actualmente, no existen estudios que sustenten lo anterior, ni que muestren alteraciones en los mastocitos intestinales (Clarke, 1997).

## 7. Diagnóstico

Dentro de un rebaño afectado por paratuberculosis los animales pueden ser clasificados como clínicamente enfermos, subclínicamente infectados e infectados. Es necesario distinguir entre la infección y la enfermedad; la infección no siempre resulta en enfermedad. Los animales subclínicamente infectados son el reto más grande para el diagnóstico, control y erradicación de la paratuberculosis.

El diagnóstico de paratuberculosis al igual que el de la mayoría de las enfermedades infecciosas puede realizarse detectando al organismo o bien detectando la respuesta del huésped hacia el organismo. En el caso particular de la paratuberculosis el diagnóstico cobra importancia debido a que se trata de una enfermedad cuyo desarrollo es tan lento que el periodo de incubación es medido en años en lugar de días (Collins, 1991; Collins 1994a).

Existen diversas técnicas de diagnóstico utilizadas para identificar al *M. a. paratuberculosis* las cuales se describen a continuación:

### 7.1. Estudio bacteriológico

7.1.1. Cultivo convencional. Ha sido durante casi un siglo la prueba de excelencia para el diagnóstico de la paratuberculosis, debido a que es una prueba altamente específica, detecta a los animales que están excretando la bacteria, se recobra al organismo y técnicamente es una prueba simple; desafortunadamente esta prueba presenta algunos inconvenientes como el hecho de que el resultado depende del desarrollo de la bacteria el cual es lento, la sensibilidad del diagnóstico depende de la habilidad del microbiólogo, baja sensibilidad diagnóstica cuando se realiza a partir de heces, ya que se detectarán únicamente los animales que estén excretando al microorganismo, otra desventaja es su alto costo, además de que puede requerir exámenes adicionales para la completa identificación del *M. a. paratuberculosis*. (Collins 1991; Collins, 1994a).

7.1.2. Cultivo radiométrico. Aunque no es utilizado ampliamente en los laboratorios de diagnóstico veterinario presenta ciertas ventajas sobre el cultivo convencional, como mayor sensibilidad, detección más rápida del *M. a. paratuberculosis* (14-28 días), al realizarse en botellas selladas se evita la deshidratación del medio, la detección del crecimiento está automatizada lo que le da una mayor objetividad. Desafortunadamente, se requiere de equipo especializado y costoso para el desarrollo de esta técnica, además de que

es necesario realizar exámenes complementarios y comparado con otras técnicas de diagnóstico, el cultivo radiométrico es lento (Collins *et al*, 1990; Collins 1991; Collins *et al*, 1994b).

## 7.2. Diagnóstico a través de la detección de la respuesta inmune celular.

7.2.1. Intradermorreacción. Entre las pruebas cuyo fundamento es la detección de la activación de la respuesta inmune celular de los animales infectados, la más utilizada ha sido la inoculación intradérmica de johnina o paratuberculina. Se trata de un derivado proteínico purificado (PPD), similar a la tuberculina que es capaz de provocar una reacción de hipersensibilidad del tipo IV en el punto de inoculación cuando el animal está previamente sensibilizado. Debido a sus características antigénicas similares se han utilizado indistintamente johnina o tuberculina aviar con resultados bastante aceptables en ambos casos, sin embargo, y aunque hay variación según las cepas utilizadas, la johnina suele ofrecer mayor sensibilidad. La técnica de aplicación es igual que la de las tuberculinas, obteniéndose los mejores resultados con la inoculación en el cuello y la lectura a las 48 horas, interpretándose como positivos los aumentos de espesor de la piel de 3 mm o mayores. En el ganado caprino esta prueba produce falsos resultados positivos, pero proporciona mejores resultados que algunas pruebas serológicas como la fijación de complemento (Juste, 1994).

7.2.2.  $\gamma$ -Interferón. Este ensayo fue desarrollado originalmente para el diagnóstico de tuberculosis bovina. Se utilizó por vez primera en paratuberculosis en 1983 por Wood *et al*. Posteriormente ha sufrido modificaciones que lo han transformado de un bioensayo a un ensayo basado en la técnica de ELISA utilizando anticuerpos monoclonales contra  $\gamma$ -interferón. El ensayo se realiza con sangre completa heparinizada, la cual se separa en 3 tubos. Al primer tubo se le añade PPD bovino, al segundo PPD aviar y el tercero es el testigo. Después de incubar las muestras se determina la producción de  $\gamma$ -interferón utilizando anticuerpos monoclonales marcados. La producción o liberación de  $\gamma$ -interferones es indicativa de que un animal está infectado con *M. a. paratuberculosis* (Collins *et al*, 1994b).

### 7.3. Diagnóstico a través de la detección de la respuesta inmune humoral

Otra opción en el diagnóstico de la paratuberculosis la ofrecen las pruebas serológicas ; éstas pruebas en general tienen la ventaja de ser baratas y que se pueden automatizar, aunque por otro lado tienen baja sensibilidad diagnóstica en los estadios subclínicos de las enfermedades.

7.3.1. Fijación de Complemento (FC). Es la prueba serológica más antigua para el diagnóstico de la paratuberculosis, y fue reconocida internacionalmente (Collins, 1991; Collins 1994a); sin embargo, se ha descrito que esta técnica presenta sensibilidad (36%) muy baja en bovinos (Hietala , 1992), pero buena especificidad (96%). En los caprinos se describe una sensibilidad del 77.5% y especificidad del 80% (Sherman *et al*, 1980).

7.3.2. Inmunodifusión en gel de agar (IDGA). Es una técnica simple, barata, fácil de desarrollar y que no requiere de equipo especializado (Herbert, 1974), es altamente específica (99-9%) (Hietala, 1992), además de que se puede utilizar la misma técnica en todos los rumiantes (Collins 1991; Collins, 1994a). Comparada con otras pruebas serológicas en bovinos, es lenta, poco confiable y su sensibilidad es baja (29%) (Collins *et al*, 1989; Collins, 1996; Hietala, 1992)). Sin embargo, en ovinos y caprinos se considera bastante adecuada (Juste 1994; Sherman *et al*, 1980; Vélez Hernández *et al*, 1995). Su especificidad estimada en ovinos es del 97% (Hilbink *et al*, 1994) y en caprinos del 100% y la sensibilidad del 73% (Milner *et al*, 1989); por su parte Sherman cita una sensibilidad del 77.5% y especificidad del 80% en caprinos (Sherman *et al*, 1980). Se ha descrito que su sensibilidad y especificidad es igual a la del aislamiento bacteriológico en el caso particular de los caprinos; teniendo la IDGA la ventaja de ser mucho más rápida y barata que el cultivo bacteriológico (Chiodini *et al*, 1984; Sherman *et al*, 1980). Asimismo, esta prueba relaciona directamente la positividad con la presencia de elevados números de bacilos en las lesiones, además de detectar a la mayoría de los enfermos, sospechosos (García Marín 1993) y subclínicos (García Marín, 1993; Sherman *et al*, 1989).

7.3.3. Inmunoensayo enzimático (ELISA). Esta técnica no había sido considerada como una prueba adecuada para el diagnóstico de la paratuberculosis hasta que en 1985, Yokomizo *et al*, demostraron que a través de la preabsorción de los sueros problema con antígenos micobacterianos heterólogos se incrementaba notablemente la especificidad de

esta prueba (Collins, 1990; Yokomizo *et al*, 1985). Dentro de las ventajas que presenta la técnica de ELISA se describe que es una técnica rápida, fácilmente reproducible y barata (Harlow *et al*, 1988; Sánchez-Vizcaíno, 1987), además los resultados son interpretados objetivamente y estos mismos pueden ser utilizados para predecir la progresión de la enfermedad, ya que la densidad óptica está directamente relacionada con la concentración de anticuerpos y éstos a su vez se relacionan directamente con el estadio de la infección y el desarrollo de la respuesta inmunológica (Collins, 1994b). Como todas las pruebas de diagnóstico ELISA presenta algunas desventajas ya que la técnica es específica para cada especie, aunque los sistemas comerciales desarrollados para bovinos se pueden adaptar fácilmente a caprinos y ovinos (Burnside *et al* 1994; Collins, 1996; Vélez Hernández *et al* 1995). Milner *et al* describen que en el diagnóstico de la paratuberculosis caprina *ante mortem* la técnica de ELISA es mucho más sensible (87%) y específica (100%) que la FC y la IDGA, ya que al realizar la preabsorción de los sueros con *M. phlei*, se reducen notablemente las reacciones cruzadas principalmente con el género *Actinomyces spp*, así como los falsos positivos (Milner *et al* 1989). Por su parte García Marín *et al* describen una especificidad del 75% y sensibilidad del 64% en un ELISA diseñado para el diagnóstico de paratuberculosis en caprinos, utilizando el antígeno PPA-3 (Allied Lab.)<sup>a</sup> y preabsorbiendo los sueros con *M. phlei* (García Marín *et al*, 1991).

#### 7.4. Estudio anatomopatológico

Dentro de las técnicas de diagnóstico se encuentran también el estudio de las lesiones a través de la anatomía patológica, la histopatología y la inmunohistoquímica. Aunque en los rumiantes afectados el bacilo puede observarse en el citoplasma de macrófagos y células gigantes presentes en las lesiones a través de la técnica de Ziehl Neelsen, en algunos casos es necesario una búsqueda exhaustiva para encontrar algún macrófago con bacilos ácido alcohol resistentes en su interior; en estos casos es recomendable utilizar la inmunoperoxidasa, o bien tinciones fluorescentes, especialmente en el ganado caprino donde esta técnica ha mostrado alta especificidad (Goudsward *et al* 1972; Paliwal *et al*, 1984). En la paratuberculosis caprina se ha descrito una relación adecuada entre el cultivo convencional a partir de fragmentos intestinales y la técnica de inmunohistoquímica, la cual da escasos falsos negativos (Navarro *et al*, 1991; Thorensen *et*

*al*, 1994). Esta técnica generalmente, se realiza *pos mortem* y ofrece una sensibilidad y especificidad altamente confiables (Cocito *et al*, 1994; Kreeger, 1991). También existe la alternativa de realizar el diagnóstico histopatológico *ante mortem* a través de una biopsia intestinal, sin embargo esta técnica debe quedar limitada a animales con alto valor productivo, genético o estimativo (Julian, 1975). Se recomienda que la biopsia sea tomada de la porción terminal del ileon (Hilbink *et al*, 1994; Julian, 1975). El diagnóstico de ésta debe ser tomado con reserva, ya que existe la posibilidad de que el área intestinal seleccionada para la biopsia no presente cambios patológicos compatibles con la enfermedad.

### 7.5. Técnicas moleculares

7.5.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica se basa en la síntesis enzimática de secuencias específicas de DNA, en la que se utilizan iniciadores complementarios a un segmento del DNA. Esta reacción requiere la enzima Taq polimerasa para añadir nucleótidos y lograr la síntesis del DNA, así como cambios de temperatura alternos que promuevan la separación de la doble hélice del DNA y la unión de los iniciadores complementarios (Sambrook *et al*, 1989). En la paratuberculosis caprina la PCR no es considerada una técnica de diagnóstico de uso común; sin embargo, se ha sugerido la utilización para la confirmación definitiva de la infección con *M. a. paratuberculosis*, diferenciándola de *M. a. avium*, cuando no es posible realizar el cultivo (Collins, 1996). Asimismo, recientemente se ha destacado la versatilidad de esta técnica que se puede realizar a partir de tejido intestinal, linfonódulos mesentéricos, fragmentos de tejido embebidos en parafina o bien de heces, obteniendo resultados comparables en sensibilidad y especificidad con los del cultivo bacteriológico (Guillou *et al*, 1994; Pérez *et al*, 1994a).

7.5.2. DNA print (huella de DNA). Esta técnica se ha utilizado como herramienta epidemiológica en la República Checa para determinar la prevalencia tanto de paratuberculosis como de la enfermedad de Crohn (Pavlik *et al*, 1994).

## **8. Control de la paratuberculosis**

Considerando que la paratuberculosis es una enfermedad crónica, para la que no existe en la actualidad una terapia curativa, el detectar y remover a los animales infectados, así como la prevención de la infección de los animales susceptibles son las claves en el control y erradicación de la paratuberculosis en un rebaño infectado (Chiodini *et al*, 1984; Julian, 1975). Existen diversas recomendaciones para interrumpir el ciclo de la enfermedad en un rebaño y prevenir la infección de los neonatos susceptibles. Sin embargo, la mayoría de estas recomendaciones fueron hechas pensando en rebaños bovinos lecheros, aunque también pueden resultar útiles en rebaños ovinos y caprinos. Su aplicación práctica en rebaños caprinos puede tropezar con inconvenientes debido a los diferentes sistemas de manejo, en este sentido, algunos resultados en rebaños de cabras han sido poco alentadores, por no conseguir eliminar la enfermedad en varios años (Juste, 1994). Aunque por otro lado, también se ha descrito la erradicación de paratuberculosis en rebaños caprinos utilizando prácticas de manejo (Gezon *et al*, 1988). Por lo anterior es importante considerar el tipo de explotación ya sea intensiva o extensiva, la especie animal y la prevalencia de paratuberculosis en el rebaño antes de adoptar un programa de control.

Así los métodos de control se pueden dividir en 2 grupos (García Marín, 1993):

- Aquellos que se basan en el intento de erradicar la infección mediante la eliminación de animales y prácticas de manejo.
- Prácticas de manejo y vacunación.

Las prácticas de manejo que pueden ser adoptadas en los hatos de rumiantes para el control de paratuberculosis, considerando las características y necesidades de cada una de las especies afectadas se describen a continuación: protección de los animales jóvenes de cualquier material que haya estado en contacto con los adultos, así como la separación de los recién nacidos de sus madres inmediatamente después del parto (Collins, 1994d; Chiodini *et al*, 1984; Gay *et al*, 1992; Julian 1975; Juste, 1994), alimentación con calostro pasteurizado que debe ser colectado de ubres limpias y desinfectadas (Collins, 1994; Chiodini *et al*, 1984; Gay *et al* 1994; Juste 1994), utilización de utensilios y materiales limpios para acondicionar y alimentar a la recría (Juste, 1994), utilización de pastos sin contaminar para los animales jóvenes o de reposición (Chiodini *et al* 1984; Julian, 1975;

Juste, 1994), eliminación de cualquier cubierta innecesaria que impida llegar al sol a las áreas ocupadas por los animales (Juste, 1994), separación inmediata de cualquier animal con signología digestiva hasta que se establezca un diagnóstico (Collins, 1994a, Gay *et al.*, 1992; Julian, 1975), envío al rastro de toda la descendencia de los animales que manifiesten diarrea crónica (Collins, 1994; Chiodini *et al.*, 1984; Julian, 1975), realización de cultivos de heces cada seis meses de todos los animales mayores de un año y sacrificio de todos los positivos (Collins, 1994a; Chiodini *et al.*, 1984; Gay *et al.*, 1992; Juste, 1994; Wren, 1993), las heces deben desecharse en un área determinada que sea inaccesible para los animales (Chiodini *et al.*, 1984).

A partir de 1936 en Canadá se establece un programa de control de paratuberculosis de carácter voluntario. Este programa proponía el sacrificio de los bovinos con manifestaciones clínicas de paratuberculosis, así como de los positivos al PPD aviar; asimismo, sugería la limpieza y desinfección de los locales. Este programa no imponía restricciones como cuarentenar, y los animales que eran negativos a la intradermorreacción podían ser separados del hato o bien vendidos. Algunos de los hatos que adoptaron este programa de control lograron erradicar la enfermedad (Julian, 1975).

En 1984 Chiodini *et al.*, propone un programa de control para paratuberculosis en bovinos, dicho programa considera las prácticas de manejo descritas anteriormente, enfatizando la importancia de evitar que los becerros se contaminen con heces de los bovinos adultos. Asimismo, este programa sugiere que el hato debe subdividirse en 2 grupos, el primero formado por los adultos y el segundo por los bovinos jóvenes los cuales deben permanecer estrictamente separados. Los bovinos jóvenes se integrarán al grupo de bovinos adultos al alcanzar su edad reproductiva.

En 1988 Gezon *et al.*, diseñaron un estricto programa de control de paratuberculosis para un rebaño caprino, dicho programa incluía prácticas de manejo, pesaje mensual de las cabras, diagnóstico serológico cada cuatro meses a través de IDGA, cultivo de heces semianual, estudio anatomopatológico de los caprinos seropositivos que morían o eran sacrificados, así como la separación y eliminación de los caprinos que resultaban positivos a alguna técnica de diagnóstico. Siguiendo este programa durante 7 años se logró un rebaño libre de paratuberculosis (Gezon *et al.*, 1988).

En 1991 Collins propone el programa de control de paratuberculosis para bovinos “Diagnóstico y Eliminación” (Collins, 1991)- En este programa se ofrecen diversas estrategias para el control de la enfermedad; dichas estrategias comprenden en general la realización del ELISA y cultivo de heces de todos los bovinos mayores de 20 meses de edad y el desecho inmediato de los positivos y sus crías. Posteriormente, este autor propone un enfoque clínico para el control de la paratuberculosis (Collins, 1994c). De este modo es fundamental considerar 3 preceptos:

- La paratuberculosis como un problema de hato, el cual debe ser controlado para mejorar la productividad del mismo.
- La paratuberculosis es una enfermedad infecciosa que con el tiempo irá incrementándose dentro del hato.
- La paratuberculosis puede ser controlada. Una vez comprendidos y aceptados estos preceptos se procederá a determinar el grado de infección dentro del hato a través del cultivo de heces o de pruebas serológicas como el ELISA; se evaluarán y mejorarán las prácticas de manejo y por último se diseñará un programa de control que tienda a la erradicación de la paratuberculosis, de acuerdo a la capacidad económica de cada hato.

Merkal proponía tres condiciones para considerar controlada la paratuberculosis en un rebaño (Chiodini *et al*, 1984; Juste, 1994).

- Que no haya habido ningún caso clínico en los últimos tres años.
- Que los resultados de tres cultivos de heces consecutivos sean negativos en la totalidad del rebaño.
- Que los resultados de la prueba intradérmica con johnina sean negativos dos veces consecutivas en la totalidad de los animales mayores de seis meses de edad.

Posteriormente, añadía a éstas la negatividad de todos los animales en la prueba de ELISA (Juste, 1994).

En general, todas las prácticas y controles mantenidos durante 5 a 7 años (Chiodini *et al*, 1984), permitirán asegurar el control de la enfermedad, y aunque no quede excluida la posibilidad de que reaparezca algún caso, permitirán minimizar las pérdidas que de otra forma serían insoportables (Juste, 1994).

En el caso de los caprinos y ovinos donde la información sobre las técnicas de diagnóstico tanto serológicas como la hipersensibilidad es limitada (Elsken *et al*, 1985; Juste *et al*, 1993), el costo del diagnóstico por individuo es elevado, y de igual forma la eliminación de los animales positivos es incosteable, se hace necesario el buscar otras alternativas para el control de la paratuberculosis en un rebaño afectado, así la vacunación se presenta como una alternativa económica que no exige una inversión importante al inicio, y es de mayor utilidad en rebaños donde la prevalencia de paratuberculosis es elevada (Cranwell, 1993; Juste *et al*, 1993). Aunque el beneficio de la vacunación también se ha hecho evidente en los bovinos (Kalis *et al*, 1994; Körmendy, 1994).

Diversas cepas de *M. a. paratuberculosis* han sido utilizadas para prevenir la diseminación de la infección en los rebaños. Las vacunas han sido preparadas con cepas virulentas como la 2E, 3&5 (García Marín, 1993) y 316F (García Marín, 1993; Molina *et al*, 1996), atenuadas e inactivadas (García Marín, 1993).

La primera vacunación contra la paratuberculosis fue desarrollada en 1926 por Vallée y Rinjard; se trataba de una suspensión de una cepa apatógena embebida en parafina líquida a la que añadían aceite<sup>4</sup> de oliva y polvo de piedra pómez (Cocito *et al*, 1994; Juste, 1994; Saxegaard *et al*, 1985). El principio de este método era el establecimiento de un estado de sensibilidad el cual protegía al animal mientras la bacteria persistiera en el nódulo fibrocáceo que se formaba en el sitio de vacunación. La seguridad de este método fue enfatizada por Vallée y otros autores en 1934, y en 1945 Doyle lo confirmó experimentalmente, con estudios realizados en cabras, siendo éstos últimos los únicos estudios experimentales de vacunación sistemática contra paratuberculosis en cabras (Saxegaard *et al*, 1985). Esta vacuna con ligeras modificaciones se sigue utilizando en Gran Bretaña, Francia, Dinamarca y otros países. En México se han realizado ensayos con bacterinas aplicadas vía subcutánea y oral en rebaños ovinos infectados naturalmente y en ambos casos no fue posible determinar si dichas bacterias confieren protección adecuada contra una posible infección (Hernández, 1991; Oviedo, 1991).

Los estudios experimentales y las pruebas de campo controladas mediante cultivos de heces han demostrado que, si bien esta vacuna no es capaz de prevenir todos los casos de infección, ésta se produce en menor grado, disminuyendo los eliminadores de bacterias así como la cantidad de bacterias eliminadas a través de las heces (Cocito *et al*, 1994; Chiodini *et al*, 1984; Gay *et al*, 1992; Gilmour *et al*, 1976; Merkal, 1984), y los casos clínicos llegan a desaparecer de los rebaños al cabo de un tiempo (Juste, 1994), que en Gran Bretaña se ha estimado en una media de 4 años (García Marín, 1993).

Con cualquier tipo de vacuna, la inmunización se realiza por vía subcutánea, en las tablas del cuello o en la babilla y es aplicada en animales menores de un mes de edad. En la mayoría de los casos se forma un nódulo de hasta 30 cm de diámetro que va aumentando de tamaño durante varias semanas y disminuye posteriormente. En algunos sitios se tiene la creencia de que el grado de protección está directamente relacionado con la presencia y el tamaño del granuloma (Stuart, 1989 citado en Gay *et al*, 1992) y se recomienda la revacunación si el granuloma no aparece (Stuart, 1965 citado en Gay *et al*, 1992). Asimismo, se observa una elevación de la temperatura que puede durar varios días; al mismo tiempo comienza una respuesta inmune que provoca títulos muy elevados y la aparición de hipersensibilidad retardada en la prueba intradérmica (Juste, 1994).

Se considera que la vacunación es más efectiva en ovinos y caprinos (Gay *et al*, 1992), en los que la edad adecuada para su aplicación es de 4 a 6 meses. Una sola aplicación de la vacuna, la eliminación de los enfermos rápidamente y una buena alimentación darán como resultado la disminución notable de los casos clínicos de paratuberculosis dentro del rebaño caprino, ya que se ha estimado que la vacuna reduce la presencia de animales enfermos entre un 90 y 100%, independientemente del grado de infección del rebaño (García Marín, 1993).

Desafortunadamente la vacunación presenta algunas limitantes, debido a que en todas las especies afectadas interfiere con las pruebas serológicas (Collins, 1994a). En el caso de los ovinos y caprinos 200 días posteriores a la vacunación la positividad serológica irá disminuyendo; a los 2 años posvacunación los valores son inferiores al 20% y a los 3 años posvacunación los valores son inferiores al 2-4% (García Marín, 1993). Por otro lado, los valores del ELISA son elevados durante varios años. El PPD será siempre positivo en

los caprinos vacunados, siendo esta positividad marcada hacia el PPD aviar (García Marín, 1993). En los bovinos la seropositividad detectada con FC e IDGA, se incrementa durante los primeros 3 años, para declinar posteriormente (Körmendy, 1994). Dentro de un rebaño infectado con *M. a. paratuberculosis*, los animales vacunados no deben ser considerados como libres de la enfermedad, ya que eventualmente algunos pueden infectarse y estar eliminando al organismo a través de las heces de forma intermitente (Chiodini *et al*, 1984; Gilmour *et al*, 1976).

Es importante considerar que la vacunación como medida de control debe utilizarse con reserva en los países donde se haya implantado un programa de erradicación de tuberculosis (Saxegaard *et al*, 1985) ya que la inoculación de la micobacteria completa o de un extracto crudo induce hipersensibilidad retardada hacia las tuberculinas bovina y aviar, así como positividad a pruebas de diagnóstico serológicas (Cocito *et al*, 1994). Se ha sugerido utilizar la vacuna únicamente en rebaños certificados como libres de tuberculosis, donde el riesgo de que ésta aparezca es bajo (Saxegaard *et al*, 1985).

Con el fin de evitar la limitación de la vacunación debido a que anula la utilización de las técnicas de diagnóstico se ha sugerido utilizar proteínas diferentes en la vacunación y en las pruebas de diagnóstico que detectan las respuestas inmunes tanto humoral como celular (Cocito *et al*, 1994).

## **9. Paratuberculosis y enfermedad de Crohn**

La enfermedad de Crohn fue descrita en 1960 como una enfermedad que afecta de forma segmentaria el intestino delgado de los humanos y fue confundida en sus inicios con la colitis ulcerativa (Chiodini, 1989). La enfermedad de Crohn se caracteriza por la inflamación del intestino delgado aunque, también afecta al intestino grueso incluyendo el ano, al tracto digestivo alto, los músculos, los huesos y la piel (Kozarek, 1987). Su etiología es desconocida, sin embargo, se ha sugerido como posible agente etiológico de ésta la combinación de factores genéticos, ambientales, inmunológicos y microbiológicos. De igual forma que en algunas lesiones del tipo paucibacilar en la paratuberculosis (Condrón *et al*, 1994) en los rumiantes, los baar no se observan con facilidad en las lesiones causadas por la enfermedad de Crohn (Clarke, 1997). Sin embargo, se han detectado a través de

microscopia electrónica esferoplastos deficientes en su pared celular en algunas biopsias de pacientes afectados por la enfermedad de Crohn (Chiodini, 1989).

La paratuberculosis y la enfermedad de Crohn coinciden en que ambas afectan adultos jóvenes, provocan lesiones granulomatosas en el íleon terminal y causan la signología clínica típica de una enteritis y pérdida de peso. En la actualidad la asociación tanto física como causal del *M. a. paratuberculosis* con las lesiones intestinales observadas en la enfermedad de Crohn provoca opiniones diversas, ya que si esta asociación es cierta la paratuberculosis sería considerada una zoonosis, y las implicaciones de este fenómeno serían considerables (Clarke, 1997). Así es importante considerar que en la actualidad no existe una terapia curativa para la paratuberculosis, por lo que se hace necesario el estudio y establecimiento en México, de técnicas de diagnóstico confiables y rápidas para detectar y remover a los animales infectados y de este modo controlar la paratuberculosis dentro de los rebaños afectados.

## OBJETIVOS

1. Comparar la eficiencia entre diferentes técnicas aplicadas en el diagnóstico de Paratuberculosis caprina.
  - 1.1. Comparar la inmunodifusión en gel de agar IDGA y el inmunoensayo enzimático ELISA, en el diagnóstico de la paratuberculosis caprina.
  - 1.2. Establecer la relación entre la positividad serológica y la presencia de lesiones.
  - 1.3. Identificar la mortalidad en los rebaños en estudio, asociada con infecciones por *M. avium* subsp. *paratuberculosis*.
  - 1.4. Comparar la eficiencia en la detección de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en heces de cabras positivas serológicamente comparando el cultivo convencional con el radiométrico.
  
2. Determinar la variación de las prevalencias obtenidas en cada una de las tomas de muestras de cada rebaño al adoptar el programa “Probar y Eliminar”, con base en la prueba de IDGA.

## MATERIAL Y MÉTODOS

El presente estudio se realizó en 3 rebaños caprinos, cada uno de ellos cuenta con una población estimada en 100 animales aproximadamente mayores de 1.5 años. En los 3 rebaños existen antecedentes clínicos, bacteriológicos, serológicos y anatomopatológicos de paratuberculosis. Los rebaños estudiados se encuentran localizados geográficamente como se indica a continuación: rebaño I en el área de Topilejo, D.F., las actividades principales de este rebaño son la docencia e investigación; las prácticas de higiene y manejo son limitadas. El rebaño II está localizado en Tepetzotlán, Edo. de México, sus actividades principales son la docencia, investigación y producción de quesos; las prácticas de higiene y manejo son estrictas y cuentan con un área de aislamiento para los caprinos que presenten alguna enfermedad contagiosa. El rebaño III se encuentra en Chalco, Edo. de México, sus actividades principales son la docencia, desarrollo de programas de transplante de embriones y la venta de caprinos; las prácticas de higiene y manejo son estrictas. De estos tres Centros de Producción se obtuvieron las muestras necesarias para el desarrollo del presente estudio.

### 1. Estudio serológico

En los 3 rebaños se tomaron muestras de sangre cada 3 meses de todos los caprinos mayores de 1.5 años de edad. Se obtuvieron aproximadamente 5 ml de sangre en tubos vacutainer sin anticoagulante. Estas muestras se identificaron con el nombre del rebaño del que procede cada caprino, así como con su número de registro y se procedió a transportarlas al Departamento de Microbiología e Inmunología de la F.M.V.Z., U.N.A.M. Una vez en el laboratorio se separó el suero y se hicieron alicuotas de éste para la realización de las pruebas serológicas de inmunodifusión en gel de agar (I.D.G.A.) e inmunoensayo enzimático (E.L.I.S.A.).

1.1. Inmunodifusión en gel de agar (IDGA).- Se utilizaron placas de agarosa (Anexo no. 1) en las que se enfrentaron los sueros obtenidos con el antígeno protoplásmico purificado, PPA-3 de *M. a. paratuberculosis* (Allied Lab)<sup>A</sup>, utilizando como testigo positivo.

sueros obtenidos de caprinos con lesiones compatibles con Paratuberculosis y aislamiento bacteriológico. Las lecturas se realizaron a las 24 y 48 horas, (Fig. 1).

1.2. Inmunoensayo enzimático (ELISA).- Se realizó una adaptación del protocolo del Servicio de Investigación y Mejora Agraria (S.I.M.A.) del Gobierno Vasco, España, utilizando el antígeno PPA-3 de *M. a. paratuberculosis* (Allied Lab). Los reactivos y su preparación se describen en el Anexo no. 2. Para el desarrollo de esta técnica, se realizó previamente la adsorción del antígeno a los pocillos de la placa, depositándose 100µl de antígeno (0.04 mg/ml de tampón carbonato) en cada pocillo siendo mantenida la placa a 4°C durante toda la noche. Posteriormente se lavaron las placas con solución salina (Anexo no. 2), conservándose a -20°C hasta la realización de la prueba. Previo al ensayo, los sueros sospechosos fueron absorbidos con una suspensión de *M. phlei* (Anexo no. 2) a la proporción de 1:1, dejándose en agitación constante a temperatura ambiente durante 2 horas, o bien, en refrigeración toda la noche. A continuación los sueros fueron centrifugados a 2 000 r.p.m. durante 10 minutos. Se depositaron 100 µl del suero sospechoso adsorbido, en los pocillos de las placas fijadas con una dilución 1:100 de PBS-TG. Cada una de las muestras sospechosas fueron depositadas por duplicado en las placas. En cada una de las placas se colocó un testigo positivo, adsorbido con *M. phlei*, de la misma manera que los sueros problema. El testigo positivo a utilizar procedió de un caprino afectado por paratuberculosis, positivo al cultivo bacteriológico. Las placas se incubaron en una cámara húmeda a temperatura ambiente durante 2 horas y, posteriormente, se lavaron con PBS-TG 3 veces. Se añadió en cada uno de los pocillos, 100 µl de suero de conejo anti-IgG de cabra marcado con peroxidasa de rábano a una dilución de 1:4500 y las placas se incubaron durante 2 horas en cámara húmeda a temperatura ambiente. Al final de este periodo, las placas se lavaron 3 veces con la solución de lavado, se añadieron 100 µl del sustrato ABTS, y se incubaron durante 15 a 20 minutos en agitación constante y en oscuridad. Se procedió inmediatamente a su lectura a través de un espectrofotómetro, Biorad reader<sup>B</sup>, empleándose un filtro de 450 nm, (Fig. 2).

Para determinar el punto de corte se obtuvo el cociente de la densidad óptica del suero sospechoso entre la densidad óptica del testigo positivo; los cocientes mayores o iguales a 0.800 fueron considerados positivos.

## **2. Estudio Anatomopatológico**

Se realizaron necropsias de la mortalidad sospechosa de paratuberculosis de los tres rebaños caprinos estudiados. Una vez realizadas éstas se eligieron fragmentos de válvula ileocecal (VIC), íleon, yeyuno y linfonódulos mesentéricos cercanos a la porción que fue tomada para el cultivo bacteriológico con el fin de obtener una relación adecuada. Estas secciones de tejido se fijaron en formalina amortiguada al 10%, se incluyeron en parafina y se tiñeron con la técnica de rutina, hematoxilina y eosina (H-E), así como la técnica histoquímica de Ziehl-Neelsen (Z-N) para hacer evidente la presencia de bacilos ácido alcohol resistentes (baar) en las lesiones. Se determinó la cantidad de baar, separando en lesiones con escasas, moderadas y abundantes baar, a través del conteo de los baar en un campo del microscopio observándolo a 40X, así las lesiones que presentaron menos de 10 baar fueron consideradas como lesiones con escasos baar, las que presentaron más de 10 y hasta 40 baar como moderadas y más de 40 baar como abundantes.

Asimismo, las lesiones observadas microscópicamente se clasificaron en los tipos I, II y III atendiendo al estudio realizado por Pérez *et al*, 1992.

## **3. Aislamiento Bacteriológico**

Se realizó la inocuación para el aislamiento de *M. a. paratuberculosis*, a partir de fragmentos de yeyuno, íleon, válvula ileocecal, linfonódulo mesentérico y heces, empleando los siguientes métodos:

3.1. Método convencional.- el medio utilizado fue Löwenstein-Jensen (Anexo no. 3) con y sin micobactina, con glicerina y sin piruvato, adicionado con antibióticos, y se revisó a las 4, 8, 12 y 16 semanas (Chávez 1993; Juste 1994).

3.2. Aislamiento previa tripsinización de los tejidos.- el medio a utilizar fue también el de Löwenstein-Jensen (Anexo no. 3), bajo las mismas características descritas

anteriormente. La tripsinización de los tejidos se hizo de acuerdo a la adaptación del método de Rathnamohan *et al*, descrita por Chávez Gris (Chávez Gris 1993).

3.3. Cultivo radiométrico.- se realizó a partir de heces. Se utilizaron botellas que contienen ácido palmítico marcado con  $C^{14}$  y un medio compuesto por una mezcla de antibióticos (ácido nalidíxico, vancomicina, anfotericina B) y yema de huevo (Bactec 12B). Las lecturas se realizaron semanalmente hasta la 8ª semana a través del lector ( Bactec 460 B). Posteriormente, se procedió a la realización de una nueva siembra del cultivo en agar sangre a partir de las botellas que fueron detectadas como positivas, esto con el fin de evitar los falsos positivos por contaminación . Asimismo, se realizaron frotis del cultivo obtenido, los cuales fueron teñidos con Z-N para hacer evidentes a las micobacterias. Esta técnica fue realizada en el laboratorio de Ciencias Patobiológicas de la Universidad de Wisconsin, Madison.

#### **4. Aislamiento y Eliminación**

En los tres rebaños se aislaron y eliminaron los caprinos serológicamente positivos por la técnica de IDGA. Asimismo, se identificaron los nuevos casos de caprinos seropositivos, que fueron apareciendo durante este período y se determinó la densidad de incidencia (Hennekens, 1987) , así como la prevalencia de paratuberculosis en cada uno de los rebaños a través de las tomas de muestras realizadas.

#### **5. Análisis Estadístico.**

Se determinaron los valores predictivos positivos y negativos (VPP, VPN) de la IDGA y del ELISA a través del Teorema de Bayes (Molina *et al*, 1990). Asimismo, se calculó la variabilidad de las prevalencias estimadas a partir de la IDGA y el ELISA, obtenidas durante las tomas de muestra en los 3 rebaños, a través del estadístico  $\chi^2$  (Daniel, 1980).

## RESULTADOS

### 1. Estudio serológico

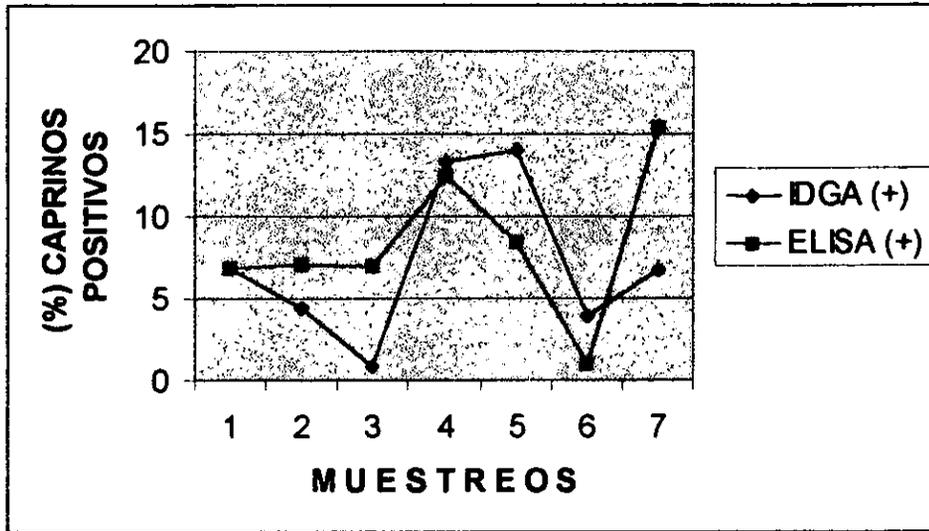
De los muestreos realizados, se obtuvieron los siguientes resultados serológicos los cuales se describen en forma individual para cada uno de los rebaños y separando cada una de las tomas de muestras.

En el rebaño I se realizaron 7 muestreos serológicos de caprinos mayores de 18 meses de edad. Las identificaciones de los caprinos seropositivos en cada una de las tomas de muestras se citan en el Cuadro no. 2.1. La primer toma de muestras de sueros se realizó en septiembre de 1995 colectándose 116 sueros de los que 8 fueron positivos por IDGA, otros 8 positivos por ELISA, representando el 6.89% para ambas pruebas (Fig. 3); 4 sueros fueron positivos en ambas técnicas, generando una concordancia en el diagnóstico del 25%. La segunda toma de muestras se realizó en enero de 1996, colectándose 113 sueros de los que 5 resultaron IDGA positivos, definiendo el 4.42%; 8 positivos por ELISA, significando el 7.07% (Fig. 3); y 4 sueros positivos por ambas técnicas, que generaron una concordancia en el diagnóstico del 30.76%. La tercer toma de muestras se realizó en marzo de 1996, colectándose 115 sueros de los que un suero fue positivo a IDGA, significando el 0.87% del rebaño; 8 ELISA positivos, mostrando el 6.95% (Fig. 3); y 1 positivo en ambas técnicas lo que expresa una concordancia en el diagnóstico del 11.11%. La cuarta toma de muestras se realizó en junio de 1996, colectándose 113 sueros de los que se obtuvieron 15 positivos por IDGA, representando el 13.27%; 8 positivos a ELISA, indicando el 12.38% (Fig. 3); y 5 positivos en ambas técnicas, lo que señala una concordancia en el diagnóstico del 21.17%. La quinta toma de muestras se realizó en septiembre de 1996, se colectaron 107 sueros y se obtuvieron 15 IDGA positivos, constituyendo el 14.01%; 9 positivos por ELISA, señalando el 8.41% (Fig. 3); y 4 sueros positivos a ambas técnicas que generaron una coincidencia en el diagnóstico del 16.6%. La sexta toma de muestras se realizó en enero de 1997, se colectaron 103 sueros y se obtuvieron 4 positivos a IDGA, mientras que 4 fueron positivos por ELISA, generando el mismo porcentaje 3.88%, (Fig. 3) y un suero positivo en ambas técnicas, señalando una

coincidencia en el diagnóstico del 12.95% . La última toma de muestras de este rebaño se realizó en marzo de 1997, se colectaron 104 sueros y se obtuvieron 7 positivos por IDGA, representando el 6.73%; 16 ELISA positivos, que constituyen el 15.38% (Fig. 3.); y 4 sueros positivos en ambas técnicas, que expresan una concordancia en el diagnóstico del 17.39%.

**Cuadro no. 2.1. :** Identificaciones de los caprinos positivos a IDGA y ELISA en cada uno de los muestreos realizados en el rebaño I.

FECHA DEL MUESTREO	ANIMALES POR MUESTREO.	CAPRINOS (+) IDGA. NO. IDENTIFICAC.	CAPRINOS (+) ELISA NO. IDENTIFICAC.	PREVALENCIA IDGA/ELISA (%)
Septiembre 1995.	116 caprinos	87, 143, 191, 195, S-01, S-04, S-06, S-23.	75, 126, 143, 155, 191, S-04, S-06, S-23.	6.89 / 6.89.
Enero 1996.	115 caprinos	75, 126, 134, 155, S-01.	75, 126, 148, 155, 186, S-01, S-09, S-26.	4.42 / 7.07
Marzo 1996.	115 caprinos	S-26.	75, 113, 119, 125, 131, 154, 189, S-26	0.87 / 6.95
Junio 1996.	113 caprinos	66, 67, 104, 113, 126, 129, 159, 166, 186, 189, 208, 212, 647, S-18, S-26	48, 123, 138, 148, 159, 162, 166, 170, 186, 189, 207, 209, S-18, S-26.	13.27 / 12.38
Septiembre 1996.	107 caprinos	48, 112, 126, 136, 138, 148, 162, 200, 212, 231, 235, 295, 280, S-10, S-25.	48, 123, 138, 162, 170, 209, 212, 647, S-17.	14.01 / 8.41
Enero 1997.	103 caprinos	48, 199, 231, S-22.	48, 232, 267 Aldo.	3.88 / 0.97
Marzo 1997.	104 caprinos	48, 131, 162, 231, 259, 267, S-02.	48, 112, 134, 136, 138, 141, 162, 200, 231, 232, 1456, S-02, S-21, S-30, Aldo, Chori.	6.73 / 15.38



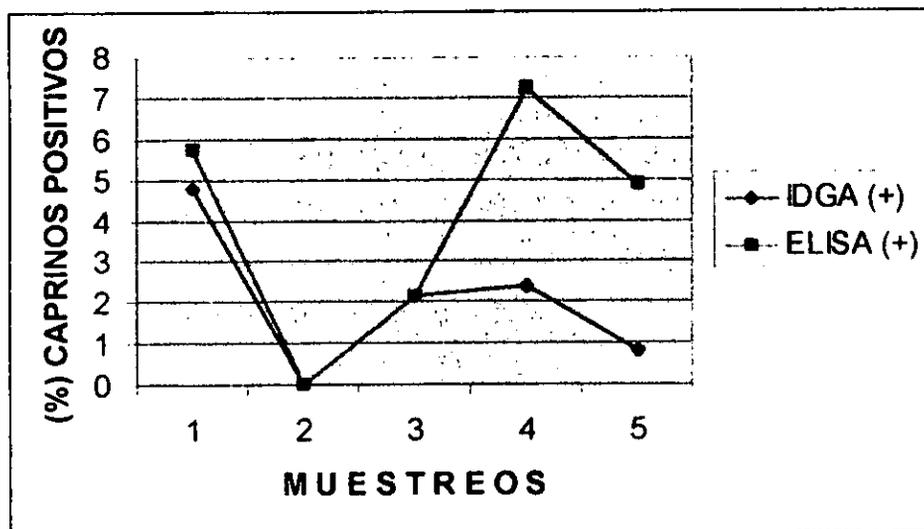
**Figura 3:** Comparación del porcentaje de caprinos positivos paratuberculosis detectados por IDGA y ELISA en el rebaño I.

En el rebaño II se realizaron 5 muestreos serológicos de caprinos mayores de 18 meses de edad. Las identificaciones de los caprinos seropositivos en cada una de las tomas de muestra se citan en el Cuadro no. 2.2. La primer toma de muestras se realizó en febrero de 1996, colectándose 104 sueros de los que 5 fueron positivos a IDGA, definiendo el 4.8%; 6 positivos por ELISA, representando el 5.76% (Fig. 4); y un suero positivo en ambas técnicas, generando una concordancia en el diagnóstico del 9.09%. La segunda toma de muestras se realizó en julio de 1996, colectándose 96 sueros resultando todos negativos a IDGA y ELISA (Fig. 4). La tercer toma de muestras se realizó en octubre de 1996, colectándose 92 sueros de los que 2 fueron positivos por IDGA, mientras que otros 2 fueron positivos a ELISA, representando el 2.17% para ambas pruebas (Fig. 4); ningún suero resultó positivo a ambas técnicas. La cuarta toma de muestras se realizó en enero de 1997, se colectaron 83 sueros de los que 2 fueron positivos por IDGA, significando el 2.4%; 6 ELISA positivos, lo que constituye el 7.22% (Fig. 4); y 2 positivos a ambas técnicas lo que expresa una concordancia en el diagnóstico del 25%. La quinta toma de muestras se realizó en abril de 1997, colectándose 2 sueros de los que un suero fue positivo por IDGA,

indicando el 0.82%; 4 positivos por ELISA, señalando el 4.87% del rebaño (Fig. 4); ningún suero fue positivo a ambas técnicas.

**Cuadro no. 2.2.:** Identificaciones de los caprinos positivos a IDGA y ELISA en cada uno de los muestreos realizados en el rebaño II.

FECHA DEL MUESTREO	NO. DE ANIMALES POR MUESTREO	CAPRINOS (+) IDGA NO. IDENTIFICACIÓN	CAPRINOS (+) ELISA NO. IDENTIFICACIÓN	PREVALENCIA IDGA / ELISA (%)
Febrero 1996.	104 caprinos	31, 33, 511, 705, 725.	XXI, 4, 31, 518, 693, 1455.	4.8 / 5.76
Julio 1996.	96 caprinos	Todos son negativos.	Todos son negativos.	0 / 0
Octubre 1996.	92 caprinos	655, 729.	636, 679.	2.17 / 2.17
Enero 1997.	83 caprinos	655, 729.	567, 631, 646, 655, 658, 729.	2.4 / 7.22
Abril 1997.	82 caprinos	724	579, 631, 636, 646.	0.82 / 4.87

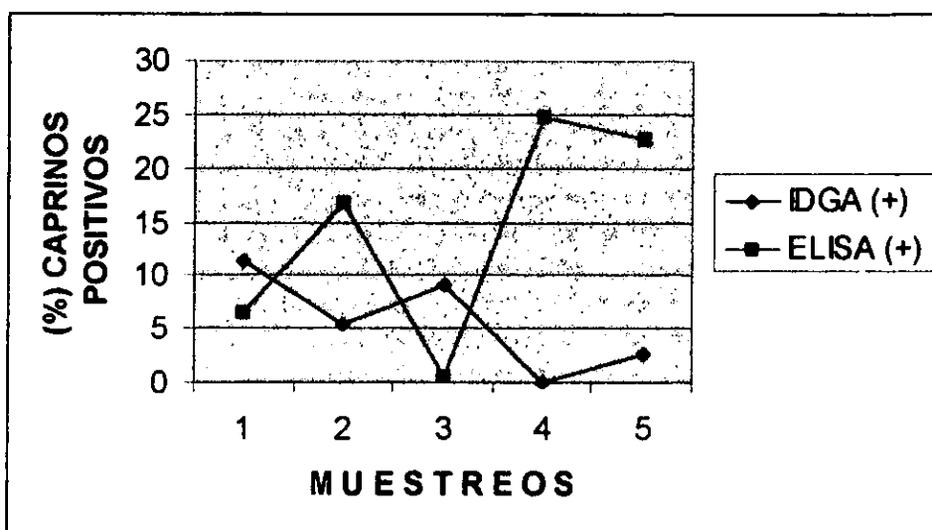


**Figura 4:** Comparación del porcentaje de caprinos positivos a paratuberculosis detectados por IDGA y ELISA en el rebaño II.

En el rebaño III se realizaron 5 muestreos serológicos de caprinos mayores de 18 meses de edad. Las identificaciones de los caprinos seropositivos en cada una de las tomas de muestras se citan en el Cuadro no.2.3. La primera toma de muestras se realizó en marzo de 1996, colectándose 124 sueros de los que 14 fueron positivos por IDGA, representando el 11.29%; 8 fueron ELISA positivos, significando el 6.45% (Fig. 5); y 3 fueron positivos en ambas técnicas, generando una concordancia en el diagnóstico del 13.6%. La segunda toma de muestras se realizó en junio de 1996, colectándose 185 sueros de los que 10 fueron IDGA positivos, constituyendo el 5.4%; 31 fueron positivos por ELISA, simbolizando el 16.75% (Fig. 5); y 3 sueros resultaron positivos en ambas técnicas lo que expresa una coincidencia en el diagnóstico del 7.31%. La tercera toma de muestras se realizó en septiembre de 1996, colectándose 176 sueros de los que 16 fueron positivos por IDGA, representando el 9.09%; 1 ELISA positivo, expresando el 0.56% del rebaño (Fig. 5); ningún suero resultó positivo a ambas técnicas. La cuarta toma de muestras se realizó en enero de 1997, colectándose 125 sueros de los que ninguno fue positivo por IDGA y 31 fueron positivos por ELISA, significando el 24.8% de concordancia en el diagnóstico (Fig. 5). La última toma de muestras se realizó en marzo de 1997, colectándose 119 sueros, de los que 3 fueron IDGA positivos, expresando el 2.52%; 27 positivos por ELISA, representando el 22.68% (Fig. 5); 2 sueros resultaron positivos en ambas técnicas, generando una concordancia en el diagnóstico del 6.66%

**Cuadro no. 2.3.: Identificaciones de los caprinos positivos a IDGA y ELISA en cada uno de los muestreos realizados en el rebaño III.**

FECHA DEL MUESTREO	NO. DE ANIMALES POR MUESTREO	CAPRINOS (+) IDGA NO. IDENTIFICAC	CAPRINOS (+) ELISA NO. IDENTIFICAC	PREVALENCIA IDGA / ELISA (%)
Marzo 1996.	124 caprinos	8, 28, 32, 39, 51, 78, 81, 83, 97, 137, 144, 186, 7075, SN.	51t, 59t, 78t, 83t, 115t, 137t, 6108, 74DRE6246.	11.29 / 6.45
Junio 1996.	185 caprinos	19aa, 48t, 65t, 66t, 75t, 82t, 83t, 88t, 93t, 106t.	30b, 28t, 39t, 41t, 49t, 55t, 68t, 70t, 72t, 74t, 75t, 80t, 81t, 88t, 90t, 93t, 96t, 97t, 98t, 100t, 103t, 104t, 107t, 132t, 134t, 137t, 149t, 159t, 15an, 34tn, 532a.	5.4 / 16.75
Septiembre 1996.	176 caprinos	12b, 25b, 30b, 31t, 41t, 52t, 53t, 59t, 68t, 69t, 80t, 99t, 100t, 107t, 129t, 132t.	74t.	9.09 / 0.56
Enero 1997.	125 caprinos	Todos son negativos	34t, 40t, 42t, 47t, 64t, 73t, 77t, 84t, 94t, 105t, 111t, 112t, 116t, 117t, 119t, 130t, 133t, 136t, 150t, 153t, 13a, 14a, 17a, 20a, 24a, 27a, 29a, 121a, 155a, 2004, 2005.	0.0 / 24.8
Marzo 1997.	119 caprinos	94t, 136t, 20b.	07b, 17b, 20b, 21b, 26b, 34t, 42t, 43t, 46t, 57t, 61t, 64t, 77t, 84t, 108t, 110t, 119t, 125t, 127t, 130t, 136t, 2005	2.52 / 22.68



**Figura 5:** Comparación del porcentaje de caprinos positivos a paratuberculosis detectados por IDGA y ELISA en el rebaño III.

## 2. Estudio anatomopatológico

Se realizaron 25 necropsias de caprinos positivos a IDGA, ELISA, o por ambas pruebas serológicas, así como de caprinos con signología clínica de paratuberculosis procedentes de los 3 rebaños. Los resultados de las necropsias se describen en forma individual para cada uno de los rebaños.

### Rebaño I

Se realizaron 18 necropsias, observándose en 13 de ellas engrosamiento marcado de la pared intestinal (Fig. 7), los vasos linfáticos de la serosa muy evidentes y con trayectos tortuosos. Cuatro caprinos presentaban engrosamiento zonal moderado de la pared intestinal (Fig. 8); una cabra presentaba avanzados cambios autolíticos. En todos los casos se apreció edema y linfadenomegalia la cual iba de moderada a severa. Tres caprinos presentaron puntos blancos de 1-2 mm de diámetro en la superficie del hígado.

Microscópicamente en 2 cabras se observó enteritis granulomatosa multifocal sin bacilos ácido alcohol resistentes (baar) por lo que se clasificaron como lesiones II (Cuadro no. 3) (Pérez *et al*, 1993) (Fig. 11). En 3 cabras se observó enteritis granulomatosa multifocal con escasos baar (Fig. 20), por lo que se clasificaron como IIIa ( Cuadro no. 3 y Fig. 12). En 8 cabras se observó enteritis granulomatosa grave difusa, con abundantes

bacilos ácido alcohol resistentes (baar) (Fig. 19), por lo que se identificaron como lesiones IIIb (Cuadro no. 3). Una cabra presentaba enteritis grave difusa con áreas de necrosis y abundantes baar, por lo que de igual forma corresponde a una lesión IIIb (Cuadro no. 3 y Fig. 13). Dos cabras presentaron enteritis granulomatosa grave difusa sin baar, por lo que se clasificaron como lesiones IIIc ( Cuadro no. 3 y Fig. 14). En 2 cabras no se apreciaron lesiones microscópicas aparentes. Una cabra presentó avanzados cambios autolíticos por lo que no fue posible evaluar el tejido intestinal.

En 8 cabras se observó linfadenitis granulomatosa grave difusa con abundantes baar, 4 de éstas con focos de mineralización (Fig. 15). Otras 6 cabras presentaron linfadenitis moderada, en 3 cabras se apreciaron focos incipientes de macrófagos peritrabeculares. Una cabra presentó autólisis importante

De las 5 cabras con lesiones hepáticas, una presentó hepatitis granulomatosa multifocal grave con abundantes baar (Fig. 16 y 17); las otras 4 presentaron pequeños focos de células mononucleares (Fig. 18), y áreas de mineralización subcapsulares no asociadas a éstos.

#### Rebaño II

Se realizaron 4 necropsias. En 3 caprinos macroscópicamente se observó engrosamiento moderado de la pared intestinal (Fig. 8), tejido linfoide asociado evidente, así como linfadenomegalia moderada en 3 caprinos. En el otro caprino se observó engrosamiento moderado difuso de la pared intestinal así como linfadenomegalia moderada (Fig. 9). Microscópicamente 3 caprinos presentaron lesiones granulomatosas focales discretas a nivel de la lámina propia de la submucosa en las que no se observaron baar, estas lesiones se identificaron como lesiones tipo II (Cuadro no. 3 y Fig. 11). El otro caprino presentó enteritis multifocal moderada con escasos baar, por lo que fue clasificada también como lesión tipo II (Cuadro no. 3), así también presentó focos discretos de mononucleares en el hígado (Fig. 18). En los linfonódulos de los 4 caprinos se apreciaron focos incipientes de macrófagos peritrabeculares. Con la tinción de Ziehl Neelsen no fue posible observar baar en este tejido.

### Rebaño III

Se realizaron necropsias de 7 caprinos. En 4 caprinos macroscópicamente se observó engrosamiento zonal discreto de la pared intestinal (Fig. 8), tejido linfoide asociado evidente, estructuras parasitarias compatibles con coccidias y los vasos linfáticos de la serosa con trayectos tortuosos. Tres caprinos presentaron engrosamiento difuso moderado de la pared intestinal con tejido linfoide asociado evidente. En 2 caprinos se apreciaron sufusiones en la mucosa intestinal. Los 7 caprinos mostraron linfadenomegalia (Fig. 9) y edema moderados. Microscópicamente 5 caprinos presentaron lesiones granulomatosas focales a nivel de la lámina propia de la submucosa intestinal, sin baar. En 2 de estos caprinos las lesiones estaban asociadas a las placas de Peyer y la mucosa relacionada con la misma por lo que se clasificaron como lesiones tipo II (Cuadro no. 3). En los otros 3 caprinos las lesiones se clasificaron como IIIa (Cuadro no. 3 y Fig. 12). Los otros 2 caprinos no presentaron lesiones microscópicas.

**Cuadro no. 3:** Comparación entre la respuesta serológica, la presencia de baar y el tipo de lesión en los caprinos procedentes de los 3 rebaños caprinos a los que se les realizó estudio anatomopatológico.

Rebaño *	Identificación Caprino	E.L.I.S.A. (S.I.M.A.)	I.D.G.A.	Ziehl Neelsen (**)	Tipo de lesión (Pérez et al, 1993). ***
I	195	-	+	++	IIIb
I	S-04	+	+	++	IIIb
I	S-06	+	+	++	IIIb
I	143	+	+	++	IIIb
I	S-27	-	-	++	IIIb
I	S-23	+	+	+	IIIc
I	S-09	+	-	++	IIIb
I	S-26	+	+	+	IIIc
I	S-18	+	+	+	IIIa
I	67	-	+	+	IIIa
I	126	+	+	+++	IIIb
I	S-20	-	-	-	s/lesión
I	S-28	-	-	-	s/lesión
I	191	+	+	-	II
I	208	-	+	-	II
I	48	+	+	++	IIIb
I	190	-	-	+	IIIa
I	S-22	-	+	-	Autólisis
II	31	+	+	-	II
II	511	-	+	-	II
II	725	-	+	-	II
II	636	+	-	+	II
III	9	-	+	-	II
III	52	-	+	-	II
III	69	-	+	-	IIIa
III	97	-	+	-	IIIa
III	12b	-	+	-	s/lesión
III	25b	-	+	-	s/lesión
III	30b	+	+	-	IIIa

(\*) I: rebaño I, II: rebaño II, III: rebaño III.

(\*\*) +: escasas micobacterias, ++: micobacterias en cantidad moderada, +++: abundantes micobacterias.

(\*\*\*) tipo I: pequeños granulomas en área interfolicular de la P. de Peyer, no se observan micobacterias; tipo II: lesiones granulomatosas focales en P. de Peyer y en la mucosa relacionada con la misma; tipo IIIa: pequeños granulomas en mucosa no asociada a P. de Peyer; IIIb: enteritis granulomatosa difusa con abundantes micobacterias; IIIc: enteritis granulomatosa difusa, abundantes linfocitos, células gigantes, no se observan micobacterias.

### 3. Estudio Bacteriológico

#### 3.1 y 3.2: Método convencional y previa tripsinización

Se realizó el estudio bacteriológico a partir de fragmentos de yeyuno, íleon, válvula ileocecal, linfonódulo mesentérico y heces de los 25 caprinos procedentes de los 3 rebaños en los que se llevó a cabo el estudio *posmortem*.

Los tejidos y heces fueron descontaminados y algunos de ellos tripsinizados como se describió anteriormente. Posteriormente fueron sembrados en el medio de Löwenstein Jensen con y sin micobactina J.

Se evaluó el crecimiento de *M. a. paratuberculosis* a las 4, 8, 12 y 16 semanas (Fig. 21).

#### Rebaño I

Se obtuvieron 63 aislamientos de *M. a. paratuberculosis* a partir de diferentes tejidos procedentes de 12 caprinos. De estos aislamientos 8 fueron obtenidos a partir de fragmentos de yeyuno de los que 3 se originaron de tejido tripsinizado. A partir de íleon se obtuvieron 12 aislamientos de los que 5 provenían de tejido tripsinizado. A la válvula ileocecal le correspondieron 20 aislamientos de los que 9 fueron de tejido tripsinizado. 4 aislamientos correspondieron a fragmentos intestinales no identificados, de los que 2 fueron de tejido tripsinizado. De los linfonódulos mesentéricos se originaron 12 aislamientos de los que 5 fueron de tejido tripsinizado. 7 aislamientos fueron a partir de heces. Los resultados del estudio bacteriológico de este rebaño se describen en el Cuadro no. 4.1.

**Cuadro no. 4.1.:** Resultados del estudio bacteriológico correspondientes al Rebaño I.

Identificación	Órgano	Características	Tiempo de crecimiento (semanas)
S-06	Yeyuno	Micobactina	4
S-06	Íleon	Micobactina	4
S-06	VIC	Micobactina	4
S-06	LNM	Micobactina	4
143	Yeyuno	Micobactina	12
143	VIC	Micobactina	12
143	VIC	Micobactina, tripsina	12
S-04	Yeyuno	Micobactina	12
S-04	Yeyuno	Micobactina, tripsina	16
S-04	Íleon	Micobactina	16
S-04	VIC	Micobactina	16

S-04	VIC	Micobactina, tripsina	16
S-04	LNM	Micobactina	12
S-04	Heces	Micobactina	12
S-23	Yeyuno	Micobactina	12
S-23	Yeyuno	Micobactina, tripsina	8
S-23	Ileon	Micobactina	12
S-23	Ileon	Micobactina, tripsina	12
S-23	VIC	Micobactina	12
S-23	VIC	Micobactina, tripsina	16
S-23	LNM	Micobactina	12
S-23	LNM	Micobactina, tripsina	8
S-23	Heces	Micobactina	16
S-09	VIC	Micobactina	6
S-09	VIC	Micobactina, tripsina	12
S-09	LNM	Micobactina	12
S-09	Heces	Micobactina	16
S-26	Ileon	Micobactina	16
S-26	Ileon	Micobactina, tripsina	8
S-26	VIC	Micobactina	8
S-26	VIC	Micobactina, tripsina	12
S-26	LNM	Micobactina	16
S-26	LNM	Micobactina, tripsina	16
S-26	Heces	Micobactina	8
195	Intestino	Micobactina	16
195	Intestino	Micobactina, tripsina	16
189	Heces	Micobactina	8
126	VIC	Micobactina	12
126	VIC	Micobactina, tripsina	12
126	Ileon	Micobactina	16
126	Ileon	Micobactina, tripsina	16
126	Heces	Micobactina	8
67	Intestino	Micobactina	12
67	Intestino	Micobactina, tripsina	12
67	VIC	Micobactina	12
67	VIC	Micobactina, tripsina	12
67	LNM	Micobactina	12
67	LNM	Micobactina, tripsina	12
67	Heces	Micobactina	16
S-18	Ileon	Micobactina	16
S-18	Ileon	Micobactina, tripsina	16
S-18	VIC	Micobactina	10
S-18	VIC	Micobactina, tripsina	16
S-18	LNM	Micobactina, tripsina	10
48	Yeyuno	Micobactina	12
48	Yeyuno	Micobactina, tripsina	12
48	Ileon	Micobactina, tripsina	12
48	Ileon	Micobactina	12
48	VIC	Micobactina	12
48	VIC	Micobactina, tripsina	12
48	LNM	Micobactina	12
48	LNM	Micobactina, tripsina	12
S-28	VIC	Micobactina	16

LNM = linfonódulo mesentérico, VIC = válvula íleocecal

**Cuadro no. 4.1.:** Resultados del estudio bacteriológico correspondientes al Rebaño I (continuación).

## Rebaño II

Se obtuvieron 8 aislamientos de *M. a. paratuberculosis* a partir de diferentes tejidos provenientes de 2 caprinos. De estos aislamientos 2 correspondieron a fragmentos de yeyuno, 2 a fragmentos de íleon, de igual forma 2 a válvula ileocecal. Asimismo, otros 2 aislamientos se originaron de fragmentos de linfonódulos mesentéricos de los que uno fue de tejido tripsinizado. Los resultados del estudio bacteriológico de este rebaño se describen en el Cuadro no. 4.2.

**Cuadro no. 4.2.:** Resultados del estudio bacteriológico correspondientes al Rebaño II.

Identificación	Órgano	Características	Tiempo de crecimiento (semanas)
725	Yeyuno	Micobactina	16
725	Íleon	Micobactina	16
725	VIC	Micobactina	16
646	Yeyuno	Micobactina	12
646	Íleon	Micobactina	12
646	VIC	Micobactina	12
646	LNM	Micobactina	12
646	LNM	Micobactina, tripsina	12

VIC = válvula ileocecal, LNM = linfonódulo mesentérico.

## Rebaño III

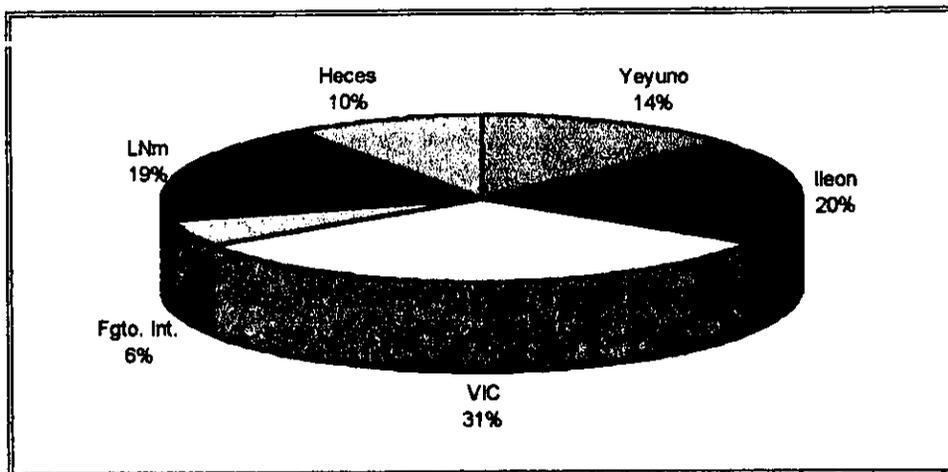
Se obtuvieron 2 aislamientos de *M. a. paratuberculosis* del rebaño III. Un aislamiento se obtuvo a partir de un fragmento de íleon y el otro de válvula ileocecal. En ambos aislamientos el tejido estaba tripsinizado. Los resultados del estudio bacteriológico de este rebaño se describen en el Cuadro no. 4.3.

**Cuadro no. 4.3.:** Resultados del estudio bacteriológico correspondientes al Rebaño III.

Identificación	Órgano	Características	Tiempo de crecimiento (semanas)
12b	VIC	Micobactina, tripsina	12
25b	Íleon	Micobactina, tripsina	12

VIC = válvula ileocecal.

De los 3 rebaños se obtuvieron 73 aislamientos de *M. a. paratuberculosis*, de los que 10 fueron a partir de yeyuno significando el 13.7%. Asimismo 15 fueron de íleon significando el 20.5%. Se obtuvieron 23 aislamientos a partir de válvula ileocecal significando un 31.5%. Se obtuvieron 4 aislamientos que correspondieron a tejido intestinal en los que no se identificó el segmento y significaron 5.5%. Catorce aislamientos se obtuvieron a partir de linfonódulos mesentéricos significando un 19.2%. Siete aislamientos fueron obtenidos a partir de heces significando 9.6% (Ver Fig. 6). El 40.9% de los aislamientos de *M. a. paratuberculosis* se originaron a partir de tejidos tripsinizados.



**Figura 6:** Tejidos de los que se obtuvieron los aislamientos de *M. a. paratuberculosis*.

A partir de heces de los 3 rebaños se obtuvieron 7 aislamientos de *M. a. paratuberculosis*. Los 7 aislamientos correspondieron a caprinos del rebaño I, de los que 6 fueron positivos a IDGA y 6 a ELISA. No existió concordancia en todos los casos. Las identificaciones de los caprinos así como su seropositividad se describen en el Cuadro no. 5.

**Cuadro no. 5:** Respuesta serológica de los caprinos de los que se aisló *M. a.* subsp. *paratuberculosis* a partir de heces.

Identificación	LD.G.A.	E.L.L.S.A.
S-04	+	+
S-23	+	+
S-09	-	+
S-26	+	+
189	+	+
126	+	+
67	+	-

### 3.3. Cultivo radiométrico

El cultivo radiométrico se realizó a partir de 26 muestras de heces de las que 15 provenían del rebaño I, 4 del rebaño II y 5 del rebaño III. Las muestras de heces fueron colectadas al momento de realizar la necropsia. Se obtuvieron 4 aislamientos de *M. a. paratuberculosis* a partir de muestras de heces de 4 caprinos del rebaño I. A continuación se comparan los aislamientos de *M. a. paratuberculosis* obtenidos con el cultivo convencional con los obtenidos con el cultivo radiométrico (Cuadro no. 6

**Cuadro no. 6:** Comparación entre los aislamientos de *M. a* subsp. *paratuberculosis* obtenidos de heces a partir de cultivo convencional y radiométrico.

Identificación	Cultivo Bacteriológico Convencional	Cultivo Radiométrico
<b>Rebaño I</b>		
S-04	+	Contaminación
S-23	+	+
S-09	+	+
S-26	+	-
189	+	Contaminación
126	+	+
67	+	-
143	-	+
208	-	-
191	-	-
S-28	-	-
S-06	-	-
S-20	-	-
S-18	-	-
S-27	-	-
<b>Rebaño II</b>		
511	-	-
725	-	-
646	-	-
31	-	-
<b>Rebaño III</b>		
69	-	-
52	-	-
97	-	-
9	-	-
12B	-	-
25B	-	-
30B	-	-
<b>Total</b>	<b>7</b>	<b>4</b>

(+) Positivo, (-) Negativo.

#### 4. Aislamiento y Eliminación

En los 3 rebaños los caprinos que resultaron positivos a IDGA se aislaron para ser eliminados posteriormente y de esta forma determinar los cambios en la densidad de incidencia en cada una de las tomas de muestra realizadas en los 3 rebaños.

##### Rebaño I

En el rebaño I se determinó una prevalencia inicial estimada por IDGA del 6.03% al identificarse 7 caprinos positivos a Paratuberculosis por IDGA. En el segundo muestreo la

densidad de incidencia fue del 3.5% con 4 caprinos IDGA positivos. En el tercer muestreo disminuyó a 0.9% identificándose únicamente un caprino positivo por IDGA. En el cuarto muestreo la densidad de incidencia incrementó a 11.5% con 13 caprinos positivos por IDGA. En el quinto muestreo continuó el incremento hasta 12.14% con 13 caprinos positivos por IDGA. En el sexto muestreo disminuyó a 1.94% con 2 caprinos positivos por IDGA, para finalizar en el séptimo muestreo con 3.84% significando 4 caprinos IDGA positivos.

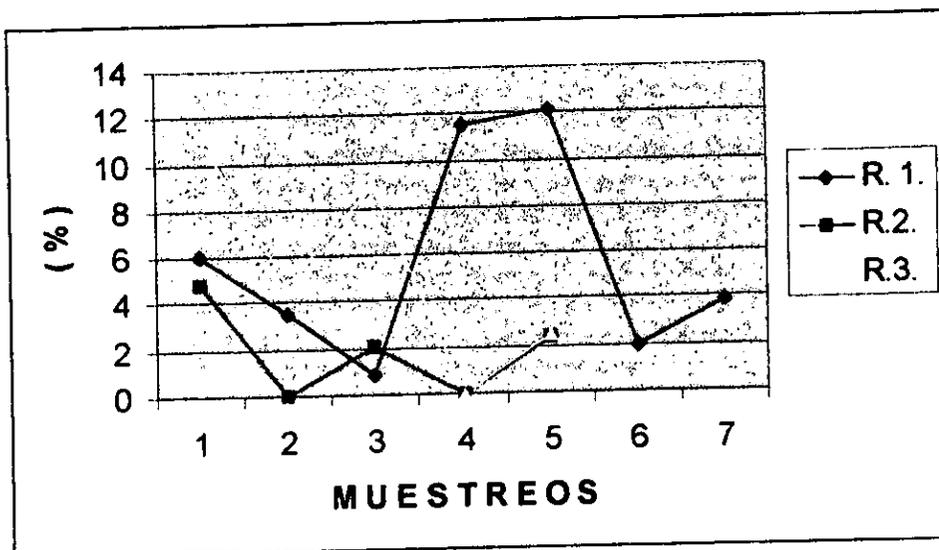
#### Rebaño II

En el rebaño II se determinó una prevalencia inicial estimada por IDGA del 4.8% al identificar 5 caprinos positivos a Paratuberculosis por IDGA. En el segundo muestreo la densidad de incidencia fue 0.0% al no detectarse ningún caprino positivo por IDGA. En el tercer muestreo la densidad de incidencia se incrementó a 2.1% al identificarse 2 caprinos positivos por IDGA, para volver a decrecer hasta 0.0% en el cuarto muestreo y finalizar con 2.4% en el último muestreo con 2 caprinos positivos por IDGA.

#### Rebaño III

En el rebaño III se determinó una prevalencia inicial estimada por IDGA del 11.29% al identificar 14 caprinos positivos a Paratuberculosis. En el segundo muestreo la densidad de incidencia fue 4.8% al detectarse 9 caprinos positivos por IDGA. En el tercer muestreo la densidad de incidencia se incrementó a 9% al identificarse 16 caprinos IDGA positivos. En el cuarto muestreo no se detectó ningún caprino positivo por IDGA y finalmente en el quinto muestreo se detectaron 3 caprinos positivos a IDGA representando 2.5%.

El comportamiento de la densidad de incidencia en cada uno de los rebaños se describe en la Figura 7.



**Figura 7:** Densidad de Incidencia en los 3 rebaños (R.1., R.2., R.3.) estimada por IDGA.

## 5. Análisis Estadístico

### Rebaño I

A través del estadístico  $X^2$  ( $\alpha=0.01$ ), se determinó que evaluando las prevalencias inicial y final obtenidas a través de la IDGA, no se logró una variación significativa de esta. Por otro lado utilizando este mismo estadístico se determinó que al evaluar las prevalencias inicial y final a través de ELISA hubo un incremento significativo ( $\alpha=0.01$ ).

Al comparar los porcentajes de caprinos positivos a IDGA obtenidos en cada uno de los muestreos se observó que entre el primer y segundo muestreo hubo un decremento significativo ( $\alpha=0.01$ ) de caprinos positivos a paratuberculosis por IDGA. De igual forma entre el segundo y tercer muestreo hubo un decremento significativo ( $\alpha=0.01$ ). Sin embargo, entre el tercer y cuarto muestreo se observó un incremento significativo ( $\alpha=0.01$ ) de caprinos positivos a IDGA. Este incremento continuó de manera significativa ( $\alpha=0.01$ ) entre el cuarto y quinto muestreo, para disminuir de forma significativa ( $\alpha=0.01$ ) entre el quinto y sexto muestreo. Finalmente entre el sexto y séptimo muestreo volvió a incrementarse el porcentaje de caprinos positivos a IDGA de forma significativa ( $\alpha=0.01$ ).

Se observó que al comparar los porcentajes de caprinos positivos a paratuberculosis por ELISA entre el primer y segundo muestreo hubo un decremento significativo ( $\alpha=0.01$ )

de caprinos positivos a ELISA. Entre el segundo y tercer muestreo de igual forma hubo un decremento significativo ( $\alpha=0.01$ ). Sin embargo, entre el tercer y cuarto muestreo se observó un incremento significativo ( $\alpha=0.01$ ) de caprinos positivos a ELISA. Entre el cuarto y el quinto muestreo se pudo observar un decremento ( $\alpha=0.01$ ) significativo, el cual continuó significativamente ( $\alpha=0.01$ ) entre el quinto y sexto muestreo. Finalmente entre el sexto y séptimo muestreo volvió a incrementarse significativamente ( $\alpha=0.01$ ) el porcentaje de caprinos positivos a ELISA. Estas tendencias están representadas en la Figura 3.

Utilizando el Teorema de Bayes se determinó los valores predictivos tanto positivo (VPP) como negativo (VPN), de la IDGA y ELISA (Cuadros no. 7.1. y 7.2.), los cuales indican respectivamente la probabilidad de que un animal que sea detectado como positivo por una técnica de diagnóstico esté infectado, así como la probabilidad de que los animales negativos a una prueba diagnóstica no estén infectados. Estos valores fueron calculados para cada una de la toma de muestras ya que en cada una de ellas la prevalencia de paratuberculosis estimada por la IDGA y el ELISA fueron diferentes, como se muestra en el cuadro no. 2.1. Así en la primer toma de muestras la prevalencia estimada por el ELISA y la IDGA fue la misma (6.89%), sin embargo el VPP de la IDGA fue 97.14% mientras que el de la ELISA fue apenas 13.34%; los VPN de ambas técnicas fueron altos 96.43% y 97.19% respectivamente. En la segunda toma de muestras la prevalencia determinada por IDGA fue menor a la de la toma anterior (4.42%) y de igual forma el VPP bajó a 96.08% y el VPN aumentó a 97.79%; por otro lado el ELISA arrojó una prevalencia de 7.07% con el VPP ligeramente mayor al de la toma anterior (13.67%) y VPN escasamente menor (97.12%). La tercer toma de muestras marcó una prevalencia baja calculada con la IDGA (0.87%) la cual fue acompañada por una resta en el VPP que fue del 81.48%, nuevamente el VPN aumentó llegando a 99.57%; con el ELISA la prevalencia fue del 6.95% con un VPP similar al de las tomas anteriores (13.46%), el VPN mejoró ligeramente alcanzando 97.17%. La cuarta toma de muestras refleja un incremento significativo en la prevalencia evaluada por la IDGA, siendo esta del 13.27% con un VPN para esta técnica del 98.80% y un VPN inferior a los obtenidos en los muestreos anteriores (92.89%); la prevalencia estimada con el ELISA tuvo igualmente un incremento significativo y sus VPP y VPN también fueron mayores que los de las tomas anteriores, 22.73% y 99.77%

respectivamente. En la quinta toma de muestras la prevalencia valorada por la IDGA siguió incrementando para llegar al 14.01%, sin embargo, el VPP fue el mismo que el de la toma anterior, por su parte el VPN presentó un ligero decremento (92.46%); contrario a lo mostrado con la IDGA la prevalencia estimada con el ELISA fue menor a la de la toma anterior (8.41%) y los VPP y VPN también se redujeron siendo 16.04% y 91.59% respectivamente. La sexta toma de muestras refleja un decremento significativo en la prevalencia evaluada por la IDGA siendo esta del 3.88%, el VPP también fue menor al de la toma anterior (95.56%) y el VPN alcanzó el 98.01%; con el ELISA la prevalencia calculada también decreció significativamente llegando al 0.97% el VPP llegó a ser del 1.97% mientras que el VPN obtuvo 99.03%. En la última toma la prevalencia estimada con la IDGA aumentó significativamente y fue del 6.73% el VPP igualmente fue mayor al de la toma anterior (97.39%), el VPN presentó un valor menor al de la toma anterior (96.51%); por su parte la ELISA arrojó una prevalencia de 15.38%, la cual fue significativamente mayor a la obtenida en la toma anterior, el VPP, 27.45% fue también mucho mayor que el VPP de la toma anterior, el VPN fue del 93.37%.

**Cuadro no. 7.1. Valores Predictivos (VPP, VPN) de la IDGA en el rebaño I.**

MUESTREO	PREVALENCIA % (IDGA)	VPP (%)	VPN (%)
1	6.89	97.14	96.43
2	4.42	96.08	97.79
3	0.87	81.48	99.57
4	13.27	98.80	92.89
5	14.01	98.80	92.46
6	3.88	95.56	98.01
7	6.73	97.39	96.51

VPP = valor predictivo positivo, VPN = valor predictivo negativo

**Cuadro no. 7.2.: Valores Predictivos (VPP, VPN) del ELISA en el rebaño I.**

MUESTREO	PREVALENCIA % (ELISA)	VPP (%)	VPN (%)
1	6.89	13.34	97.19
2	7.07	13.67	97.12
3	6.95	13.46	97.17
4	12.38	22.73	99.77
5	8.41	16.04	91.59
6	0.97	1.97	99.03
7	15.38	27.45	93.37

## Rebaño II

A través del estadístico  $\chi^2$  ( $\alpha=0.01$ ), se determinó que al evaluar las prevalencias inicial y final del rebaño II obtenidas a través de IDGA se logró una variación significativa ( $\alpha=0.01$ ), indicando un decremento en esta.

Por otro lado utilizando este mismo estadístico se determinó que al evaluar las prevalencias inicial y final a través de ELISA no hubo una variación significativa de esta ( $\alpha=0.01$ ).

Al comparar el porcentaje de caprinos positivos a Paratuberculosis por IDGA observados entre el primer y segundo muestreo se identificó un decremento significativo ( $\alpha=0.01$ ) de este. Mientras que entre el segundo y tercer muestreo se apreció un incremento significativo ( $\alpha=0.01$ ) de caprinos positivos a IDGA, este incremento continuó de forma significativa ( $\alpha=0.01$ ) entre el tercer y cuarto muestreo. Finalmente entre el cuarto y quinto muestreo hubo un decremento significativo ( $\alpha=0.01$ ) en el porcentaje de caprinos positivos a IDGA. Este mismo comportamiento se observó al comparar los porcentajes de caprinos positivos a Paratuberculosis obtenidos por ELISA ( $\alpha=0.01$ ). Estas tendencias se muestran en la Figura 4.

A través del Teorema de Bayes se determinaron los valores predictivos positivo (VPP) y negativo (VPN) de la IDGA y ELISA (Cuadros 7.3. y 7.4.). Estos valores fueron estimados para cada una de la toma de muestras ya que en cada una de ellas la prevalencia de Paratuberculosis representada por la IDGA y el ELISA fue variable, como se puede apreciar en el cuadro no. 4.2. La prevalencia inicial de Paratuberculosis determinada por la IDGA fue del 4.8%, el VPP de la IDGA para esta toma de muestras fue 96.38% y el VPN 97.53%; con el ELISA la prevalencia inicial fue 5.76%, el VPP 11.29% y el VPN 97.66%. En la segunda toma de muestras la prevalencia calculada por ambas técnicas fue del 0.0% por lo que no se establecieron los VPP y VPN. En la tercer toma de muestras la prevalencia estimada por ambas técnicas fue 2.17%, sin embargo los VPP de cada una de ellas fueron muy distintos 91.68% para la IDGA y apenas 4.39% para el ELISA; contrariamente los VPN fueron muy similares 98.9% de la IDGA y 99.14% del ELISA. En la cuarta toma de muestras la prevalencia determinada por la IDGA fue 2.4%, el VPP

92.3%, fue discretamente mayor que el de la toma de muestras anterior mientras, que el VPN disminuyó (98.78%); por su parte el ELISA arrojó una prevalencia de 7.22%, el VVP mejoró alcanzando 13.93%, mientras que el VPN fue menor que el de la toma anterior (98.14%). En la última toma de muestras la prevalencia estimada por la IDGA, 0.82%, fue significativamente menor que la del muestreo anterior, el VPP, 82%, disminuyó con respecto a todas las tomas anteriores, contrariamente el VPN aumentó y fue del 99.58%; el ELISA determinó un decremento significativo en la prevalencia (4.87%), el VPP fue menor que el de la toma anterior (9.63%) y el VPN fue de 98.05%, lo que marca una discreta diferencia con el VPN de la cuarta toma de muestras.

**Cuadro no. 7.3.: Valores Predictivos (VPP, VPN) de la IDGA en el rebaño II.**

MUESTREO	PREVALENCIA % (IDGA)	VPP (%)	VPN (%)
1	4.8	96.38	97.53
2	0.0	--	--
3	2.17	91.68	98.9
4	2.4	92.3	98.78
5	0.82	82.00	99.58

VPP = valor predictivo positivo, VPN = valor predictivo negativo

**Cuadro no. 7.4.: Valores Predictivos (VPP, VPN) del ELISA en el rebaño II.**

MUESTREO	PREVALENCIA % (ELISA)	VPP (%)	VPN (%)
1	5.76	11.29	97.66
2	0.0	--	0.0
3	2.17	4.39	99.14
4	7.22	13.93	98.14
5	4.87	9.63	98.05

VPP = valor predictivo positivo, VPN = valor predictivo negativo

### Rebaño III

A través del estadístico  $X^2$  ( $\alpha=0.01$ ), se determinó que al evaluar las prevalencias inicial y final del rebaño III obtenidas a través de IDGA se logró una variación significativa ( $\alpha=0.01$ ), indicando un decremento en ésta.

Por otro lado utilizando este mismo estadístico se determinó que al evaluar las prevalencias inicial y final a través de ELISA hubo una variación significativa indicando un incremento de ésta ( $\alpha=0.01$ ).

Al comparar el porcentaje de caprinos positivos a paratuberculosis por IDGA observados entre el primer y segundo muestreo se identificó un decremento significativo ( $\alpha=0.01$ ) en el porcentaje de caprinos positivos a IDGA. Entre el segundo y tercer muestreo el porcentaje de caprinos positivos a IDGA se incrementó de forma significativa ( $\alpha=0.01$ ), mientras que entre el tercer y cuarto muestreo este porcentaje disminuyó significativamente ( $\alpha=0.01$ ), para volver a aumentar de manera significativa ( $\alpha=0.01$ ) entre el cuarto y el quinto muestreo.

Se observó que al comparar el porcentaje de caprinos positivos a paratuberculosis por ELISA detectados entre el primer y segundo muestreo hubo un incremento significativo ( $\alpha=0.01$ ) de éste. Por su parte entre el segundo y tercer muestreo se identificó un decremento significativo ( $\alpha=0.01$ ) en el porcentaje de caprinos positivos a ELISA. Entre el tercer y cuarto muestreo hubo un incremento significativo ( $\alpha=0.01$ ) del porcentaje de caprinos positivos por ELISA. Finalmente entre el cuarto y quinto muestreo hubo una disminución significativa ( $\alpha=0.01$ ) en este porcentaje. En la Figura 4 están representadas estas tendencias.

Con el Teorema de Bayes se determinaron los valores predictivos tanto positivo (VPP) como negativo (VPN) de la IDGA y ELISA (Cuadros no. 7.5. y 7.6.). Estos valores fueron calculados para cada una de la toma de muestras considerando que en cada una de ellas la prevalencia de paratuberculosis estimada por cada técnica de diagnóstico fue variable (Cuadro no. 2.3.). En la toma de muestras inicial la IDGA arrojó una prevalencia de 11.29%, el VPP estimado para esta técnica fue 98.45% y el VPN 94.01%; por su parte el ELISA determinó una prevalencia de 6.45% con un VPP de 12.56% y un VPN 97.38%. Para la segunda toma de muestras hubo un decremento significativo en la prevalencia evaluada por IDGA, siendo esta del 5.4%, el VPP de esta técnica fue menor (96.61%) y el VPN se incrementó (97.22%); el ELISA estableció una prevalencia de 16.75%, ésta significativamente mayor a la de la toma de muestras anterior. El VPP fue también más alto (29.53%), mientras que el VPN 92.72%, fue más bajo que el obtenido anteriormente. En la tercer toma de muestras la prevalencia estimada a través de la IDGA fue del 9.09%, lo que señala un incremento significativo de ésta, el VPP fue del 9.09% indicando un

incremento con respecto a la toma de muestras anterior, el VPN 95.23%, disminuyó con respecto a la toma de muestras precedente. En la cuarta toma de muestras en la IDGA no se detectó ningún caprino positivo, mientras que con el ELISA se observó un incremento significativo de la prevalencia llegando ésta al 24.8%, el VPP determinado fue 40.72%, lo que muestra un incremento notable de este valor, el VPN disminuyó hasta 88.58%. En la última toma de muestras la prevalencia estimada por IDGA fue del 2.52%, el VPP de esta técnica fue 94.39%, siendo este el porcentaje más bajo obtenido para éste valor, el VPN fue 98.72%, el cual fue el porcentaje más alto alcanzado por este valor dentro del rebaño III. Finalmente hubo una disminución significativa de la prevalencia calculada con el ELISA (22.68%), los VPP y VPN fueron más bajos que los de la toma de muestras anterior representando 37.93% y 89.71% respectivamente.

**Cuadro no. 7.5.: Valores Predictivos (VPP, VPN) de la IDGA en el rebaño III.**

MUESTREO	PREVALENCIA % (IDGA)	VPP (%)	VPN (%)
1	11.29	98.45	94.01
2	5.4	96.61	97.22
3	9.09	98.03	95.23
4	0.0	--	--
5	2.52	94.39	98.72

**VPP: valor predictivo positivo, VPN: valor predictivo negativo**

**Cuadro no. 7.6.: Valores Predictivos (VPP, VPN) del ELISA en el rebaño III.**

MUESTREO	PREVALENCIA % (ELISA)	VPP (%)	VPN (%)
1	6.45	12.56	97.38
2	16.75	29.53	92.72
3	0.56	1.15	99.78
4	24.8	40.72	88.58
5	22.68	37.93	89.71

**VPP = valor predictivo positivo, VPN = valor predictivo negativo**

## DISCUSIÓN

Los resultados serológicos observados en el presente estudio, reflejan variaciones en la respuesta hacia las diferentes técnicas diagnósticas utilizadas.

En el rebaño I mediante la técnica de IDGA se obtuvieron resultados positivos, los cuales pudieron ser corroborados a través del estudio anatomopatológico y el bacteriológico, por lo que en este rebaño la IDGA se muestra como una herramienta diagnóstica útil para detectar caprinos infectados con *M. a. paratuberculosis*, (Sherman *et al*, 1980; Juste, 1994; Thomas, 1983). Esta prueba se ha considerado 100% específica en los bovinos, por lo que un resultado positivo por IDGA es altamente confiable (Collins 1996). Es importante mencionar que la IDGA detectó caprinos con y sin manifestaciones clínicas de paratuberculosis, contrario a lo descrito por otros autores quienes citan que esta técnica en el caso de los bovinos se usa para confirmar casos clínicos de paratuberculosis (Collins, 1991; Juste, 1994). Sin embargo, otros autores no coinciden con esta afirmación ya que mencionan que la IDGA es útil para el diagnóstico subclínico de paratuberculosis (Sherman, 1989). Por su parte Chiodini *et al* (1984) mencionan que aunque la IDGA tiene poca sensibilidad es preferible su utilización antes que esperar semanas para que crezca el microorganismo a partir de heces.

Los caprinos que resultaron positivos a IDGA y que no fueron eliminados del rebaño, para la siguiente toma de muestras resultaron nuevamente positivos, lo que muestra que la IDGA tiene repetibilidad.

En la primer toma de muestras del rebaño II se identificaron 5 caprinos positivos a IDGA. A 3 de ellos, clínicamente sanos, se les realizó el estudio *posmortem* observándose lesiones discretas tanto macro como microscópicamente que sugerían un cuadro de paratuberculosis, lo que confirma la relación entre positividad a IDGA y presencia de lesiones (Pérez *et al*, 1992; Pérez *et al*, 1996), así como que IDGA detecta caprinos infectados con *M. a. paratuberculosis* sin importar si presentan o no signos clínicos (Sherman *et al*, 1980). En uno de estos 3 caprinos se logró el aislamiento de *M. a. paratuberculosis*; de los otros dos no fue posible obtener aislamientos de *M. a. paratuberculosis*. Los otros 2 caprinos positivos a IDGA a los que no se les practicó el

estudio *posmortem* murieron en el intervalo comprendido entre el primer y segundo muestreo, por lo que en el segundo muestreo no se detectó ningún caprino positivo a IDGA, lo que sugeriría que la IDGA fue efectiva para detectar a todos los caprinos infectados con *M. a. paratuberculosis*. Desafortunadamente no fue posible realizar estudios anatomopatológico y bacteriológico de todos los caprinos positivos a IDGA. Los caprinos positivos a IDGA que se detectaron en los siguientes 3 muestreos fueron oportunamente separados del resto del rebaño con lo que se logró que el número de caprinos seropositivos no fuera aumentando en cada una de las siguientes tomas de muestras, lo que coincide con lo descrito por otros autores (Gezon *et al*, 1988).

En el rebaño III en los primeros tres muestreos, IDGA detectó porcentajes mayores al 10% de caprinos posiblemente infectados con *M. a. paratuberculosis*. La mayoría de los caprinos detectados por IDGA en los primeros dos muestreos fueron eliminados oportunamente del rebaño, sin embargo, el estudio *pos mortem* de éstos no fue realizado ya que todos fueron vendidos y no fue posible establecer su destino. Con lo anterior se perdió la oportunidad de conocer si había relación entre la positividad a IDGA, la presencia de lesiones así como el aislamiento bacteriológico para confirmar la infección con *M. a. paratuberculosis*. Estos caprinos presentaban manifestaciones clínicas propias de paratuberculosis, ya que su condición corporal era pobre. La pérdida progresiva de peso la han descrito autores como evidencia para sospechar la presencia de paratuberculosis dentro de un rebaño (Gezon *et al*, 1988). De los caprinos que resultaron positivos a IDGA después del tercer muestreo se realizó el estudio anatomopatológico y bacteriológico de 7 de ellos, en 5 animales se encontraron lesiones microscópicas discretas compatibles con paratuberculosis y a partir de tejidos de los otros dos caprinos, que no presentaron lesiones microscópicas se logró el aislamiento de *M. a. paratuberculosis*. Es posible que esta última observación se pueda explicar considerando que al realizar la colección del material biológico se haya elegido una zona con lesión para el estudio histopatológico y que la zona adyacente elegida para el estudio bacteriológico no haya presentado lesiones, por lo que no sería posible obtener el aislamiento de ésta y lo opuesto para el caso en el que se obtuvo el aislamiento y no se observaron lesiones microscópicas. En el cuarto muestreo todos los caprinos resultaron negativos a IDGA, finalmente en el quinto muestreo se detectaron dos

caprinos positivos a IDGA en los que no se practicaron estudios *posmortem* ni bacteriológicos, ya que hubo cierta incredulidad de los médicos del rebaño hacia este diagnóstico porque consideraron el rebaño caprino libre de paratuberculosis por la prevalencia de 0% obtenida en la toma de muestras anterior, además de que los caprinos que resultaron positivos en este último muestreo no presentaban signos clínicos que sugirieran un cuadro de esta enfermedad.

Al analizar el comportamiento de la IDGA en los tres rebaños, se observó que esta prueba detectó a los caprinos tanto en un estado subclínico como clínico de la enfermedad. Además, la mayoría de los caprinos que esta técnica detectó como positivos presentaron lesiones y fueron positivos al aislamiento bacteriológico, por lo que la IDGA se presenta como una alternativa útil, confiable y económica para el diagnóstico de la paratuberculosis caprina.

En relación al ELISA en el rebaño I los resultados obtenidos fueron alentadores ya que como se puede apreciar en el Cuadro no. 2.1. detectó a los caprinos infectados con *M. a. paratuberculosis* 3 o 6 meses antes que la IDGA. El hecho de que los caprinos que detectó ELISA como positivos hayan sido diagnosticados posteriormente por IDGA brinda cierta confiabilidad a la prueba y confirma lo descrito por algunos autores en relación a que el ELISA es una prueba altamente sensible y específica, capaz de detectar la respuesta inmune humoral temprana (Kreeger, 1991; Molina *et al*, 1989; Molina *et al* 1990), por la escasa cantidad de anticuerpos que puede detectar (Harlow, 1988). En el caso particular de este rebaño el ELISA parece ser una mejor alternativa para el diagnóstico temprano de los caprinos infectados con *M. a. paratuberculosis*, hecho que coincide con lo descrito por algunos autores quienes mencionan que el ELISA debería ser la prueba de elección en el diagnóstico de paratuberculosis caprina (Milner *et al* 1989; Molina *et al* 1990). Por otro lado Burnside y Collins sugieren la utilización de sistemas comerciales de ELISA para el diagnóstico de Paratuberculosis (Burnside *et al* 1994; Collins 1991), argumentando la simplicidad de la técnica, su relativo bajo costo y rapidez (Collins, 1991).

En el rebaño II a lo largo de los 5 muestreos el ELISA detectó un mayor número de caprinos positivos que la IDGA. Es posible que esto se haya debido a la capacidad del ELISA para detectar la respuesta inmune humoral temprana (Kreeger, 1991; Molina *et al*

1990), ya que posteriormente por otros métodos diagnósticos como histopatología y bacteriología se confirmó la infección por *M. a. paratuberculosis* dentro del rebaño. Asimismo esta técnica mostró una repetibilidad aceptable.

En el rebaño III los resultados obtenidos con ELISA fueron desalentadores, ya que la técnica presentó repetibilidad muy pobre, además de que como se puede apreciar en el Cuadro no. 2.3. en el segundo y cuarto muestreos ELISA detecta 31 caprinos positivos, mientras que en el tercer muestreo detecta únicamente uno. Es posible que la razón de esta observación sean las reacciones cruzadas con otros microorganismos de este mismo género o bien con los de otros como *Actinomyces* spp, *Dermatophilus* spp, *Nocardia* spp, *Streptomyces* spp, así como *Corynebacterium* spp (Chiodini *et al*, 1984). Aunque cabe mencionar que la metodología utilizada para la ELISA (Anexo no 2) incluye la preabsorción de los sueros con *M. phlei*, esto con el objetivo de reducir la máximo las reacciones cruzadas ( Yokomizo *et al*, 1985). Aunque por su parte Hilbink *et al*, afirman que preabsorber los sueros con *M. phlei* no aporta ninguna ventaja en el diagnóstico a través del ELISA de la paratuberculosis ovina (Hilbink *et al*, 1994). Es importante mencionar que al igual que en los otros dos rebaños la presencia de la infección con *M. a. paratuberculosis* se confirmó en este rebaño a partir de los estudios anatomopatológico y bacteriológico.

Aunque el ELISA tiene la capacidad de detectar la respuesta inmune humoral temprana y se ha descrito como una técnica altamente sensible y específica, en el presente estudio se obtuvieron resultados alentadores únicamente en los rebaños I y II, ya que en el rebaño III esta técnica presentó una repetibilidad muy baja y sus resultados fueron muy variables, por lo que sería recomendable confirmar la infección por *M. a. paratuberculosis* a través de otros métodos diagnósticos como los estudios bacteriológico y anatomopatológico.

Al comparar los resultados obtenidos con la IDGA con los obtenidos con ELISA en el rebaño I se observa que al inicio del presente estudio ambas técnicas detectaron el mismo número de caprinos con un porcentaje de coincidencia del 62.5%, así también que al progresar el estudio, el número de caprinos que detectaba cada una de las técnicas variaba siendo en algunos muestreos más alto el número de caprinos que detectaba la IDGA,

mientras que en otros era mayor los que detectaba ELISA (Cuadro no. 2.1 y Figura 3). Es posible que esto se haya debido a que el ELISA detectaba a los caprinos positivos antes que IDGA, de esta manera los caprinos que aparecían como positivos a ELISA en un muestreo determinado, los detectaría IDGA uno o dos muestreos más tarde. Esta explicación se adapta a lo observado en la última toma de muestras donde IDGA detecta 7 caprinos positivos y ELISA 16. Asimismo, este resultado reforzaría lo expuesto por algunos autores en el sentido de que ELISA detecta la respuesta inmune temprana (Kreeger, 1991; Molina *et al*, 1990). Sin embargo, como se puede apreciar en el Cuadro no. 2.1. hubo algunos casos en que ambas técnicas detectaron al mismo caprino en el mismo muestreo o bien hubo caprinos que sólo fueron detectados por una sola prueba, lo que señalaría la necesidad de pruebas serológicas altamente confiables para el diagnóstico de paratuberculosis caprina (Cocito *et al*, 1994).

En el primer muestreo del rebaño II, la IDGA detectó 5 caprinos mientras que ELISA detectó 6 por lo que aparentemente ambas pruebas funcionaron igual, sin embargo no fueron los mismos caprinos los que detectaron ambas técnicas (Cuadro no. 2.2. y Figura 4). Por otro lado, en el segundo muestreo ambas técnicas coincidieron al no detectar ningún caprino positivo. De igual forma en el tercer muestreo ambas técnicas detectan el mismo número de caprinos positivos, lo que señala que ambas arrojan el mismo resultado en el diagnóstico de rebaño, pero al evaluar el diagnóstico individual no hay coincidencia en los resultados (Cuadro no. 2.2.). Finalmente en los últimos dos muestreos es notable el incremento de caprinos que detecta ELISA al compararla con IDGA, la razón de este incremento podría atribuirse por una parte a que los caprinos detectados por ELISA fueron infectados recientemente con *M. a. paratuberculosis* y que la ELISA está detectando una respuesta inmune humoral temprana (Kreeger, 1991; Molina *et al*, 1990), esto se podría atribuir a reacciones cruzadas o bien caprinos que estuvieron expuestos a *M. a. paratuberculosis* pero que se recuperaron (Chiodini *et al*, 1984).

En el rebaño III se observó que en el primer muestreo, la IDGA detectó más caprinos positivos que el ELISA (Cuadro no. 2.3. y Figura 5), sin embargo en el segundo muestreo ELISA detectó mas caprinos positivos que IDGA, en el tercer muestreo esta tendencia vuelve a invertirse y para el cuarto muestreo IDGA no detecta ningún caprino

mientras que ELISA detecta 31 caprinos. En el último muestreo IDGA detecta 3 caprinos y ELISA 27. Lo anterior indica que ninguna de las técnicas fue lo suficientemente sensible y específica para poder descartar los falsos positivos y asimismo, ninguna de ellas tuvo repetibilidad ni un comportamiento coherente a lo largo de los muestreos como se puede apreciar en el Cuadro no. 2.3., además de que fueron muy pocos los caprinos detectados en que coincidieron ambas técnicas. Cuando los resultados de las pruebas serológicas son tan variables como en este rebaño es recomendable confirmar la infección a través de otros métodos diagnósticos como el estudio bacteriológico y el anatomopatológico.

El estudio anatomopatológico en el presente estudio comprendió la realización de necropsias de algunos de los caprinos positivos a IDGA, ELISA o ambas, así como de algunos caprinos con sospecha clínica de paratuberculosis. En el rebaño I las necropsias fueron de gran ayuda ya que se observaron lesiones intestinales y linfáticas características de paratuberculosis en la mayoría de ellas, este hallazgo no concuerda con lo descrito por Godu *et al* 1980 (citado en Juste 1994), quien describe que en esta especie no se observa engrosamiento de la mucosa intestinal. Por su parte otros autores describen que las lesiones macroscópicas intestinales en los venados, cabras y borregos son discretas y consisten en un ligero engrosamiento de la pared intestinal (Eamons *et al*, 1988 citado en Hietala 1992; Morin, 1982; Nyange 1990); sin embargo en el presente estudio se observaron lesiones tan graves como las descritas en los bovinos (Buergelt *et al*, 1978). Esto posiblemente dependa de la evolución del proceso de infección por *M. a. paratuberculosis* dentro del rebaño, y del tipo de respuesta inmunológica, ya que se ha descrito que las lesiones más discretas se encuentran en animales cuya respuesta inmune es del tipo celular, mientras que las lesiones más graves son propias de los que presentan una respuesta del tipo humoral (Clarke, 1997). Al realizar el estudio histopatológico de tejido intestinal y linfoide se observaron lesiones granulomatosas que iban de focos discretos hasta lesiones graves y difusas, notándose que en las lesiones más discretas se observaron menos baar, mientras que en las lesiones difusas la cantidad de baar iba de moderada a abundante. Asimismo, se confirmó la relación propuesta por Pérez (Pérez *et al*, 1992), donde sugiere que los ovinos con lesiones granulomatosas difusas con abundantes baar (tipo IIIb) serán claramente positivas a IDGA, mientras que los ovinos con lesiones tipo II y IIIa pueden ser positivos a

IDGA, en el rebaño I todos los caprinos que presentaron estas últimas lesiones fueron positivos a IDGA. Se ha descrito que los pequeños rumiantes pueden presentar focos granulomatosos, algunos de estos mineralizados (Morin 1982) en diversos linfonódulos del organismo, así como en hígado, bazo y pulmón. En el presente estudio 4 caprinos presentaron focos periportales discretos de mononucleares en el hígado, y un quinto presentó hepatitis granulomatosa multifocal grave con abundantes baar. Se ha descrito la presencia de lesiones granulomatosas en el hígado de animales infectados con *M. a. paratuberculosis*, en las que se observan eventualmente escasos baar (Morin 1982). En el presente estudio se apreciaron abundantes baar en el hígado de uno de los caprinos, lo que señalaría una grave diseminación de la infección con *M. a. paratuberculosis* en este caprino. En este mismo rebaño se realizó la necropsia de 4 caprinos con sospecha clínica de paratuberculosis (Cuadro no. 5) únicamente en 2 de ellos se confirmó este diagnóstico a través del estudio anatomopatológico y en uno de ellos por bacteriológico, en el otro caprino después de 20 semanas de incubación no fue posible obtener un aislamiento de *M. a. paratuberculosis*.

En el rebaño II las lesiones macroscópicas observadas a nivel intestinal y linfoide eran más discretas que las observadas en el rebaño I, sin embargo sí sugerían un cuadro de paratuberculosis. Este tipo de lesiones posiblemente serían más representativas de lo descrito por algunos autores ( Hietala 1992; Morin 1982; Nyange 1990). Las lesiones microscópicas eran de igual forma focales así como discretas y sólo en un caprino se apreciaron baar. Lo anterior coincide con la clasificación hecha por Pérez (Pérez *et al*, 1992; Pérez *et al*, 1996), ya que los 4 caprinos presentaron lesiones tipo II y 3 de ellos fueron positivos a IDGA.

Las lesiones macroscópicas observadas en el rebaño III son similares en gravedad y distribución a las observadas en el rebaño II por lo que corresponderían a lo descrito por algunos autores ( Hietala 1992; Morin 1982; Nyange 1990). Así también 2 caprinos de este rebaño presentaron sufusiones en la mucosa intestinal, esta lesión ha sido asociada a paratuberculosis en pequeños rumiantes (Hietala 1992). Con respecto a la relación establecida por Pérez (Pérez *et al*, 1993), las cabras cuyas lesiones fueron clasificadas como II y IIIa fueron positivas a IDGA. Se ha descrito que en las lesiones microscópicas

asociadas con paratuberculosis se pueden encontrar eosinófilos, en el presente estudio se apreciaron eosinófilos en algunas de las lesiones microscópicas de este rebaño, sin embargo estos fueron asociados a la presencia de estructuras parasitarias compatibles con *Eimeria* spp. En este sentido se ha descrito que en algunos ovinos afectados con paratuberculosis además de presentar las lesiones propias de esta enfermedad se han observado también eosinófilos, células gigantes de cuerpo extraño y restos parasitarios encapsulados por tejido conectivo por lo que esta lesiones deberán asociarse con agentes parasitarios y no con *M. a. paratuberculosis* (Condrón *et al*, 1994). En este mismo rebaño se realizó la necropsia de una cabra con sospecha clínica de paratuberculosis debido su pobre estado corporal, en la cual no se apreciaron cambios patológicos aparentes ni fue posible confirmar el diagnóstico de paratuberculosis a través del estudio bacteriológico; aunque la pérdida progresiva de peso ha sido considerada en los caprinos como indicio de la enfermedad (Gezon *et al*, 1988) no debe asociarse siempre con ésta, ya que existen otros procesos de origen parasitario que producen también pérdida progresiva de peso.

En los 3 rebaños se apreciaron lesiones microscópicas focales y muy discretas algunas con escasos baar mientras que en otras estaban ausentes. Este tipo de lesiones se han asociado a la fase preclínica o subclínica de la enfermedad, donde las lesiones están localizadas (focales) y los baar son escasos y por tanto difíciles de detectar. Aunque se considera que este tipo de lesiones se asocia con mayor frecuencia a agentes parasitarios, no debe descartarse que se trate de una infección por *M. a. paratuberculosis* ya que esta micobacteria puede presentar ultraestructuralmente deficiencia en la formación de su pared lo que traería como consecuencia la negatividad al Ziehl Neelsen (Bendixen *et al*, 1981; Condrón *et al*, 1994). También Pérez en su clasificación incluye como positivos a ovinos con lesiones granulomatosas sin baar (Pérez *et al*, 1992; Pérez *et al*, 1996).

Las lesiones microscópicas observadas en el presente estudio caerían dentro del espectro lepromatoso de la respuesta inflamatoria provocada por las micobacterias, lo que coincide con lo que se ha descrito en otros trabajos (Cocito *et al*, 1994; Kreeger 1991).

Aunque se ha mencionado que la paratuberculosis en los borregos y especialmente en las cabras, recuerda la tuberculosis (Hietala 1992; Barker *et al*, 1993) debido a la presencia de caseificación y mineralización de las lesiones entéricas y linfáticas, en el

presente estudio no se observó caseificación en ningún tejido y la presencia de mineralización fue muy discreta y escasa. Se han descrito casos donde ambas infecciones están presentes en el mismo caprino (Bernabé *et al*, 1991).

En el presente estudio los caprinos de los rebaños II y III presentaron lesiones discretas y focales las cuales pudieron ser identificadas macroscópicamente a través de una revisión minuciosa del yeyuno, íleon, válvula ileocecal, así como de los linfonódulos regionales. Considerando lo anterior, se piensa que no hubiera sido posible identificar estos casos utilizando biopsias intestinales, ya que por una parte estas biopsias en algunas ocasiones se realizan a partir del recto, sitio donde únicamente 25% de los animales infectados con *M. a. paratuberculosis* presentan lesiones, aunque este porcentaje puede verse afectado por el grado y la extensión de la infección. Asimismo, el recto representa únicamente la última parte de todo el tracto intestinal, el cual no es de elección para encontrar lesiones ocasionadas por el *M. a. paratuberculosis* (Chiodini *et al*, 1984). Por otra parte, algunos autores recomiendan realizar biopsias del íleon terminal y del linfonódulo ileocecal para confirmar casos serológicamente positivos a paratuberculosis y sugieren que si un animal seropositivo no se confirma con la biopsia éste debe ser considerado como falso positivo (Collins 1996; Julian 1975), lo que en un momento dado restaría especificidad al ELISA, siendo que posiblemente el estudio histopatológico fue el que arrojó un falso negativo por no haberse elegido un área con lesiones representativas. En este sentido Juste sugiere que si se obtiene un resultado negativo del examen histopatológico se deberá esperar a obtener el resultado del cultivo a partir de este mismo tejido. Así también menciona que aunque en algunos casos el examen histopatológico y bacteriológico de biopsias de porciones finales del íleon o del linfonódulo ileocecal, se han utilizado en algunos casos como medio de diagnóstico especialmente seguro, este método debe ser reservado únicamente cuando se investiguen animales de gran valor (Juste 1994).

En el presente estudio la realización de necropsias y exámenes histopatológicos resultó confiable para el diagnóstico de paratuberculosis en caprinos, lo que coincide con lo descrito por Eamons, quien a través del estudio histopatológico logró identificar al 54% y 82% de animales infectados con *M. a. paratuberculosis*, en 2 estudios diferentes (Eamons 1988 citado en Hietala 1992). Por su parte Condrón *et al*, sostienen que la histopatología es

la técnica más sensible para la confirmación de enfermedad de Johne, particularmente cuando ésta es realizada por patólogos expertos que examinen minuciosamente diversos fragmentos de tejido intestinal, elegidos considerando las regiones intestinales donde las lesiones de paratuberculosis inician como son las placas de Peyer (Chávez Gris *et al*, 1992), o bien los sitios donde estas lesiones se localizan con mayor frecuencia como son el íleon terminal y la válvula ileocecal (Burgelt *et al*, 1978; Juste 1994). Así también, se ha descrito que el cultivo bacteriológico de los tejidos es útil en conjunto con la histología ya que se pueden identificar infecciones cuando las lesiones no son concluyentes o cuando la sección de tejido estudiada histológicamente no presenta lesiones, o bien cuando los organismos ácido alcohol resistentes son difíciles de identificar en las lesiones granulomatosas (Condon *et al*, 1994) debido a la ausencia total o parcial de la pared micobacteriana (Bendixen *et al*, 1981).

En el presente estudio las necropsias y el estudio histopatológico realizados en los 3 rebaños resultaron confiables en la confirmación de los diagnósticos serológicos de paratuberculosis. Así también se observó que el elegir las placas de Peyer, el íleon terminal y la válvula ileocecal para el estudio histopatológico facilita el diagnóstico cuando no existen lesiones macroscópicas aparentes.

En el estudio bacteriológico el mayor número de aislamientos de *M. a. paratuberculosis* fueron obtenidos a partir de la válvula ileocecal y del linfonódulo mesentérico, estas observaciones coinciden con lo descrito por algunos autores (Collins 1996; Julian 1975).

La mayor parte de los aislamientos se obtuvieron de tejido que no fue tripsinizado por lo que la tripsinización, cuya utilidad en la purificación de *M. a. paratuberculosis* es evidente (Ratnamohan *et al*, 1986), no fue de gran ayuda para la obtención de los aislamientos en el presente estudio. Es posible que la explicación de esta observación sea que la tripsina afectó a la micobacteria alterando su estructura antes de poderse adaptar al medio de cultivo o bien, que la tripsina no causó ningún efecto favorable en la purificación de las micobacterias y por esto tardaron en crecer lo mismo que el cultivo sin tripsinizar.

Con el aislamiento y la eliminación en los 3 rebaños de los caprinos que resultaron positivos a IDGA se pretendía seguir un control de la enfermedad bajo la estrategia "Probar

y Eliminar”, misma que ha sido descrita bajo diferentes normas por varios autores ( Collins, 1994a; Chiodini *et al*, 1984; Gay *et al*, 1992; Gezon *et al*, 1988; Juste 1994). Se eligió aislar y eliminar a los caprinos que resultaban positivos en primera instancia a IDGA ya que esta técnica ha mostrado alta confiabilidad en el diagnóstico de paratuberculosis en caprinos (Collins 1996; Sherman *et al*, 1980). Como se mencionó anteriormente en el rebaño I no fue posible eliminar oportunamente a los caprinos que resultaban positivos a IDGA en cada uno de los muestreos. La mayoría de los caprinos que resultaron positivos en los primeros tres muestreos se separaron y se eliminaron lo más pronto posible, por lo que hasta este punto se observaba un decremento significativo en el porcentaje de caprinos positivos a IDGA. Al comparar el porcentaje de caprinos positivos a IDGA del tercer muestreo con los del cuarto se nota un incremento significativo ( $\alpha= 0.01$ ) en este porcentaje. Este incremento fue el resultado de una ineficiente separación y eliminación de los caprinos seropositivos, también posiblemente influyó el período de partos de este rebaño. Se ha establecido que diversos factores desencadenantes del estrés como son los partos, nutrición insuficiente, intensa producción láctea, infecciones parasitarias y el pastoreo en suelos bajos en minerales pueden promover la presentación clínica. Sin embargo, la influencia de estos factores en el desarrollo del cuadro clínico es aún desconocida (Allen *et al*, 1968; Downham 1950; Macindoe 1950; Smyth 1935 citados en Chiodini *et al*, 1984). Entre el cuarto y quinto muestreo esta tendencia continuó, influenciada por el factor descrito anteriormente así como por el incumplimiento en el programa de control. Entre el quinto y sexto muestreo se observó un decremento significativo ( $\alpha= 0.01$ ) en el porcentaje de caprinos positivos a paratuberculosis, este decremento puede deberse a que se decidió eliminar nuevamente del rebaño a la mayoría de los caprinos detectados como positivos a Paratuberculosis por la IDGA. Además de que en el sexto muestreo solo hubo un caso nuevo de Paratuberculosis detectado por la IDGA. Finalmente, entre el sexto y séptimo muestreos volvió a incrementarse significativamente ( $\alpha= 0.01$ ) el porcentaje de caprinos positivos a paratuberculosis por IDGA, posiblemente este incremento se deba a que no se eliminaron todos los caprinos positivos a IDGA identificados en los muestreos anteriores, y algunos de ellos ni siquiera fueron separados del resto del rebaño, lo que influye notablemente en la diseminación de la infección dentro

de cualquier rebaño con el consecuente surgimiento de nuevos casos clínicos (Collins 1994; Elskén *et al*, 1985; Gay *et al*, 1992; Gezon *et al*, 1988; Gilmour 1976; Julian 1975; Juste *et al*, 1993; Juste 1994; Thomas 1983). Los factores descritos anteriormente explican por qué al final del presente estudio no hubo diferencia significativa ( $\alpha= 0.01$ ) entre la prevalencia inicial y final de paratuberculosis.

En los rebaños II y III la separación y eliminación de los caprinos positivos a IDGA se realizó como indica el programa de control. Aunque entre algunos muestreos se notaron incrementos significativos ( $\alpha= 0.01$ ) en el porcentaje de caprinos positivos a IDGA, finalmente se logró un decremento significativo ( $\alpha= 0.01$ ) en la prevalencia final de paratuberculosis dentro de este rebaño. Este resultado coincide con lo descrito por algunos autores acerca de la confiabilidad de la IDGA para el diagnóstico de la paratuberculosis caprina (Juste 1994; Sherman *et al*, 1980; Stehman 1996), así como su utilidad como herramienta de diagnóstico cuando se quiere establecer un programa “Probar y Eliminar” en caprinos (Gezon *et al*, 1988; Thomas 1983)

Aunque en el rebaño III no fue posible comparar los resultados obtenidos a través de la IDGA con el estudio anatomopatológico y bacteriológico aparentemente existió un decremento significativo ( $\alpha= 0.01$ ) de la prevalencia de paratuberculosis en este rebaño.

A través del teorema de Bayes se determinaron los valores predictivos positivo y negativo (VPP, VPN) de la IDGA y del ELISA en los 3 rebaños. En el presente estudio la IDGA mostró valores predictivos tanto positivo como negativo, mucho más altos y por tanto más confiables que el ELISA. Mientras que el ELISA mostró un VPN comparable al de la IDGA, pero su VPP fue muy bajo (Cuadros no. 9.2., 10.2. y 11.2.). Esta observación posiblemente se deba a que el ELISA utilizado en el presente estudio tiene una especificidad de 75% y una sensibilidad de 64% (García Marín *et al*, 1991), lo que hizo que su VPP fuera muy bajo afectado éste por la sensibilidad de esta técnica (Cuadros no. 9.2., 10.2. y 11.2.). Se ha descrito que el VPP y VPN están influidos por la prevalencia de paratuberculosis en un rebaño. Así mientras la prevalencia sea mas alta, el VPP de una prueba diagnóstica irá aumentado de igual forma y por su parte el VPN irá disminuyendo (Collins 1991; Molina *et al*, 1990). En este sentido Molina *et al*, describen que en rebaños con prevalencia serológica muy baja los caprinos seropositivos deben ser confirmados por

el aislamiento bacteriológico a partir de heces y consideran que el ELISA presenta su funcionamiento óptimo en rebaños con prevalencias entre 20 y 60% en los que estiman que ambos valores predictivos serán mayores al 80% (Molina *et al*, 1990). Si esta última observación se enfoca a través de la probabilidad, el diagnóstico con el ELISA de un animal infectado con *M. a. paratuberculosis*, tendrá una probabilidad mas alta de ser exitoso cuando la prevalencia de paratuberculosis dentro del rebaño sea elevada. Sin embargo, es importante considerar que lo ideal para cualquier prueba de diagnóstico sería que ésta mantuviera su sensibilidad y especificidad sin que éstas últimas se vieran afectadas por la prevalencia de paratuberculosis dentro del rebaño.

Existen múltiples prácticas de manejo que pueden adoptarse en un rebaño para el control de paratuberculosis (Collins, 1994a; Chiodini *et al*, 1984; Gay *et al*, 1992; Gezon *et al*, 1988; Juste 1994), las cuales consideran las características y necesidades de cada rebaño; sin embargo, en los 3 rebaños estudiados no era posible que adoptaran alguna práctica de manejo por lo que se optó únicamente por separar a los caprinos que resultaron positivos a IDGA.

En el presente estudio no se logró erradicar la enfermedad en ninguno de los 3 rebaños, ya que el tiempo en que se evaluaron los 3 rebaños fue muy corto y en promedio un programa de control de paratuberculosis debe adoptarse por un período que oscila entre 5 y 7 años (Collins 1991; Gezon *et al*, 1988; Juste *et al*, 1993).

Como se pudo apreciar a través de la densidad de incidencia (Figura no. 7) en los 3 rebaños, el comportamiento de la prevalencia fue variable ya que iba en aumento y decremento a lo largo de los muestreos sin mostrar una tendencia clara lo que podría atribuirse a que no hubo prácticas de manejo ni un programa estricto de eliminación.

Para conocer la efectividad de las prácticas de manejo y eliminación desarrolladas para bovinos, al ser adoptadas en rebaños caprinos es importante desarrollar estudios que verifiquen la funcionalidad de estas medidas. Sin embargo, para lograr una evaluación objetiva de estas prácticas de manejo, y de esta manera eliminar confiablemente a los caprinos que resulten positivos, se hace necesario optimizar las técnicas de diagnóstico temprano de paratuberculosis ya existentes como el ELISA y promover la utilización de las que ya han mostrado ser altamente confiables como el estudio anatomopatológico, en el que

se deben uniformar los criterios para establecer el diagnóstico de paratuberculosis en caprinos.

## LITERATURA CITADA

1. ALEMÓN R.S.: Estudios de Paratuberculosis (*Mycobacterium paratuberculosis*) en una explotación ovina comercial en el municipio de Visitación, México. Tesis. México (Edo. de México): *FES Cuautitlán*, 1988.
2. ANDERSON W.I., KING J.M. 1993: *Mycobacterium avium* infection in a pygmy goat. *Vet Rec*; 133 : 502.
3. ANÓNIMO: Memoria de la IV Reunión Anual del Consejo Técnico Consultivo Nacional de Salud Animal. P. 281-336, 1995.
4. BARKER I.K., VAN DREUMEL A.A. and PALMER N. 1993: The alimentary system. In: Pathology of Domestic Animals, vol. 2, 4<sup>th</sup> edic. K.F.V. Jubb, P.C. Kennedy and N. Faimer. *Academic Press*, San Diego, CA, E.U.
5. BELKNAP E.B., GETZY D.M., JOHNSON L.W., ELLIS R.P., THOMPSON G.L., SHULAW W.P. 1994: *Mycobacterium paratuberculosis* infection in two llamas. *J Am Vet Med Assoc*; 204: 1805-1808.
6. BENDIXEN P.H., BLOCH B., JORGENSEN J.B. 1981: Lack of intracellular degradation of *Mycobacterium paratuberculosis* by bovine macrophages infected in vitro and in vivo: light microscopic and electron microscopic observations. *Am J Vet Res*; 42: 109-113.
7. BERNABÉ A., GÓMEZ M.A., NAVARRO J.A., GÓMEZ S., SÁNCHEZ J., SUDRACH J., MECHÉN V. 1991: Pathological changes of spontaneous dual infection of tuberculosis and paratuberculosis in goats. *Small Ruminant Res*; 5: 377-390.
8. BUERGELT C.D., HALL C., McENTEE K. and DUNCAN J.R. 1978: Pathological Evaluation of Paratuberculosis in Naturally Infected cattle. *Vet Pathol*; 15: 196-207.
9. BURNSIDE D.M. and B.O. ROWLEY 1994: Evaluation of an enzyme linked immunosorbent assay for diagnosis of paratuberculosis in goats. *Am J Vet Res* 1994; 55: 465-466
10. CLARKE C.J., and LITTLE D. 1994: Histopathological and morphometric changes in the intestine in ovine paratuberculosis. 4<sup>th</sup> Intl Colloq Paratuberculosis. Cambridge U.K
11. CLARKE C.J. 1997: The Pathology and Pathogenesis of Paratuberculosis in Ruminants and Other Species. *J Comp Path*; 116: 217-261.

12. COCITO C., GILOT P., COENE M., DEKESEL M., POUPART P. and VANNUFFEL P. 1994: Paratuberculosis. *Clinical Microbiol Reviews*; 17: 328-345.
13. COLSTON A., McCONNELL I. And BUJDOSO R. 1994: A role for the 60-kDa stress protein in the cellular immune response to *M. paratuberculosis* infection in sheep. 4<sup>th</sup> *Intl Colloq Paratuberculosis*. Cambridge U.K
14. COLLINS M.T., MANDT K., SOCKETT D.C. 1989: ELISA is superior to AGID for serological confirmation of clinical Johne's disease in cattle. *The Paratuberculosis Newsletter*; 6: 20-23.
15. COLLINS M.T., KENEFICK D.B., SOCKETT D.C., LAMBRECHT R.S., MCDONALD J. and JORGENSEN J.B. 1990: Enhanced radiometric detection of *M. paratuberculosis* using filter concentrated fecal specimens. *J Clin Microbiol*; 28: 2514-2519.
16. COLLINS M.T. 1991: 7<sup>th</sup> annual school of veterinary medicine posgraduate confrence. Module 5: Selling Johne's Disease Control as a Preventive Medicine Program. School of Veterinary Medicine, University of Wisconsin..
17. COLLINS M.T. 1994a: Diagnosis and Control of Paratuberculosis. 4<sup>th</sup> *Intl Colloq Paratuberculosis*. Cambridge U.K
18. COLLINS M.T. and ZHAO B.Y. 1994b: Comparison of radiometric fecal culture, serum antibody ELISA, and gamma interferon tests for early diagnosis of paratuberculosis in experimentally infected Holstein calves. 4<sup>th</sup> *Intl Colloq Paratuberculosis*. Cambridge U.K.
19. COLLINS M.T. 1994c: Clinical approach to control of bovine paratuberculosis. *J Am Vet Med Assoc*; 204: 208-210.
20. COLLINS M.T. 1994d: Early Diagnosis of *M. paratuberculosis* Infections in young Cattle. *Proc of the 15<sup>th</sup> Technical Conference on Artificial Insemination & Reproduction*. E.U.
21. COLLINS M.T. 1996: Diagnosis of Paratuberculosis. In *The Veterinary Clinics of North America*; 12: 357-376 .
22. CONDRON R.J., SCHROEN C.J., BLACK C.A., RIDGE S.E., and HOPE A.F. 1994: Histological confirmation of subclinical infection with *M. paratuberculosis* in cattle. 4<sup>th</sup> *Intl Colloq Paratuberculosis*. Cambridge U.K
23. CRANWELL M. P. 1993: Control of Johne's disease in a flock of sheep by vaccination. *Vet Rec*; 133: 219-220.

24. CHÁVEZ GRIS G., GARCÍA MARÍN J.F., ADÚREZ G., MORENO B., GUTIÉRREZ M., and BADIOJA J.J. 1992: Preliminary results of the comparative study of early response to *M. avium* and *M. paratuberculosis* in experimentally infected lambs. *Med Vet*; 9: 16-18.
25. CHÁVEZ G.G.: Estudio comparativo de la respuesta a *M. avium* y *M. paratuberculosis* en corderos infectados experimentalmente. Tesis doctoral. España (Zaragoza): *Facultad de Veterinaria* 1993.
26. CHIODINI R.J., VAN KRUININGEN H.J., MERKAL R.S. 1984: Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): The current status and future prospects. *Cornell Vet*; 74: 218-262.
27. CHIODINI R.J. 1989: Crohn's Disease and the Mycobacterioses: a Review and Comparison of Two Disease Entities. *Cl Microbiol Rev*; 2: 90-117.
28. CHIODINI R.J., DAVIS W.C. 1992: The cellular immunology of bovine paratuberculosis: the predominant response is mediated by cytotoxic gamma/delta T lymphocytes which prevent CD4<sup>+</sup> activity. *Microbial Pathogenesis*; 13: 447-463.
29. DANIEL W.: Bioestadística: base para el análisis de las ciencias de la salud. *Limusa*. México, 1980.
30. ELSKEN L.A.; LEWIS-HINTZ A.M., WHIPPLE D.L.: 1985 The pathogenesis, diagnosis, and control of paratuberculosis (Johne's disease) in goats. *Proc Am Assoc Vet Lab Diagn*; 121-130, Ames, IA, EU.
31. GARCÍA MARÍN J.F., CHÁVEZ GRIS G., PÉREZ PÉREZ V., ADÚRIZ J.J., JUSTE R. y BADIOLA J.J. 1991: Estudio de lesiones intestinales en caprinos procedentes de rebaños afectados de Paratuberculosis y comparación de métodos de diagnóstico. *IV Jornadas sobre Producción Animal de la Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario Vol. extra*: 650-652.
32. GARCÍA MARÍN J.F. 1993. Informe Técnico, Lab. Pitman Moore, España.
33. GAY J.M., SHERMAN D.M. 1992: Factors in the epidemiology and control of ruminant paratuberculosis. *Vet Med*; 10: 1133-1139.
34. GEZON H.M., BITHER H.D., GIBBS H.C. 1988: Identification and control of paratuberculosis in a large goat herd. *Am J Vet Res*; 49 : 1817-1819.
35. GILMOUR N.J.L. 1976: The pathogenesis, diagnosis and control of Johne's disease. *Vet Rec*; 99: 433-434.

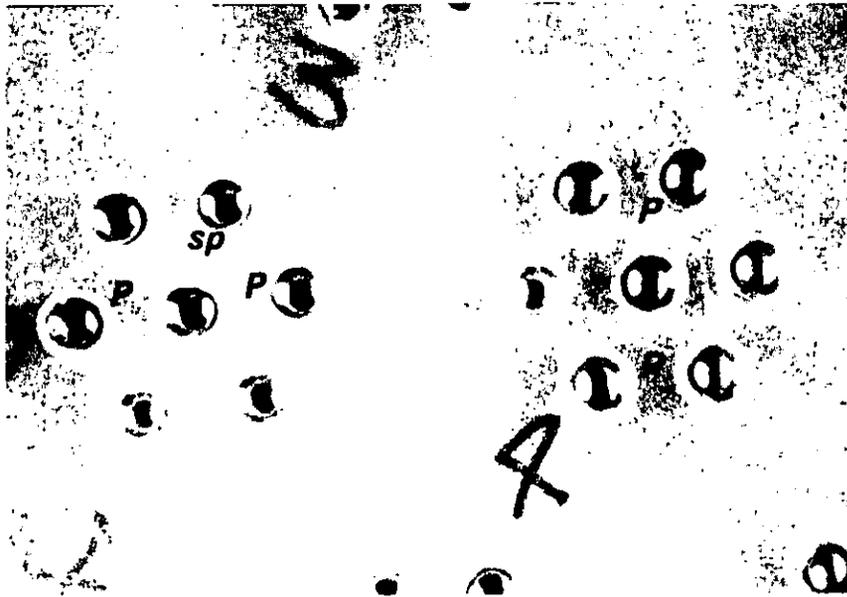
36. GOUDSWARD J., TERPORTEN-PASTOORS, W.W.M. 1972: Johne's disease in Goats: Comparison of serological tests. *Neth J Vet Sci*; 4: 2.
37. GUILLOU J.P., KAROUI C., HENAULTS S. and THOREL M.F. 1994: Detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in fecal samples, pathological samples and formalin fixed, paraffin-embedded tissues, by polymerase chain reaction. 4<sup>th</sup> Intl Colloq Paratuberculosis. Cambridge U.K.
38. HARLOW E., LANE D.: Antibodies. A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Lab. Press.* N.Y., EU., 1988.
39. HENNEKENS C.H. BRING J.E.: Epidemiology in Medicine. *Little Brown.* Boston, 1987.
40. HERBERT W.J.: Veterinary Immunology: *Blackwell.* Philadelphia, PA, E.U., 1974.
41. HERNÁNDEZ V.V.C.: Ensayo de la inmunización subcutánea con una bacterina oleosa de *Mycobacterium paratuberculosis* en un rebaño ovino infectado naturalmente. Tesis de Maestría. México (Edo. de México): *FES Cuautitlán*, 1991.
42. HIETALA S.K. 1992: The options in diagnosing ruminant paratuberculosis. *Vet Med*; 10: 1122-1140.
43. HILBINK F., WEST D.M., DE LISLE G.W., KITTELBERGER R., HOSIE B.D. HUTTON J., COOKE M.M. and PENROSE M. 1994: Comparison of a complement fixation test, a gel diffusion test, and two absorbed and unabsorbed ELISAs for the diagnosis of paratuberculosis in sheep. *Vet Microbiol*; 41: 107-116.
44. JOHNSON C.T., WINKLER C.E., BOUGHTON E., PENFOLD J.W.F. 1993: *Mycobacterium kansasii* infection in a llama. *Vet Rec*; 133: 243-244.
45. JULIAN R.J. 1975: A short review and some observations of Johne's disease with recommendations for control. *Can Vet J*; 16: 33-43.
46. JUSTE R.A. and CASAL J.D. 1993: An economic and epidemiologic simulation of different control strategies for ovine paratuberculosis. *Prev Vet Med*; 15: 101-115.
47. JUSTE JORDÁN R.A. 1994: Paratuberculosis: una revisión. *Med Vet*; 11: 196-212.
48. KALIS C.H.J., VAN SCHAİK G., DIJKHUIZEN A.A., and BENEDICTUS G. 1994: Economic significance of vaccination against paratuberculosis. 4<sup>th</sup> Intl Colloq Paratuberculosis. Cambridge U.K.
49. KÖRMENDY B. 1994: The effect of vaccination on the prevalence of paratuberculosis in large dairy herds. *Vet Microbiol*; 41: 117-125.

50. KOZAREK, R.A. 1987: Extracolonic manifestations of inflammatory bowel disease. *Am Fam Physician*; 35: 205-211.
51. KREEGER J. 1991: Ruminant paratuberculosis -a century of progress and frustration. *J Vet Diagn Invest*; 3: 373-383.
52. LAMBRECHT R.S. and COLLINS M.T. 1992: *Mycobacterium paratuberculosis* Factors That Influence Mycobactin Dependence. *Diagn Microbiol Infect Dis*; 15: 239-246.
53. LEPPER A.W.D., WILKS C.R., KOTIWI M., WHITEHEAD J.T. and SWART K.S. 1989: Sequential bacteriological observations in relation to cell-mediated and humoral antibody responses of cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis* and maintained on normal or high iron intake. *Aust Vet J*; 66: 50-55.
54. LITTLE D., ALZUHERRI H.M. and CLARKE C.J. 1996: Phenotypic characterization of intestinal lymphocytes in ovine paratuberculosis by immunohistochemistry. *Vet Immunol Immunopath*; 55: 175-187.
55. MERKAL R.S. 1984: Paratuberculosis : Advances in cultural, serologic, and vaccination methods. *J Am Vet Med Assoc*; 184: 939-943.
56. MILNER A.R., MACK W.N., COATES K.J. 1989: A modified ELISA for the detection of goats infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Aust Vet J*; 66: 305-307.
57. MOLINA A., MARÍA CRESPO, MORELA L., and LLANÉS D. 1989: Paratuberculosis in goats: Serological diagnosis by ELISA test. *The Paratuberculosis Newsletter*; 2: 11-13.
58. MOLINA A., MADUENO R., FERNÁNDEZ J., LLANÉS D. 1990: Incidence of Serological Positivity in goat Paratuberculosis in Southern Spain by ELISA. *The Paratuberculosis Newsletter*; 2: 11.
59. MOLINA J.M., ANGUIANO A and FERRER O. 1996: Study on immune response of goats vaccinated with a live strain of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Comp Immun Microbiol Infect Dis*; 19: 9-15.
60. MOMOTANI E., ISHIKAWA Y. and YOSKINO T. 1986: Immunohistochemical distribution of immunoglobulin and secretory component in the ileum of normal and paratuberculosis-infected cattle. *J Comp Path*; 96: 659-669.

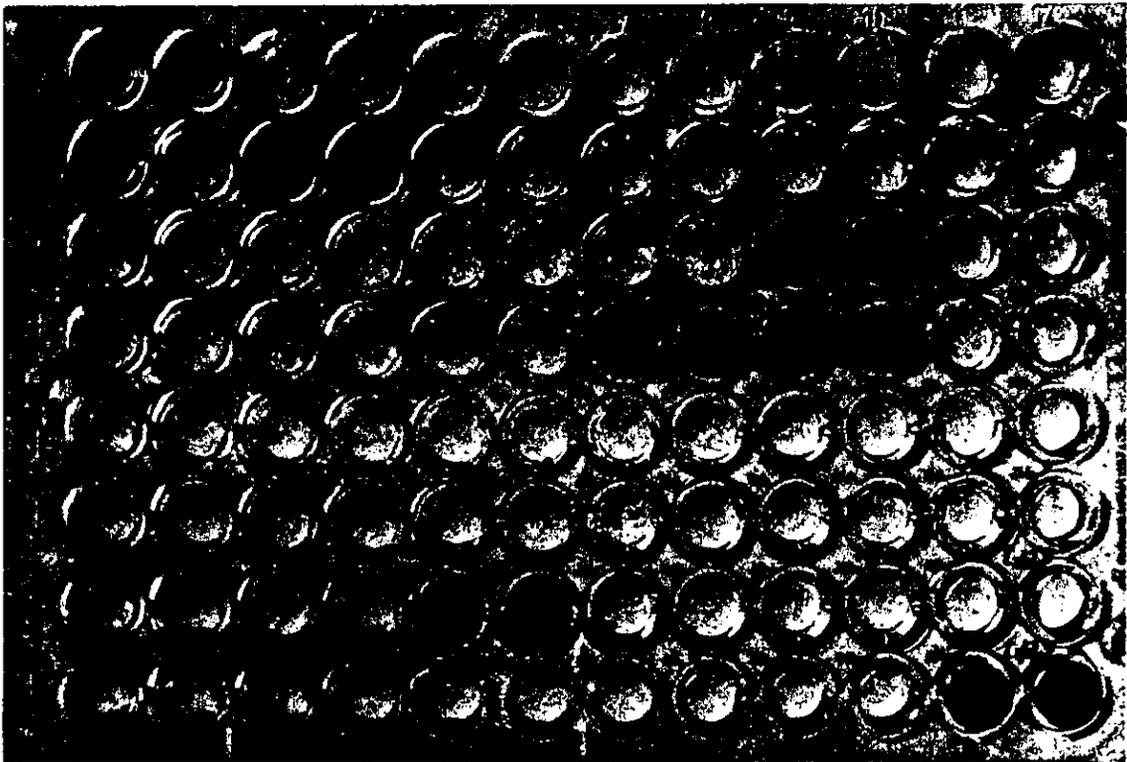
61. MOMOTANI E., WHIPPLE E., THIERMANN AL., and CHEVILLE N. 1988: Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches in calves. *Vet Path*; 25: 131-137.
62. MORIN M. 1982: Johne's Disease (Paratuberculosis) in Goats: A Report of Eight Cases in Quebec. *Can Vet J*; 23:55-58.
63. NAVARRO J.A., BERNABÉ A., GÓMEZ M.A., SÁNCHEZ J. and GÓMEZ S. 1991: Mycobacterial Antigen Detection by Immunohistochemistry in Goat Paratuberculosis. *J Vet Med B*; 38: 231-237.
64. NYANGE J.F.C.: Studies of Paratuberculosis of Red Deer. PhD Thesis. United Kingdom (Edinburgh): *University of Edinburgh*, 1990.
65. OVIEDO F.G.T.: Ensayo de una bacterina oral de *Mycobacterium paratuberculosis* en un rebaño ovino infectado naturalmente. Tesis de Maestría. México (Edu. de México). *FES Cuautitlán*, 1991.
66. PALIWAL O.P., RAJYA B.S., KRISHNA S.G. 1984: Comparative evaluation of diagnostic test for paratuberculosis in goats. *Indian J Anim Sci*; 54: 657-659.
67. PALIWAL O.P., KUMAN R., SOMVANSHI R. 1985: The immune spectrum of *Mycobacterium johnei* infection in goats. *Indian Vet J*; 62: 743-747.
68. PAVLIK I., BEJCKOVA L., KOSKOVA S., FIDXA B., KOMARKOVA O., and BEDRNA J. 1994 : DNA fingerprinting as a tool for epidemiological studies of paratuberculosis in ruminants and Crohn's disease . 4<sup>th</sup> Intl Colloq Paratuberculosis. Cambridge U.K.
69. PÉREZ V., GARCÍA MARÍN J.F., BADIOLA J.J. 1992: Pathological features in sheep naturally infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Med Vet*; 9: 20-22.
70. PÉREZ V., BOLEA R., CHÁVEZ G., CORTABARRIA R.A., JUSTE J.J., BADIOLA J.J. and GARCÍA MARÍN J.F. 1994a: Efficiency of PCR and culture in the detection of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in tissue samples of sheep. 4<sup>th</sup> Intl Colloq Paratuberculosis. Cambridge U.K.
71. PÉREZ V., GUTIÉRREZ C.M., TELLECHEA J., BADIOLA J.J. and GARCÍA MARÍN J.F. 1994b: Evaluation of the response to AGID and gamma- interferon tests in lambs infected with *Mycobacterium avium* subsp. *Silvaticum* and *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* and their relation with the diagnosis of ovine paratuberculosis. 4<sup>th</sup> Intl Colloq Paratuberculosis. Cambridge U.K.

72. PÉREZ V., GARCÍA MARÍN J.F., and BADIOLA J.J. 1996: Description and classification of different types of lesion associated with natural paratuberculosis infection in sheep. *J Comp Path*, 114: 107-122.
73. PRAXEDIS M.J.: Determinación de la prevalencia de paratuberculosis en caprinos y ovinos sacrificados en cuatro rastros periféricos al D.F. Tesis. México (Edo. de México): *FES Cuautitlán*, 1991.
74. RAMÍREZ C., TRIGO T.E., SUÁREZ G. F. 1979: MERKAL R.: Aislamiento e identificación de *Mycobacterium paratuberculosis* en México. *Téc Pec Méx*, 36: 74-76.
75. RATNAMOHAN T.N., SPENCER T.L. 1986: A technique for the purification of *Mycobacterium paratuberculosis* from the ileal mucosa of infected cattle. *Aust Vet J*, 63: 185-187.
76. SAMBROOK J., FRITSCH E.F., MANIATIS T.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> ed *Cold. Spring Harbor Lab. Press* N.Y. E.U. 1989.
77. SÁNCHEZ-VIZCAÍNO J.M., CAMBRA A.M.: Técnicas inmunoenzimáticas ELISA en patología animal y vegetal. 2da de. *Office International del Epizooties*. París, Francia, 1987.
78. SAXEGGARD F., FODSTAD F.H. 1980: Control of Paratuberculosis (Johne's Disease) in goats by vaccination. *Vet Rec* 1985; 116: 439-441.
79. SHERMAN D., GEZON H.M.: Comparison of Agar Gel Immunodiffusion and Fecal Culture for identification of goats with Paratuberculosis. *J Am Vet Med Ass*; 177: 1208-1211.
80. SHERMAN D., BRAY B., GAY J.M. 1989: Evaluation of the agar gel immunodiffusion test for the diagnosis of subclinical paratuberculosis. *Am J Vet Res*; 50: 525-530.
81. STEHMAN S.M. 1996: Paratuberculosis in small ruminants, deer and southamerican camelids. In *The Veterinary Clinics of North America*; 12:441-456.
82. THOMAS G.W.: Paratuberculosis in a large goat herd. *Vet Rec* 1983; 113: 464-466.
83. THOREL M., KRICHEVSKY M. and LEVY-FREBAULT V. 1990: Numeral Taxonomy of Mycobactin-Dependent Mycobacteria, Amended Description of *Mycobacterium avium*, and Description of *Mycobacterium avium* subsp nov., *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium* subsp *silvaticum* subsp nov. *Intl J Systematic Bacteriol*; 3: 254-260.

84. THORENSEN O.F., FALK K., EVENSEN O. 1994: Comparison of immunohistochemistry, acid-fast staining and cultivation for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in goats. *J Vet Diagn Invest*, 6: 195-199.
85. TRIGO T.F. 1979: Diagnóstico de la paratuberculosis (Enfermedad de Johne). *Vet Méx*, 10: 239-245.
86. VÉLEZ H.M., CHÁVEZ G.G., SUÁREZ G.F., COLLINS M.T. 1992: Adaptación de una prueba de ELISA en el diagnóstico de la paratuberculosis caprina en un rebaño de México. *Reunión Nacional de Investigación Pecuaria*, México, D.F. 1995.
87. WEIGAND-VALENTIN P., MORIARTY K.M. 1992: *Mycobacterium paratuberculosis* binds fibronectin. *Res Microbiol*, 143: 75-79.
88. WREN G. 1993: What's New With Johne's Disease? *Bovine Veterinarian*, 2: 40-44.
89. YOKOMIZO Y.H., MERKAL R.S. 1985: A method of avoiding false-positive reactions in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculosis. *Jpn J Vet Sci*, 47: 110-119.



**Figura 1. Diagnóstico serológico de paratuberculosis a través de la IDCA.** Se observan las bandas de identidad de los testigos positivos (p), así como la reacción positiva de algunos de los sueros problema (sp).



**Figura 2. Diagnóstico serológico de paratuberculosis a través del ELISA.** Se observan los testigos positivos (tp) y negativo (tn) ambos en duplicado, así como la positividad de algunos de los sueros problema.

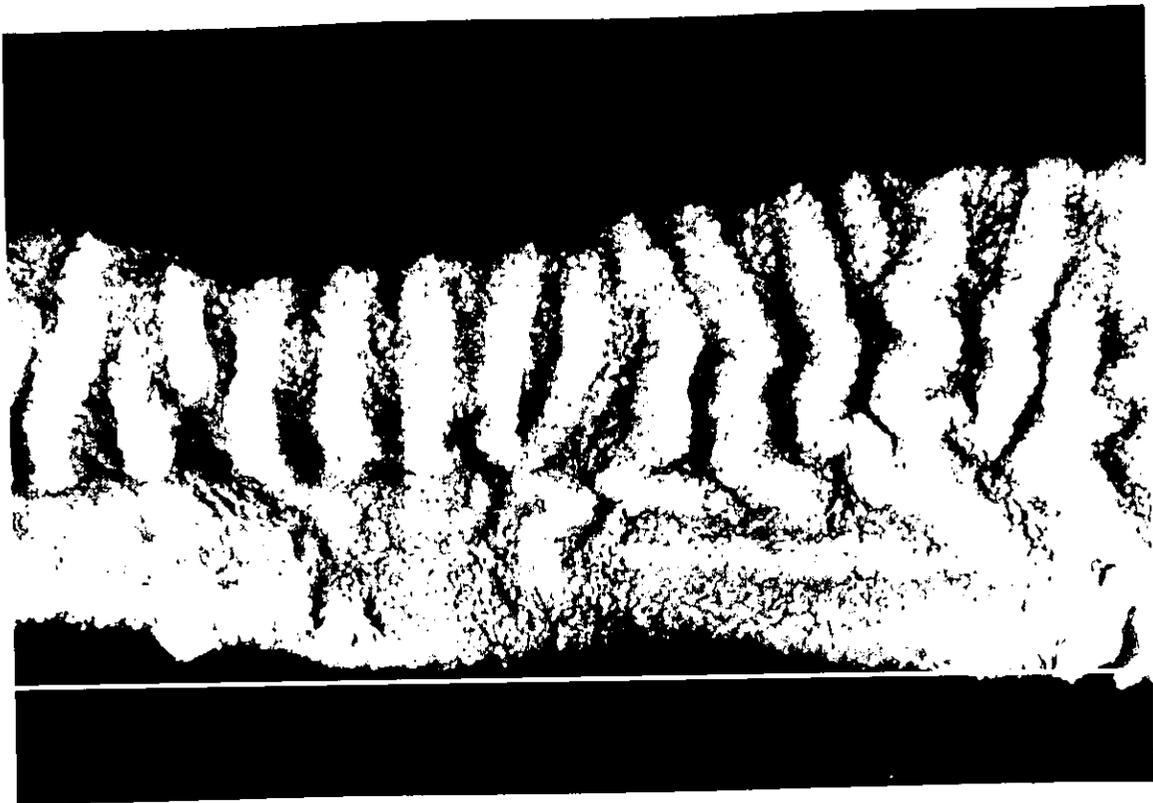


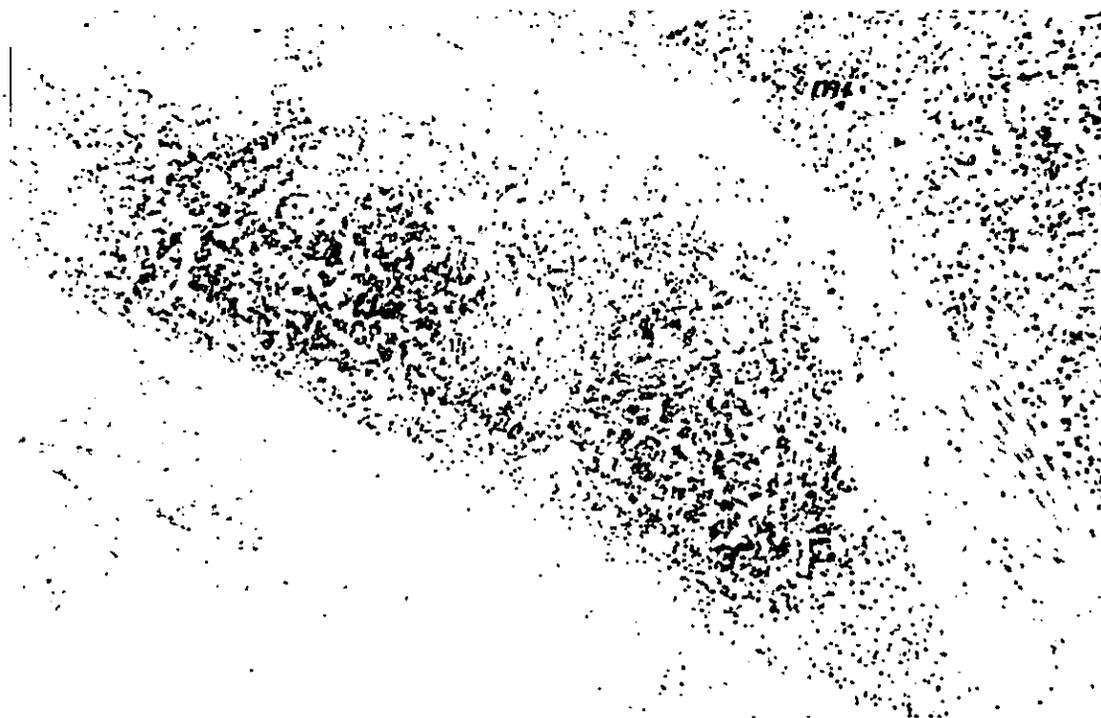
Figura 8. Intestino de caprino con lesiones graves asociadas a *M. a. paratuberculosis*. Fragmento intestinal en el que se observa engrosamiento importante de la pared intestinal, cabra 126, rebaño I.



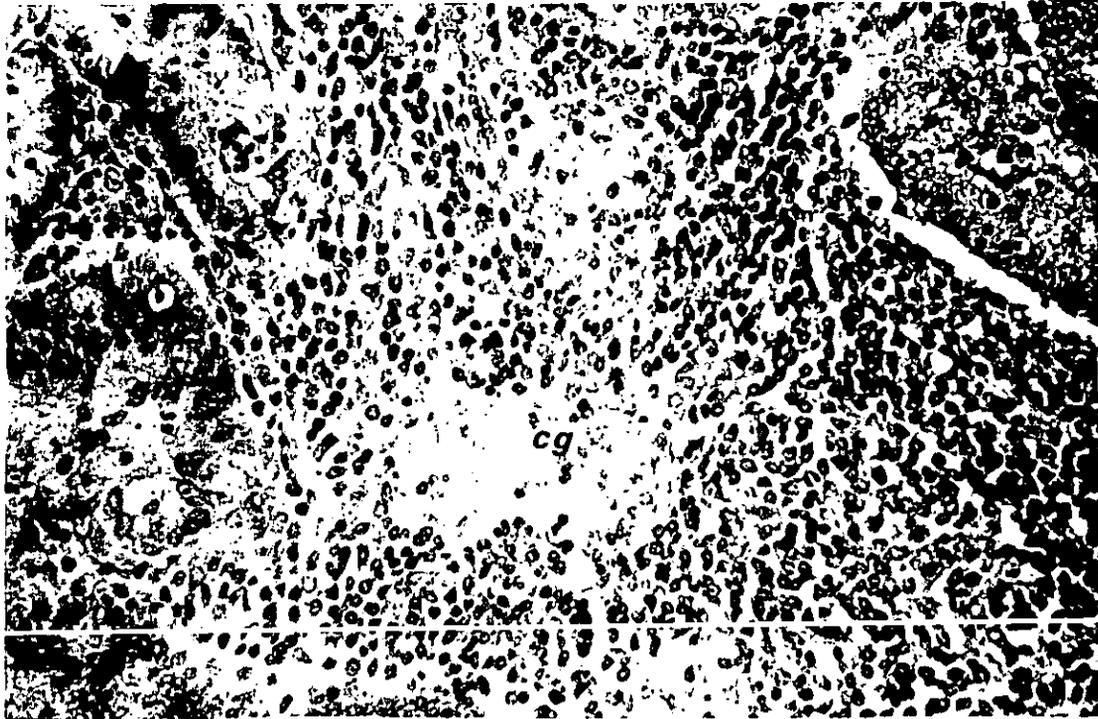
Figura 9. Intestino de caprino con lesiones moderadas asociadas a *M. a. paratuberculosis*. Fragmento intestinal con engrosamiento moderado y difuso de la pared intestinal, cabra 190, rebaño I.



**Figura 10.** Linfonódulo mesentérico de caprino con lesiones asociadas a *M. a. paratuberculosis*. Se observa linfadenomegalia y en la superficie de corte pérdida de la estructura cortical y medular, cabra 126, rebaño I.



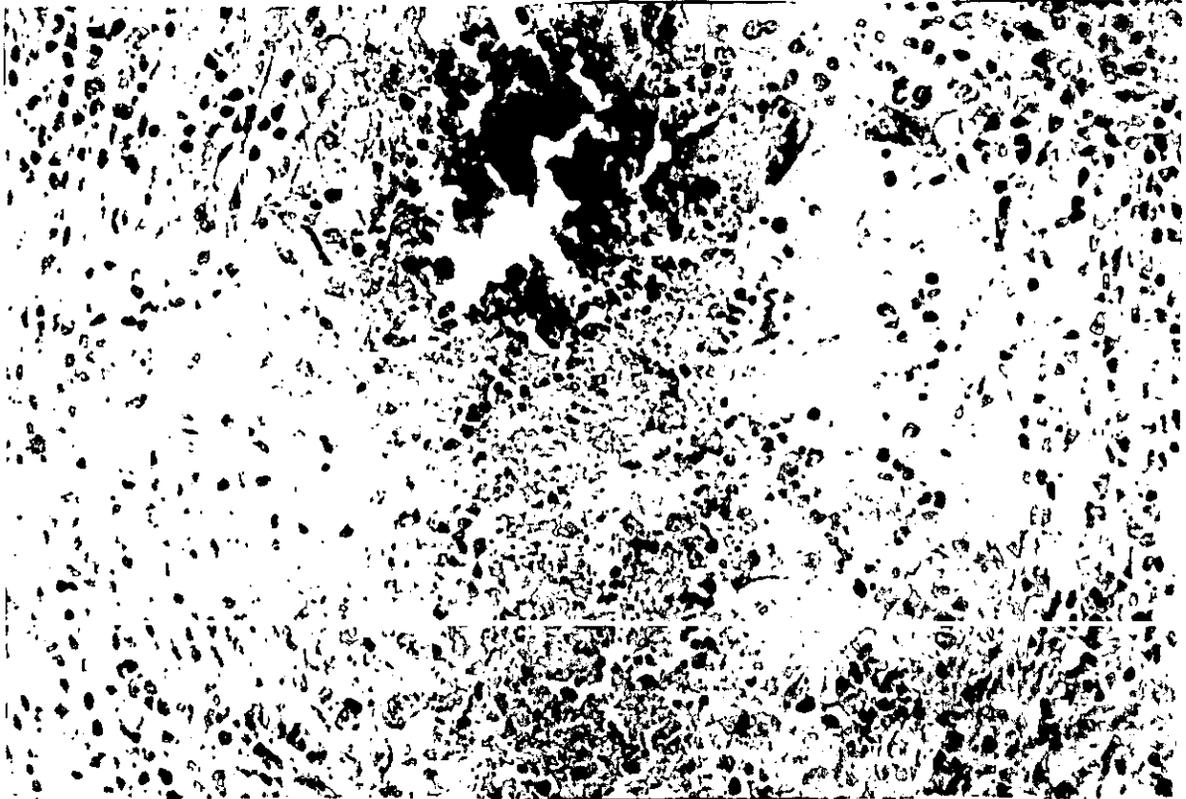
**Figura 11.** Histopatología de intestino con lesión granulomatosa moderada tipo II. Sección de intestino en la que se observa reacción granulomatosa en el tejido linfoide asociado (tla), la cual empieza a infiltrar la mucosa intestinal (mi), cabra 208, rebaño I. HE, 10X.



**Figura 12. Histopatología de intestino con lesión tipo IIIa.** Sección de intestino en la que se observan glándulas de la mucosa intestinal (gm) y reacción granulomatosa focal con una célula gigante (cg), cabra 67, rebaño I: HE, 40X.



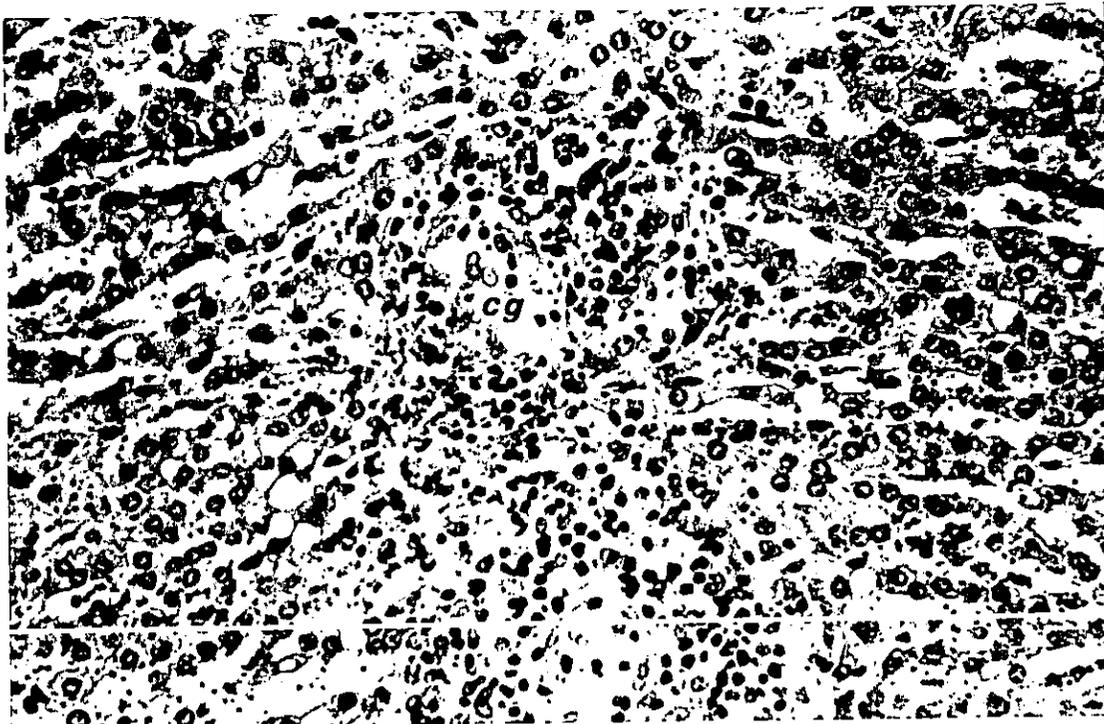
**Figura 13. Histopatología de intestino con lesión tipo IIIb.** Sección de intestino en la que se observa reacción granulomatosa grave difusa, cabra 126, rebaño I. HE, 10X.



**Figura 14. Histopatología de intestino con lesión tipo IIIc.** Sección de intestino con reacción granulomatosa en la mucosa intestinal, se observan células gigantes (cg) y mineralización, cabra S-23, rebaño I. HE, 40X.



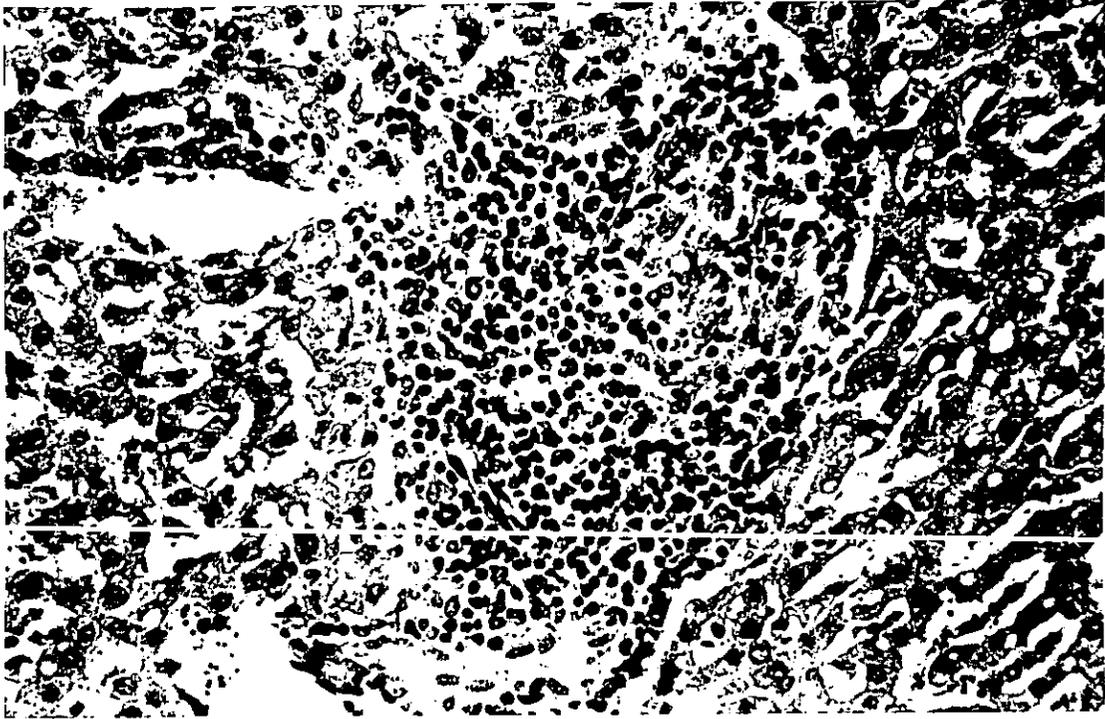
**Figura 15. Histopatología de linfonódulo con lesión granulomatosa.** Sección de linfonódulo en la que se observan focos de reacción granulomatosa (rg) peritrabecular, cabra S-26, rebaño I. HE, 10X.



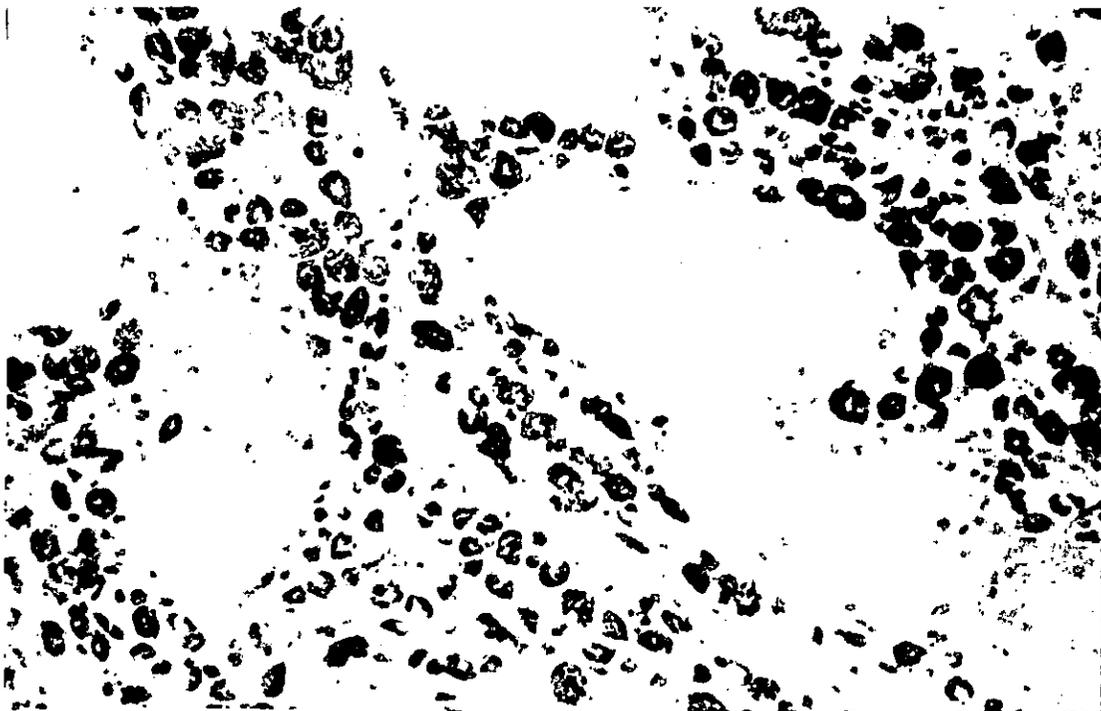
**Figura 16. Histopatología de hígado con lesión granulomatosa.** Sección de hígado en la que se observa reacción granulomatosa focal con células gigantes (cg), cabra 126, rebaño I. HE, 40X.



**Figura 17. Histopatología de hígado con baar.** Sección de hígado en la que se observan abundantes baar (1), cabra 126, rebaño I. ZN, 10X.



**Figura 18. Histopatología de hígado con focos de células mononucleares.** Sección de hígado en la que se observa infiltrado periportal por células mononucleares, cabra 636, rebaño II. HE, 40X.



**Figura 19. Enteritis granulomatosa con abundantes baar.** Sección de mucosa intestinal en la que se observan macrófagos que contienen en su citoplasma abundantes baar (1), cabra 126, rebaño I. ZN, 40X.

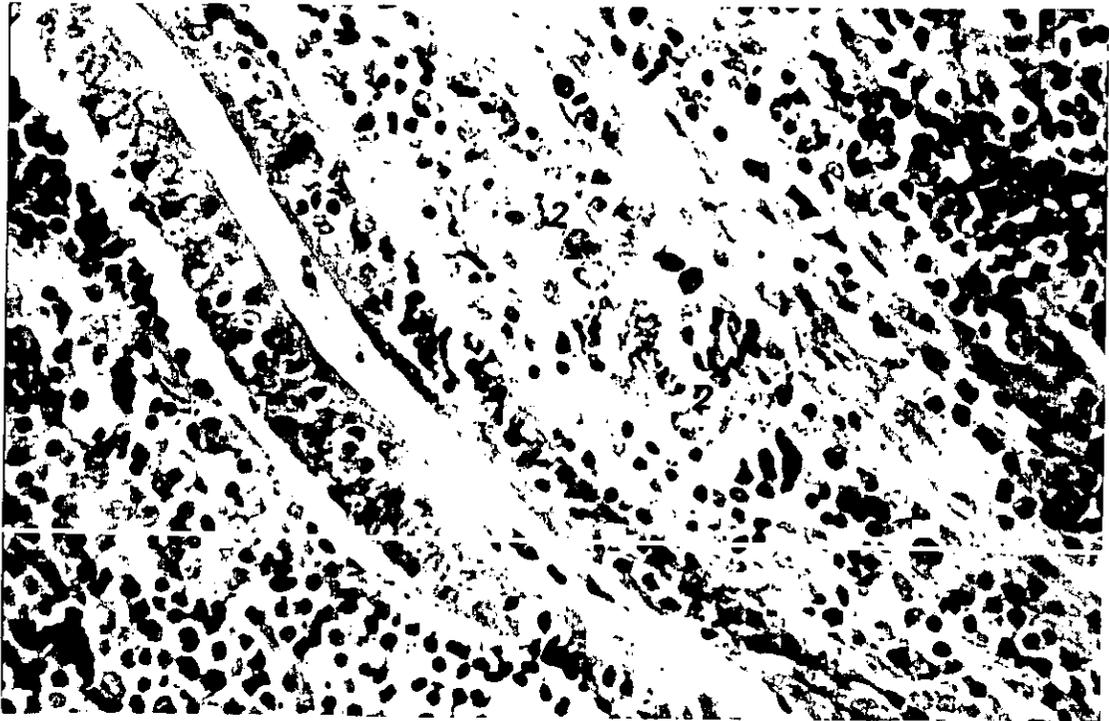


Figura 20. Enteritis granulomatosa con baar en cantidad moderada. Sección de intestino en el que se observa un foco de macrófagos con baar en su citoplasma (2), cabra 48, rebaño I. ZN, 40X.

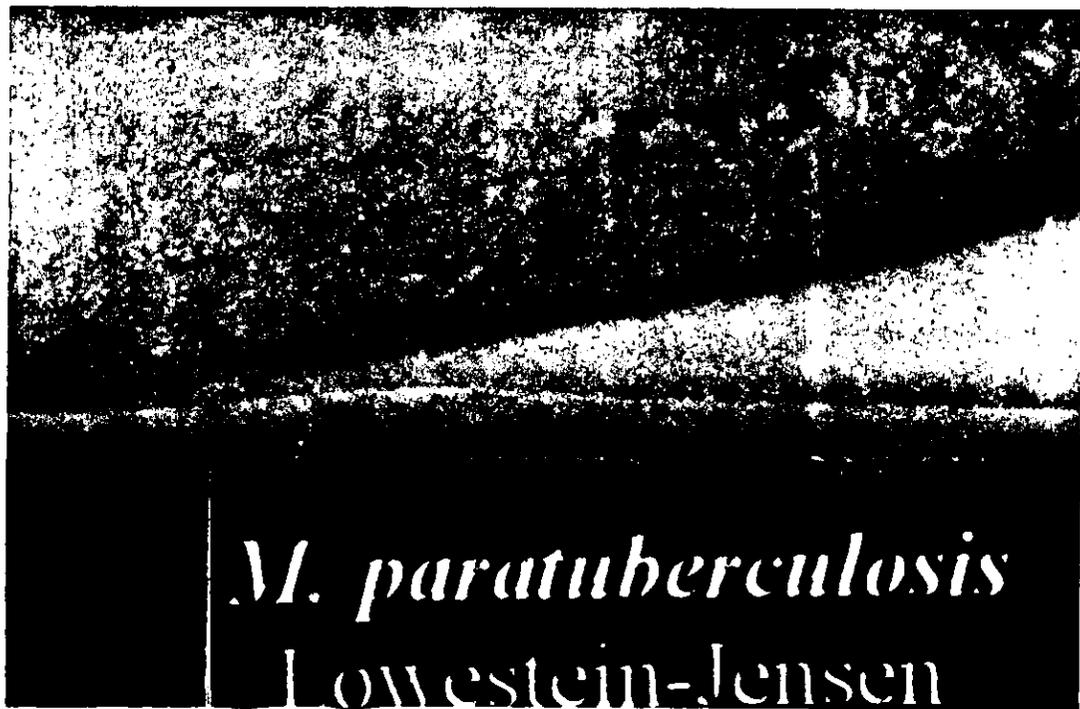


Figura 21. Cultivo de *M. a. paratuberculosis* en el medi de Löwenstein Jensen con micobactina.

**Anexo no. 1: Inmunodifusión en Gel de Agar (IDGA), para el diagnóstico de Paratuberculosis caprina.**

**1.- Reactivos**

**1.1. PBS**

- NaCl 8g
- KCl 0.2 g
- $\text{KH}_2\text{HPO}_4$  1.15 g
- Azida sódica 0.1%
- c.b.p. 1 l de agua destilada

**1.2. Agarosa, Gibco, 15510-027**

**1.3. Ag frente a *M. a. paratuberculosis*: Allied Lab.**

Resuspender 4 mg de antígeno/ml de  $\text{H}_2\text{O}$

**2.- Técnica**

Añadir al PBS la agarosa, para preparar una solución de agarosa 1%, calentar hasta su perfecta dilución. En placas de Petri de 10 cm de diámetro, verter 10 ml de la solución evitando la formación de burbujas de aire en el gel. Una vez gelificado, hacer los pocillos con el sacabocados y colocar en el pocillo central 30  $\mu\text{l}$  de antígeno y en dos pocillos opuestos 30  $\mu\text{l}$  del testigo positivo en cada uno de ellos, en los 4 pocillos restantes, colocar 30  $\mu\text{l}$  de cada suero sospechoso. Leer a las 24 y 48 horas.

## Anexo 2: Inmunoensayo enzimático (ELISA) para el diagnóstico de Paratuberculosis caprina.

(Fuente: S.I.M.A., España)

### Reactivos y Técnica.

1. Tampón carbonato : 5.3 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  / l  $\text{H}_2\text{O}$  d. Ajustar el pH 9.6 con HCl.

2. Solución salina de lavado:

NaCl	8.5 g
Tween 80	0.5 ml
$\text{H}_2\text{O}$ d	1.0 l

3. PBS-TG:

Fosfato monosódico hidratado	1.8 g
Fosfato disódico anhidro	12.36 g
NaCl	8.5 g
$\text{H}_2\text{O}$ d	993 ml
Tween 80	0.5 ml
Gelatina	1.0 g

Ajustar el pH a 7.6 con NaOH. Esterilizar en autoclave a 121 °C, durante 15 minutos.

4. Suspensión de *M. phlei* : Disolver 5 g de *M. phlei* en 1 l de solución salina (NaCl al 8.5%).

5. Tampón citrato 0.05 M, con pH 4.0:

$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	22 g/l
(ác. Cítrico monohidratado)	
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	22.49 g/l
(citrato sódico tribásico bihidratado)	

Mezclar 660 ml de ácido cítrico con 470 ml de citrato sódico. Completar hasta 2 l con agua destilada. Ajustar pH 4. *Importante* : no mantener almacenado por más de 2 semanas.

6. Adsorción del antígeno: diluir el antígeno (PPA-3) 0.04 mg/ml en tampón carbonato (1) y añadir 100 µl en cada pocillo; controlar bien el pH del tampón. Incubar durante toda la noche a 4°C. Secar. Lavar las placas 3 veces con solución salina de lavado (2). Las placas se pueden conservar congeladas durante periodos no muy prolongados.

7. Sueros: Mezclar con la suspensión de *M. phlei* igual volumen de suero que de suspensión. Mantener en agitación 2 horas a temperatura ambiente o bien toda la noche a 4°C. Centrifugar a 2000 r.p.m. durante 10 minutos. El suero se utiliza en dilución final de 1:100. Se tiene en cuenta la dilución 1:2 realizada con la suspensión de *M. phlei*.

8. Conjugado: Diluir el conjugado con PBS-TG (3), 1 : 4 500.

9. Sustrato: Añadir 5.48 mg de ABTS en 50 ml de tampón citrato. Añadir 19 µl de solución madre 1:25 (5 µl de agua oxigenada comercial de 20 volúmenes en 120 µl de agua destilada). Prepararla para usar al día.

### Anexo no. 3: Medio de Löwenstein Jensen.

1. Disolver 12 ml de glicerina en 600 ml de agua destilada
2. Añadir 37.2 g de medio base LJ (Difco). Calentar hasta su ebullición en agitación constante.
3. Agregar 4 mg de micobactina J (Allied, Lab), disueltos en 8 ml de etanol.
4. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.
5. Enfriar a 55 °C.
6. Añadir en atmósfera estéril 1 000 ml de huevo batido, previamente desinfectado con propanol durante 30 minutos.
7. Adicionar ciclohexanida 0.45%, vancomicina 8 µg/ml y ácido nalidixico 8 µg /ml.
8. Depositar aproximadamente 8 ml del medio en tubos estériles con tapón de rosca.
9. Coagular a 80 °C durante 30 minutos con el tapón sin cerrar herméticamente en posición inclinada.
10. Ajustar los tapones hasta que cierren herméticamente y conservar de 2-8 °C.