



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**HALLAZGOS ANATOMOPATOLOGICOS Y SU RELACION  
CON LOS VALORES DE DENSIDAD OPTICA DE LA PRUEBA  
DE ELISA EN OVINOS SEROPOSITIVOS A  
PARATUBERCULOSIS, EN MARTINEZ DE LA TORRE,  
VERACRUZ.**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**  
P R E S E N T A :  
**ESTHER GISELA MARTINEZ ROMERO**

ASESOR: DR. GILBERTO CHAVEZ GRIS

MEXICO, D.F.

I 2002

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

PAGINACIÓN

DISCONTINUA

ESTA TESIS NO SALI  
DE LA BIBLIOTECA

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Martinez Romero  
Esther Gisela

FECHA: 27 agosto 02

FIRMA: Gisela Martinez Romero

## CONTENIDO

	<u>Página</u>
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
OBJETIVOS.....	10
HIPÓTESIS.....	11
MATERIAL Y MÉTODOS.....	12
1.- Grupo de animales.....	12
2.- Colección y proceso de muestras.....	12
3.- Técnica de ELISA.....	13
4.- Evaluación clínica.....	14
5.- Estudio anatomopatológico.....	15
6.- Análisis de resultados.....	15
RESULTADOS.....	17
1.- Resultados serológicos.....	17
2.- Hallazgos clínicos.....	17
3.- Hallazgos a la necropsia.....	17
4.- Hallazgos histopatológicos.....	18
5.- Distribución del tipo de lesiones histológicas en válvula ileocecal, íleon y yeyuno.....	22
6.- Presencia de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR).....	23
7.- Número promedio de bacilos ácido alcohol resistentes por macrófago.....	24
FIGURAS Y CUADROS.....	26
DISCUSIÓN.....	43
REFERENCIAS.....	52

## LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

	<u>Página</u>
Cuadro 1 Porcentaje de sensibilidad y especificidad de la prueba de ELISA.....	26
Cuadro 2 Reactivos necesarios para la realización de la técnica de ELISA.....	27
Cuadro 3 Patología macroscópica.....	28
Figura 1 Ileon. Engrosamiento de la mucosa.....	29
Cuadro 4 Lesiones observadas al estudio <i>post mortem</i> .....	30
Cuadro 5 Hallazgos histológicos.....	31
Figura 2 Lesión histológica tipo 1.....	32
Figura 3 Lesión histológica tipo 2.....	32
Figura 4 Lesión histológica tipo 3a.....	33
Figura 5 Lesión histológica tipo 3b.....	33
Figura 6 Área de mucosa intestinal con presencia de bacilos ácido alcohol resistentes dentro del citoplasma de macrófagos....	34

Figura 7	Lesión histológica tipo 3c.....	35
Figura 8	Distribución del grado de lesión en válvula ileocecal en los subintervalos de densidad óptica de la prueba de ELISA en ovinos con sospecha de Paratuberculosis.....	36
Figura 9	Distribución del grado de lesión en íleon en los subintervalos de densidad óptica de la prueba de ELISA en ovinos con sospecha de Paratuberculosis.....	37
Figura 10	Distribución del grado de lesión en yeyuno en los subintervalos de densidad óptica de la prueba de ELISA en ovinos con sospecha de Paratuberculosis.....	38
Cuadro 6	Número de animales con presencia de bacilos ácido alcohol resistentes en diferentes regiones anatómicas del intestino y su distribución en los grados de lesión histológica....	39
Cuadro 7	Número promedio de bacilos ácido alcohol resistentes por macrófago en válvula ileocecal y su distribución en los subintervalos de densidad óptica de la prueba de ELISA.....	40
Cuadro 8	Número promedio de bacilos ácido alcohol resistentes por macrófago en íleon y su distribución en los subintervalos de densidad óptica de la prueba de ELISA.....	41
Cuadro 9	Número promedio de bacilos ácido alcohol resistentes por macrófago en yeyuno y su distribución en los subintervalos de densidad óptica de la prueba de ELISA.....	42

## Dedicatorias

A mis padres, Gloria y Enrique, por brindarme su apoyo, confianza y amor. Gracias por todo.

A mi hermana Fabiola y abuela Carmen, gracias por estar siempre conmigo. Las quiero mucho.

A Lorena, gracias por todos los recuerdos de la infancia. Te quiero.

A Yann Antoine y Maura, por ser la nueva luz de la familia.

A mis primos Jose Luis, Antonio, y a toda mi familia.

A ti Javier, agradezco todos tus consejos y críticas, pero sobre todo, el amor que me das cada día. Eres el amor de mi vida.

A Héctor, Hugo, Manuel y Victor, mis amigos de toda la vida.

A Juan y Aaron por todos los años de amistad.



## Agradecimientos

Al Dr. Gilberto Chávez Gris por su apoyo, paciencia y consejos en la realización de este trabajo.

Al Dr. Fernando Constantino Casas por haberme permitido la realización de esta tesis en el Departamento de Patología.

A la Dra. Nuria de Buen de A. por toda su enseñanza.

Al Dr. Pedro Ochoa.

Al Proyecto PAPIIT IN22 1999 por su valiosa cooperación.

A mis compañeros de Patología: Félix, Gerardo, Francisco, Fausto, Xóchitl, Zitlali, Miriam e Isabel que me ayudaron y apoyaron en la realización de esta tesis.

A Jaime Eugenio Córdoba por su ayuda en la parte fotográfica.

A Luis Antonio Morales Arreola por la realización de la técnica histológica.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

## EL GATO LOCO

Lo he calumniado. Le he llamado el gato loco; he dicho que necesitaba un psiquiatra. Me he burlado de él torpermente.

En cuanto empieza oscurecer, mientras la gata se acomoda en los sillones de la sala, el gato bizco comienza su ronda nocturna: da doce o quince vueltas alrededor, dentro de mi cuarto, pegado a las paredes, debajo de la cama, detrás del buró, con un itinerario fijo e insistente; luego sale al patio y se pasa toda la noche, pero toda la noche, dando vueltas y vueltas, maullando quedamente, lastimeramente, a un ritmo preciso, como buscando algo, alguien, tenazmente. El paso es veloz, su actitud alerta, inquisitiva.

A las siete de la mañana, más o menos, se viene a dormir. Y así todos los días.

Me preguntaba si se sentía prisionero, angustiado o qué. Hoy me he dado cuenta que es sólo un oficio: él patrulla la casa contra fantasmas, malas vibraciones y extraterrestres.

De aquí en adelante le llamaré el patrullero de la noche, el vigilante del amanecer.

Jaime Sabines.

A mis gatos y a todos los demás animales que han contribuido en mi formación como médico veterinario.

## Resumen

Martínez Romero Esther Gisela. Hallazgos anatomopatológicos y su relación con los valores de densidad óptica de la prueba de ELISA en ovinos seropositivos a Paratuberculosis, en Martínez de la Torre, Veracruz. (Asesor Dr. Gilberto Chávez Gris).

Es importante emplear técnicas de diagnóstico efectivas para detectar animales con Paratuberculosis en estado preclínico de la enfermedad. La finalidad del trabajo fue identificar lesiones macro y microscópicas en animales seropositivos a la prueba de ELISA; describir la posible asociación entre los valores del coeficiente de densidad óptica (D.O.) de la prueba de ELISA con la gravedad de las lesiones histológicas y la cantidad de bacilos ácido alcohol resistentes por macrófago (BAAR/M). Cincuenta y uno de 549 (9.28%) borregos resultaron positivos; se realizó la necropsia a 17 animales seropositivos y 3 seronegativos. Macroscópicamente se observó engrosamiento de la mucosa en íleon terminal, los linfonodos mesentéricos e ileocecales se apreciaron aumentados de tamaño con aspecto nodular. Los hallazgos histopatológicos se clasificaron en lesión tipo 1, 2, 3a, 3b y 3c. La lesión tipo 3a fue la más común tanto en válvula ileocecal como íleon, y en yeyuno el grado 2 fue la más frecuente. Diez de 20 animales se distribuyeron en el subintervalo de D.O. 0.789-0.878, donde las lesiones 2 y 3a predominaron. Nueve de 20 animales presentaron BAAR en la lesión 3a y 3b, no se observó una distribución hacia algún subintervalo de D.O. en específico. El no haber observado una clara asociación entre los valores del coeficiente de D.O. de la prueba de ELISA con la gravedad de las lesiones histológicas y la cantidad de BAAR/M en la población estudiada, puede atribuirse a respuestas inmunológicas variables, tanto celular como humoral, durante el curso de la enfermedad, las cuales pueden influenciar en el resultado serológico e histopatológico.

## Introducción

La paratuberculosis (PTB) es una enfermedad crónica que afecta a los rumiantes silvestres, domésticos y de zoológico, la cual se caracteriza por causar una enteritis crónica granulomatosa<sup>1-7</sup>. El agente causal es *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map), un bacilo intracelular de 0.5-1.5  $\mu\text{m}$ , ácido alcohol resistente<sup>1,3,5,8,9</sup>. La PTB fue descrita en 1895 por HA Johne y L Frothingham, como un caso peculiar de tuberculosis en una vaca con una enteritis crónica y la presencia de bacilos ácido alcohol resistentes. En 1906, Bang reconoció que la enfermedad no era tuberculosis y la llamó enfermedad de Johne o pseudotuberculosis<sup>1</sup>.

Las pérdidas económicas debido a la enfermedad son considerables. En Victoria, Australia se estima que las pérdidas en la industria lechera y cárnica son de \$7.5 millones/año<sup>9</sup>. Estas pérdidas se atribuyen o son consecuencia de la muerte del animal con signos clínicos o a los efectos subclínicos, como disminución de peso, fertilidad y producción láctea<sup>2,3,9</sup>. En los recientes años, la PTB se ha convertido en un asunto importante de salud pública debido a su posible relación con la enfermedad de Crohn<sup>3</sup>.

La vía de transmisión es oral, mediante la ingestión del microorganismo, en agua o alimento contaminado por las heces de animales infectados<sup>1,11</sup>. Otras posibles vías de infección son la intrauterina y la ingestión de calostro y leche<sup>1,9,12</sup>. El largo periodo

de incubación permite la eliminación de bacterias a través de heces por más de 18 meses antes de que los signos clínicos sean aparentes. En los casos clínicos, la eliminación de microorganismos puede ser de más de  $5 \times 10^{12}$  micobacterias/día<sup>1</sup>. Los animales son más susceptibles a la infección en los primeros 30 días de vida, y el riesgo de infección se reduce conforme avanza la edad, pero puede continuar hasta los 12 meses de edad<sup>9</sup>. La enfermedad clínica se desarrolla cuando el animal tiene de 2 a 5 años de edad. En la mayoría de las infecciones naturales de PTB se presume que la respuesta del huésped elimina al microorganismo, pero una proporción de los animales permanece con la infección y después de una fase subclínica se desarrolla la enfermedad cuando son adultos<sup>2</sup>.

Después de la ingestión de la micobacteria, por endocitosis se introduce a las células M (células membranosas) localizadas en los domos que cubren a las placas de Peyer del íleon y yeyuno<sup>1</sup>. Las micobacterias intactas o degradadas son transportadas en vacuolas a través de las células M por transitosis a los macrófagos en áreas subepiteliales e intraepiteliales de las placas de Peyer y lámina propia adyacente. Después, las micobacterias dentro de los macrófagos pueden migrar vía linfática hacia linfonodos mesentéricos y sitios extraintestinales, como la glándula mamaria. Dentro de los macrófagos se inhibe la maduración del fagolisosoma por inactivación de la bomba ATPasa<sup>1</sup>. Los macrófagos intestinales son las células blanco de la

infección por Map<sup>1,2</sup>. La evasión y resistencia a los mecanismos intracelulares de los macrófagos son prerequisite para la persistencia y multiplicación de las micobacterias, y el desarrollo de la enfermedad.

Las lesiones tempranas se desarrollan en las placas de Peyer y posteriormente se extienden al íleon. En ovinos y caprinos la infección de PTB comienza en las placas de Peyer del yeyuno y válvula ileocecal, las cuales son el único tejido linfoide intestinal persistente en animales adultos<sup>7</sup>. En ruminantes, las placas de Peyer continuas en el íleon son responsables de la linfopoyesis de células B y a diferencia de las placas de Peyer del yeyuno, constan de abundantes folículos de células B con pequeñas áreas interfoliculares de células T. Las placas de Peyer del íleon contienen de 1 a 2 % de células T, en comparación con un 30-50 % de células T en placas de Peyer del yeyuno. La falta de células T capaz de efectuar inmunidad celular sugiere que las placas de Peyer del íleon, cuyo máximo desarrollo se lleva a cabo en animales jóvenes, es un ambiente favorable para las micobacterias. Parece posible que la disminución progresiva en la susceptibilidad a PTB con un aumento en la edad, está relacionada con la involución concomitante de las placas de Peyer del íleon y la desaparición de este sitio que favorece la persistencia de micobacterias<sup>1</sup>.

La protección contra la PTB depende de la respuesta inmune celular. Después de la infección hay una respuesta celular temprana, la cual comienza a disminuir casi totalmente en animales afectados crónicamente. Por el contrario, los anticuerpos séricos son usualmente detectables después de la respuesta celular y tienden a aumentar conforme la micobacteria se multiplica. Se ha descrito un espectro histopatológico relacionado con varias respuestas inmunológicas, el cual está definido por la existencia de 2 formas distintas de la enfermedad; una forma tuberculoide (paucibacilar) con una fuerte respuesta inmune celular caracterizada por pequeños granulomas formados por células epitelioides rodeadas por abundantes linfocitos con escasos o nulos bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR), y una forma lepromatosa (multibacilar) con una fuerte respuesta inmune humoral acompañada por lesiones compuestas por macrófagos con abundantes BAAR. Se cree que los mecanismos de las células T no eliminan la infección, por lo que la micobacteria comienza a proliferar e inducir el desarrollo de una enteritis granulomatosa difusa (forma lepromatosa). Cuando las lesiones son causadas por una respuesta celular excesiva contra los organismos resistentes, provocando una persistente e inapropiada reacción de hipersensibilidad retardada en el intestino, se presenta la forma tuberculoide<sup>1,2</sup>.

Las lesiones macroscópicas se caracterizan por engrosamiento de la mucosa intestinal, principalmente del íleon terminal, yeyuno y

ocasionalmente duodeno. Los linfonodos mesentéricos e ileocecales se encuentran aumentados de tamaño con aspecto edematoso y en ocasiones presentan calcificación. También se presenta linfangiectasia<sup>13</sup>. Las lesiones microscópicas se dividen en 3 categorías<sup>14</sup>. El tipo I consiste en lesiones focales en la zona interfolicular y basal de las placas de Peyer compuestas por pequeños granulomas formados por macrófagos y células epitelioides; casi no se observan BAAR. En el tipo II las lesiones son más marcadas en las placas de Peyer, los granulomas se extienden hacia la mucosa intestinal asociada con las placas de Peyer, pueden observarse en la zona basal de la lámina propia y en las vellosidades adyacentes a las placas de Peyer, y se aprecian algunos BAAR. Del tipo III se reconocen 3 subtipos, en donde las lesiones granulomatosas afectan la mucosa adyacente y no adyacente a las placas de Peyer. El subtipo IIIa consiste en granulomas multifocales principalmente en la lámina propia, los cuales involucran más vellosidades causando su engrosamiento. En la submucosa y serosa se aprecian focos de células inflamatorias, principalmente linfocitos y macrófagos alrededor de vasos linfáticos y sanguíneos. Se observan moderados BAAR. El subtipo IIIb se caracteriza por causar una enteritis granulomatosa compuesta por gran cantidad de células epitelioides, macrófagos y algunas células gigantes distribuidas difusamente dando un aspecto de mosaico a la mucosa asociada y no asociada a las placas de Peyer. Este infiltrado granulomatoso ocasiona



atrofia y fusión de vellosidades. Se aprecian numerosos bacilos BAAR. El subtipo IIIc esta compuesto por granulomas compuestos por macrófagos y células gigantes localizados en las placas de Peyer. En la mucosa intestinal predomina infiltrado inflamatorio compuesto por abundantes linfocitos, el cual infiltra la mucosa difusamente hasta las puntas de las vellosidades. En la submucosa se aprecia edema y agregados de linfocitos y células plasmáticas. Se observan escasos o nulos BAAR<sup>14,15</sup>. Se sugiere que estas categorías histopatológicas representan estadios en la patogénesis de la enfermedad, los animales adultos con lesiones granulomatosas focales (tipo I), probablemente se infectaron en edad temprana, pero la enfermedad se fue controlando por una efectiva inmunidad celular. Las clasificaciones II y IIIa pueden representar la progresión de la enfermedad en la edad adulta debido a una falla en los mecanismos inmunológicos<sup>1</sup>. Las lesiones histológicas intestinales se han relacionado con el grado de infección micobacteriana en los tejidos. La posible relación entre las diferentes poblaciones celulares con los signos clínicos, los hallazgos serológicos, las lesiones macro y microscópicas, no han sido evaluadas estadísticamente; sin embargo, se ha visto que puede existir una relación entre un gran número de BAAR con infiltración por macrófagos, y escasa cantidad de BAAR con la presencia de linfocitos<sup>16</sup>. Las lesiones histológicas en estadios subclínicos se caracterizan por la presencia de células gigantes tipo Langhans individuales y escasos

grupos de macrófagos epitelioides. Cuando están presentes, los BAAR se localizan en el citoplasma de las células gigantes<sup>5</sup>.

Los signos clínicos de la PTB son la pérdida crónica de peso, diarrea intermitente, debilidad, postración, deshidratación, en ocasiones se observa edema submandibular, ascitis, hidropericardio y atrofia serosa de la grasa<sup>1,2,7,13</sup>. La pérdida de peso corporal es una consecuencia de la mala absorción y pérdida de proteínas debido al engrosamiento de la mucosa por el infiltrado celular. Otra causa que contribuye a la pérdida de peso son las elevadas concentraciones del factor de necrosis tumoral  $\alpha$ , el cual aumenta el catabolismo tisular. El hidropericardio y la ascitis se deben a una hipoproteinemia. La diarrea es poco frecuente, y ocurre cuando las lesiones se extienden al intestino grueso e interfieren con la resorción de líquidos<sup>1</sup>. La infección de paratuberculosis se divide en tres etapas. En la etapa I los animales se encuentran en estado prepatente y subclínico, aún sin eliminar organismos detectados por la técnica de cultivo. En el estadio II los animales no muestran signos clínicos pero están eliminando microorganismos detectables por cultivo. En el estadio III ya muestran signos clínicos, y usualmente son positivos por cultivo bacteriológico y pruebas serológicas<sup>17</sup>. Durante las fases terminales, otras infecciones oportunistas pueden aparecer y contribuir para acelerar el curso de la enfermedad<sup>3</sup>.

Las pruebas que se emplean más comúnmente para el diagnóstico de PTB son: fijación del complemento, inmuno ensayo enzimático (ELISA), inmunodifusión en gel de agar (IDGA), prueba de intradermorreacción, cultivo bacteriológico, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y estudio histopatológico<sup>12, 15, 18-23</sup>.

Las pruebas serológicas, como ELISA e IDGA han sido consideradas pruebas de gran valor y uso en el diagnóstico de la forma multibacilar de paratuberculosis en ovinos<sup>21</sup>. La detección de anticuerpos de Map en el suero es una fuerte evidencia de que un animal está infectado. Los diferentes porcentajes de sensibilidad y especificidad informados por diferentes autores se muestran en el cuadro 1.

Debido a que la paratuberculosis es una enfermedad con un largo periodo de incubación y un alto porcentaje de los animales permanece en estado prepatente y preclínico, esta enfermedad no es diagnosticada oportunamente, por lo que es importante emplear técnicas de diagnóstico efectivas con la finalidad de establecer un programa de prevención y control.

## Objetivos

1. Determinar la presencia de anticuerpos anti-*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en un rebaño de borregos pelibuey con antecedentes clínicos y serológicos de PTB, mediante la técnica de ELISA modificada.
2. Identificar y evaluar la presencia de lesiones macroscópicas y microscópicas de PTB en animales seropositivos con la técnica de necropsia y estudio histopatológico.
3. Describir la posible asociación entre los valores del coeficiente de densidad óptica de la prueba de ELISA con la gravedad de las lesiones histológicas y la cantidad de bacilos ácido alcohol resistentes por macrófago.

## Hipótesis

- Los animales seropositivos presentarán lesiones macroscópicas y microscópicas características de PTB.
- A mayor valor de coeficiente de densidad óptica de la prueba de ELISA, mayor será el grado de lesión histológica.

## Material y métodos

El estudio se desarrolló en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical, situado sobre el kilómetro 5.5 de la carretera Federal Martínez de la Torre-Tlapacoyan, Tlapacoyan, Veracruz. Tiene un clima Af (m) (e), (cálido-húmedo-regular), con una temperatura media anual de 27.7°C; lluvias abundantes en verano y principios de otoño, de menor intensidad en invierno. Su precipitación media anual es de 1,293.6 milímetros<sup>31</sup>.

### 1. Grupo de animales

Se tomaron muestras de sangre de un rebaño conformado por 549 ovinos raza pelibuey, hembras entre 1 a 4 años de edad, con antecedentes clínicos como disminución crónica de peso, y serológicos de PTB mediante la prueba de inmunodifusión en gel de agar.

### 2. Colección y proceso de muestras

El suero se obtuvo de la colección de sangre a través de la punción de la vena yugular, empleando tubos sin anticoagulante. La sangre se dejó reposar a temperatura ambiente. Una vez obtenido el suero, se mantuvo en congelación a -30°C.

### 3. Técnica de ELISA

Se realizó la técnica de ELISA modificada para la detección de anticuerpos anti-*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en todos los sueros, empleando el siguiente método:

Adsorción del antígeno (Ag) a los pocillos de la placa, depositándose 100  $\mu$ l de Ag (0.04 mg/ml) de tampón de carbonato en cada pocillo, siendo mantenida la placa a 4°C durante toda la noche. Posteriormente se lavaron 3 veces las placas con la solución salina, conservándose a 4°C hasta la realización de la prueba. Previamente al ensayo, los sueros problema fueron adsorbidos con una suspensión de *Mycobacterium phlei* a la proporción de 1:1, durante toda la noche a 4°C. Se depositaron 100  $\mu$ l del suero problema adsorbido en los pocillos de las placas fijadas con una dilución 1:100 de PBS-TG (solución amortiguada de fosfatos-Tween gelatina). En cada una de las placas se colocó un control positivo y un control negativo. Las placas se dejaron en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 2 horas para su incubación y, posteriormente, se lavaron con TBS-TG 3 veces. Posteriormente se añadieron en cada uno de los pocillos, 100  $\mu$ l de suero anti-IgG a una dilución de 1:4500, y las placas fueron incubadas durante 2 horas en cámara húmeda a temperatura ambiente. Al final de este periodo las placas fueron lavadas 3 veces con la solución de lavado, se añadieron 100  $\mu$ l del sustrato ABTS, y se incubaron durante

15-20 minutos en agitación constante y en obscuridad. La adsorbancia de cada placa se midió empleando un espectrofotómetro (Elx800 Universal Microplate Reader Bio-Tek Instruments, Inc.) con un filtro de una longitud de onda de 405 nm y se obtuvo un cociente resultante de la división del valor medio de la densidad óptica de cada suero entre el valor medio del control positivo de cada placa. El punto de corte se estableció en 0.800 del coeficiente de densidad óptica (D.O.)<sup>29</sup>. Aquellas lecturas que se encontraron por arriba de ese valor se consideraron positivos y si fueron menores de 0.800 de D.O., negativos.

Los reactivos empleados en la realización de la técnica de ELISA se muestran en el cuadro 2.

#### 4. Evaluación clínica

La condición corporal de los animales seropositivos se clasificó en: buena, donde las apófisis transversas no se notan y la estructura ósea no es detectable; regular, donde las apófisis transversas pueden detectarse por palpación; y mala, donde las apófisis espinosas emergen prominentes sobre el lomo y se muestran, al igual que las apófisis transversas, muy puntiagudas.



## 5. Estudio anatomopatológico

Se realizó la necropsia de 17 animales seropositivos y 3 seronegativos, ya que no se pudo tener acceso al resto de los animales positivos por motivos ajenos al diseño del presente estudio. Se practicó la eutanasia con pistola de émbolo oculto e inmediatamente se desangraron por la vena yugular. Se llevó a cabo la revisión detallada del intestino delgado, linfonodos mesentéricos e ileocecales. Se tomaron muestras de válvula ileocecal, íleon, yeyuno con placa y sin placa de Peyer, linfonodos mesentéricos e ileocecales. Las muestras obtenidas se colocaron en frascos con formalina amortiguada al 10% para su fijación y posterior corte a 4 $\mu$ m. Dichas muestras se procesaron para su estudio histopatológico con la técnica de hematoxilina y eosina, y tinción de Ziehl-Neelsen para la identificación de bacilos ácido alcohol resistentes.

## 6. Análisis de resultados

Se determinó el número de sueros positivos a anticuerpos anti-*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

Las lesiones histológicas se clasificaron en categorías 1, 2, 3 (3a,3b,3c)<sup>13</sup>, con base en: presencia de lesiones granulomatosas, localización de los granulomas en las diferentes regiones y capas del intestino; intensidad y distribución de las lesiones, tipo de células observadas; además de la presencia y cantidad de bacilos ácido alcohol

resistentes. De un total aproximado de 200 macrófagos observados en 8 campos diferentes de la mucosa intestinal, con el objetivo 40X, se determinó el número promedio de bacilos ácido alcohol resistentes por macrófago (objetivo 100X), empleando rangos de la siguiente manera: rango 0 (ausencia de BAAR), 1 (1-10 BAAR), 2 (10-60) y 3 (>60).

Los valores del coeficiente de densidad óptica de la prueba de ELISA se encuentran dentro del intervalo  $0.700 \leq x \leq 1.145$  (con el fin de incluir a los animales seronegativos), el cual se dividió en 5 subintervalos de igual longitud, y se asignó cada animal a su respectivo subintervalo, de acuerdo a la clasificación histológica y número promedio de BAAR.

## Resultados

### 1. Resultados serológicos

Con base en el cociente de densidad óptica ( $D.O=0.800$ ), 51 de 549 borregos fueron positivos a la prueba de ELISA, generando una seroprevalencia del 9.28%.

### 2. Hallazgos clínicos

Cuatro de 20 animales (20%) presentaron una mala condición corporal, 7/20 (35%) una condición corporal buena y 9/20 (45%) una condición regular.

### 3. Hallazgos a la necropsia

Las lesiones macroscópicas observadas en el estudio *post mortem* se muestran en el cuadro 3. La mucosa del intestino delgado, principalmente del ileon, y menos frecuentemente del yeyuno y válvula ileocecal se observó engrosada, caracterizada por pliegues transversos prominentes (Figura 1). El engrosamiento de la mucosa se apreció sobre todo en ileon terminal. Un patrón con distribución segmental de engrosamiento de la mucosa en el ileon y yeyuno (lesiones segmentales separadas por secciones de intestino normal), se observó en 9/20 casos en ileon (45%) y 6/20 casos en yeyuno (30%).

Los linfonodos mesentéricos e ileocecales se encontraron aumentados de tamaño en 14/20 animales (70%), usualmente con aspecto edematoso en 13/20 animales (64%) y con aspecto nodular en la región cortical y medular en 8/20 individuos (42%). Se observó linfangiectasia en 7/20 animales (35%). El edema en la pared intestinal fue un hallazgo constante en la mayoría de los animales (13/20). Los animales con lesiones severas en íleon presentaron edema en la pared intestinal y linfonodos aumentados de tamaño con aspecto edematoso. En 1 animal no se apreciaron lesiones macroscópicas en yeyuno e íleon, y en 6 borregos los linfonodos mesentéricos e ileocecales no presentaron cambios macroscópicos. No se observaron lesiones macroscópicas de Paratuberculosis en duodeno, colon y recto, así como tampoco en otros órganos.

En el cuadro 4. se muestran otras lesiones observadas durante la necropsia.

#### 4. Hallazgos histopatológicos

De acuerdo con las lesiones histológicas clasificadas en categorías 1, 2, 3 (3a,3b,3c), 19 de 20 animales presentaron alguna de estas categorías. En el cuadro 5. se muestra el porcentaje de animales que presentaron cada grado de lesión histopatológica en válvula ileocecal, íleon y yeyuno.

**Lesión tipo 1:** lesiones compuestas por escasos granulomas focales en la zona interfolicular y basal de las placas de Peyer, tanto en válvula ileocecal, íleon y yeyuno (Figura 2). Se observaron múltiples granulomas asociados a parásitos, discreto infiltrado inflamatorio compuesto por eosinófilos, linfocitos y escasos neutrófilos en la mucosa con distribución difusa. En los linfonodos se observó edema en la región medular y discretos focos de grupos de macrófagos. No se observaron BAAR. Se observaron 2 casos en válvula ileocecal, 2 en íleon y 1 en yeyuno.

**Lesión tipo 2:** se caracterizaron por la presencia de granulomas con variación en número, en la zona interfolicular y domos de las placas de Peyer, y en la mucosa asociada al tejido linfoide, sobre todo en la zona apical de las vellosidades (Figura 3). Con menor frecuencia se apreciaron células epitelioides y macrófagos dispersos en mucosa asociada a tejido linfoide. En la mucosa se observó moderado infiltrado inflamatorio compuesto por linfocitos, eosinófilos y neutrófilos con distribución difusa; múltiples granulomas asociados a parásitos en submucosa y mucosa, edema en la submucosa con infiltrado linfoplasmocitario moderado difuso, y atrofia y fusión de vellosidades multifocal. En los linfonodos se observaron grupos de macrófagos y células epitelioides que coalescían, así como edema en zona medular. En la válvula ileocecal se encontraron 3 casos, 4 en íleon y 7 en yeyuno. No se observaron BAAR.

Lesión tipo 3a: se conformaron por granulomas multifocales, los cuales en algunas zonas llegaron a confluir, en la mucosa asociada y no asociada a las placas de Peyer, principalmente en la parte apical de las vellosidades (Figura 4), así como en la zona interfolicular y domo de las placas de Peyer. Algunos granulomas se extendían hacia la submucosa y en escasa cantidad a la serosa. Entremezclado con los granulomas se localizaron células epitelioides. En la mucosa, submucosa y serosa se apreciaron algunas células gigantes. Además se observó linfangiectasia en la lámina propia, edema en la submucosa y serosa, atrofia y fusión de vellosidades multifocal, dilatación de vasos linfáticos, algunos granulomas asociados a parásitos en la submucosa y lámina propia, presencia de coccidias, infiltrado moderado difuso por linfocitos, eosinófilos y escasos neutrófilos con extensión hacia la submucosa y serosa. Alrededor de los vasos sanguíneos localizados en la submucosa se apreció abundante infiltrado linfoplasmocitario. En la muscular se encontró discreto infiltrado linfocitario difuso. En los linfonodos se observó edema en la región medular, abundantes células epitelioides, macrófagos y granulomas, los cuales en su mayoría coalescían con distribución difusa, y escasas células gigantes. Además se apreció un foco de necrosis con calcificación, asociado a parásitos. Se observaron moderados BAAR. En válvula e íleon se encontraron 9 casos respectivamente y 5 en yeyuno.

Lesión tipo 3b: se caracterizaron por abundantes granulomas y células epitelioides en la mucosa (aspecto de mosaico) con distribución difusa (Figura 5). los cuales se extendían hacia la zona interfolicular y domos de las placas de Peyer, y en menor cantidad en la submucosa y serosa. Se apreció atrofia y fusión de vellosidades grave difusa; linfangiectasia en lámina propia, edema e infiltrado linfocitario discreto difuso en la submucosa e infiltrado moderado difuso por linfocitos y eosinófilos en la mucosa, así como coccidias y un granuloma asociado a parásito. En la capa muscular y serosa también se observó escaso infiltrado linfocitario con distribución difusa. En la serosa se observó un foco de necrosis con calcificación, asociado a parásitos. En el linfonodo se apreciaron sábanas de granulomas y células epitelioides, escasas células gigantes con distribución difusa, y edema en la zona medular. En válvula ileocecal, ileon y yeyuno se encontraron 4 casos respectivamente. Se observaron numerosos BAAR (Figura 6).

Lesión tipo 3c: se conformaron por granulomas multifocales en la mucosa asociada a tejido linfoide, zona interfolicular del tejido linfoide y zona apical de las vellosidades de mucosa asociada y no asociada. La mayoría de estos granulomas estaban formados por macrófagos y células gigantes tipo Langhans (Figura 7). En la mucosa, principalmente en la lámina propia y punta de las vellosidades, se observó abundante infiltrado linfocitario difuso, y en menor cantidad

en la submucosa, principalmente alrededor de los vasos sanguíneos. En la serosa y submucosa se localizaron granulomas asociados a parásitos, y edema. También se observó linfangiectasia en la lámina propia, atrofia y fusión de vellosidades multifocal. Se observó 1 caso en válvula ileocecal y yeyuno respectivamente. Se observaron escasos o nulos BAAR.

##### 5. Distribución del tipo de lesiones histológicas en válvula ileocecal, ileon y yeyuno.

En las figuras 8, 9 y 10 se muestra el número de animales que presentó cada tipo de lesión en las 3 regiones anatómicas del intestino antes mencionadas, en los diferentes subintervalos de densidad óptica de la prueba de ELISA.

Válvula ileocecal. En el subintervalo 0.789-0.878 se localizaron 10 de los 20 animales, presentando la mitad de estos, el grado de lesión 3a, seguido por el grado de lesión 2 con 2 casos, el grado 1, 3b y sin lesión con un caso respectivamente.

Ileon. En el subintervalo 0.789-0.878 se localizaron 10 animales, de los cuales 4 presentaron el grado de lesión tipo 2, 3 individuos con el grado de lesión tipo 3a. La lesión tipo 1, 3b y sin lesión con 1 caso respectivamente.



**Yeyuno.** De los 10 animales asignados al intervalo 0.789-0.878, 4 presentaron el grado de lesión tipo 2, 2 el grado 3a, y la lesión 3b, 3c y sin lesión con un caso respectivamente.

En la válvula ileocecal e íleon se distribuyó el mayor porcentaje de animales (45%) con el grado de lesión 3a. En yeyuno el grado de lesión 2 fue el más frecuente con un 30%.

#### **6. Presencia de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR)**

En el cuadro 6 se muestra el número de animales con presencia de BAAR en diferentes regiones anatómicas del intestino y su distribución en los grados de lesión histológica. En 9 de 20 animales se observaron BAAR dentro del citoplasma de los macrófagos con la tinción de Ziehl-Neelsen. Tanto en el grado de lesión tipo 1 como en el 2, no se observaron BAAR. En la clasificación 3b se presentó el mayor número de animales (4) con BAAR en válvula ileocecal, íleon y yeyuno, respectivamente, así como en la lesión 3a, con la diferencia de que en yeyuno no se encontraron BAAR. Los macrófagos con BAAR se localizaron principalmente en la mucosa.

## 7. Número promedio de bacilos ácido alcohol resistentes por macrófago

En el cuadro 7, 8, 9 se muestra el número promedio de bacilos ácido alcohol resistentes por macrófago en válvula ileocecal, ileon y yeyuno, y su distribución en los subintervalos de densidad óptica de la prueba de ELISA.

**Válvula ileocecal.** En el grado de lesión 3b se observaron los promedios más altos de BAAR por macrófago, 89.6-113.3, en distintos subintervalos, en la lesión 3c se apreciaron escasas y nulas micobacterias en los diferentes campos observados. En la lesión 3a los promedios fueron de 2.25 a 7.1 BAAR/macrófago.

**Ileon.** Al igual que en la válvula ileocecal, los promedios más altos, 34.25-120.25, se presentaron en la lesión tipo 3b, en diferentes subintervalos. En la lesión 3a los promedios fueron de 0.5 a 7.6 BAAR/macrófago.

**Yeyuno.** En el grado de lesión 3b se siguen observando los promedios más altos de BAAR, 32.75-97.87. En los individuos con la lesión 3a no se encontraron BAAR.

En la válvula ileocecal e ileon con la lesión 3b se aprecia que el número promedio de BAAR por macrófago en el subintervalo 0.700-0.789 es mayor en comparación con el siguiente subintervalo 0.789-0.878. Sin embargo, en el subintervalo 0.878-0.967 y 1.056-1.145, el número promedio aumenta considerablemente. A diferencia de lo observado en válvula ileocecal e ileon, en yeyuno el número promedio

de BAAR por macrófago es menor en el subintervalo 0.878-0.967 en comparación con el 0.789-0.878, pero de igual manera aumenta en el último subintervalo.

Cuadro 1.

## Porcentaje de sensibilidad y especificidad de la prueba de ELISA

Referencia	Sensibilidad	Especificidad	Ganado
Milner AR, Marck WN, Coates KJ (1989) <sup>24</sup>	87* 57*	100* 98.9*	caprino
Dubash K, Shulaw WP, Bech Nielsen S, <i>et al.</i> (1996) <sup>25</sup>	48†	-	ovino
Hilbink F, West OM, de Lisle GW, <i>et al.</i> (1994) <sup>26</sup>	87-100 <sup>5</sup> < 20 <sup>1</sup>	- -	ovino
National Johne's Working group <sup>27</sup>	25	98	
Hope AF, Kluver PF, Jones SL, Condron RJ (2000) <sup>28</sup>	35-54	98.2-99.5	ovino
Clarke CJ, Patterson IA, Armstrong KE, Low JC (1996) <sup>21</sup>	40-94.4 54-88.2	- 73	bovino caprino
García Marín JF, Chávez GG, Pérez PV, Aduriz JJ, Juste R y Badiola JJ (1991) <sup>29</sup>	71-28**	71-93**	ovino
Sweeney RW, Whitlock RH, Buckley CL <i>et al.</i> (1995) <sup>30</sup>	87** 75** 15 <sup>55</sup>	- - -	bovino

\*Prueba realizada en animales con sospecha de PTB.

\* Prueba realizada en hatos infectados con PTB.

† Estudio realizado en rebaños con baja prevalencia de PTB.

‡ Estudio realizado en animales con signos clínicos.

§ Estudio realizado en animales con enfermedad subclínica.

\*\* La sensibilidad y especificidad de la técnica consideran diferentes puntos de corte (0.700-0.850 de densidad óptica).

\*\* Animales con signos clínicos.

\*\* Animales con enfermedad subclínica con abundante eliminación de bacterias por heces.

\*\* Animales con enfermedad subclínica con poca eliminación de bacterias por heces.

## Cuadro 2.

## Reactivos necesarios para la realización de la técnica de ELISA

Tampón carbonato:	
Bicarbonato sódico ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	5,3 g
Agua destilada	1.000 ml
Ajustar el pH a 9,6 con ácido clorhídrico (HCl)	
Solución salina de lavado:	
Cloruro de sodio (NaCl)	8,5 g
Tween 80	0,5 ml
Disolver en un litro de agua destilada	
Suspensión de <i>Mycobacterium phlei</i> :	
<i>M. phlei</i>	5 g
Solución salina (NaCl al 8,5 %)	1000 ml
PBS (Phosphate buffered saline):	
NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Fosfato dibásico de sodio	1,44 g
Fosfato monobásico de potasio	0,24 g
Agua destilada	800 ml
Ajustar el pH a 7.4 con HCl, posteriormente agregar 200 ml agua destilada y esterilizar a 51 lb/pulgadas <sup>2</sup> /20 minutos.	
PBS-TG (Phosphate buffered saline-Tween gelatine):	
Fosfato monosódico monohidratado	1,8 g
Fosfato disódico anhidro	12,36 g
Cloruro de sodio	8,5 g
Agua destilada	993 ml
Ajustar a pH 7.4 empleando NaOH	
Tween 80	0,5 ml
Esterilizar en autoclave a 121°C/25 minutos	
Gelatina	1 g
Tampón citrato:	
Solución A	Ácido monohidratado 22,97 g
	Agua destilada 1000 ml
Solución B	Citrato sódico tribásico 2 $\text{H}_2\text{O}$ 22,97 g
	Agua destilada 1000 ml
Mezclar 600 ml de la solución A más 479 ml de la solución B, agregando agua destilada cbp 2 litros.	
Ajustar pH a 4 al momento de utilizarlo	
Sustrato ABTS:	
ABTS	5,48 g
Tampón citrato	50 ml
Añadir 19 $\mu\text{l}$ de la solución : 1:25 $\text{H}_2\text{O}_2$ (5 $\mu\text{l}$ $\text{H}_2\text{O}_2$ de 30% v/v en 120 $\mu\text{l}$ de agua destilada).	
Antígeno:	
Antígeno PPA-3 (Laboratorios Allied)	0,04 mg/ml

Cuadro 3.

## Patología macroscópica

Observación	Número de animales n=20	
<b>Ileon</b>		
- engrosamiento grave difuso de la mucosa, principalmente de la zona terminal	8	
- engrosamiento leve difuso de la mucosa	2	
- engrosamiento segmental de la mucosa, zona terminal más afectada	9	
- sin lesiones macroscópicas	1	
<b>Yeyuno</b>		
- engrosamiento moderado a grave, difuso de la mucosa	13	
- engrosamiento segmental, leve de la mucosa	6	
- sin lesiones macroscópicas	1	
<b>Linfonodos mesentéricos e ileocecales</b>		
- aumentados de tamaño	14	n=20
- aspecto edematoso	13	n=20
- aspecto nodular	8	n=20
- sin cambios macroscópicos	6	n=20

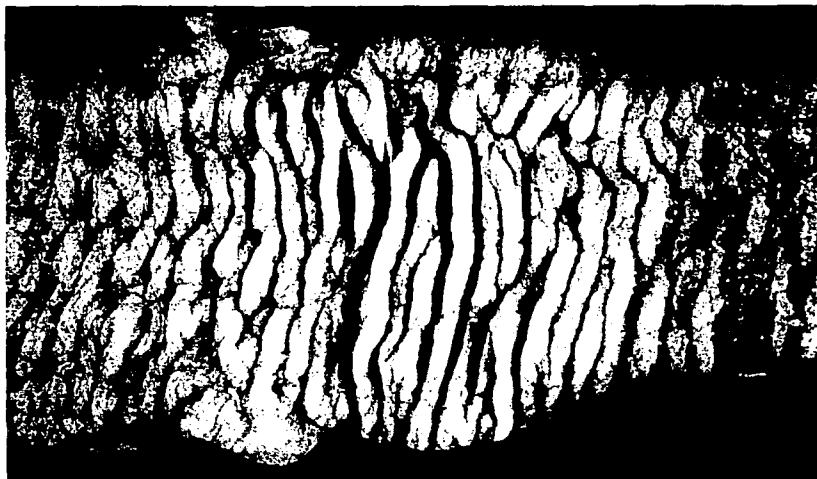


Figura 1. Ileon. Engrosamiento de la mucosa, caracterizada por pliegues transversos prominentes.

Cuadro 4.

Lesiones observadas al estudio *post mortem*\*

Patología	Número de animales
Rinitis por <i>Oestrus ovis</i>	7
Metacéstodos	4
Abomasitis por <i>Haemonchus</i> sp.	1
Enteritis por <i>Monenzia</i> sp.	2
Lesiones compatibles con coccidias	4
Foco de calcificación en hígado	1
Adherencias en pared intercostal	1
Absceso pulmonar	2
Ascitis	4
Hidropericardio	3
Atrofia serosa de la grasa	2
Fetos momificados	1

\* Las lesiones pueden repetirse en un mismo animal.



Cuadro 5.

## Hallazgos histopatológicos

Resultados\* en cada grado de lesión histológica\*

Localización anatómica	0	1	2	3a	3b	3c	TOTAL
Válvula ileocecal	5	10	15	45	20	5	n=20
Ileon	5	10	20	45	20	0	n=20
Yeyuno	10	5	35	25	20	5	n=20

\* Los resultados están expresados en porcentaje de animales que presentaron cada grado de lesión en los diferentes tejidos.

\* Grados de lesión histológica: 0 (sin lesión), 1 (granulomas focales en zona interfolicular y basal de las placas de Peyer), 2 (extensión de granulomas hacia la mucosa intestinal asociada a las placas de Peyer), 3 (granulomas multifocales en zona interfolicular y basal de las placas de Peyer, lámina propia, submucosa y serosa), 4 (numerosos macrófagos, células epitelioides y algunas células gigantes en la mucosa), 5 (abundantes linfocitos, pequeños granulomas y células gigantes en la mucosa).

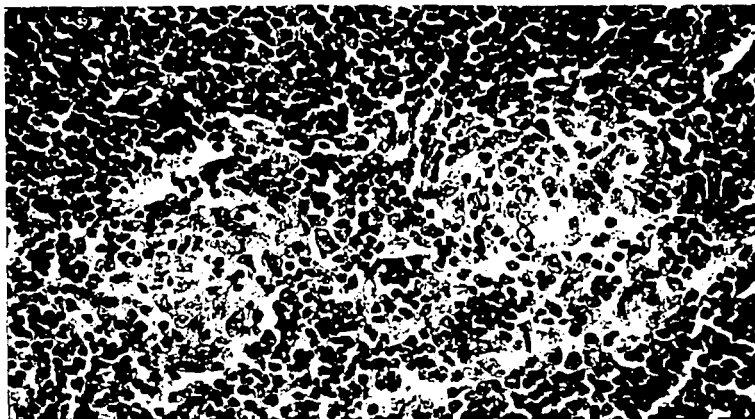


Figura 2. Lesión histológica tipo 1. Granulomas focales compuestos por macrófagos, localizados en la zona basal de las placas de Peyer. HE. 40X.

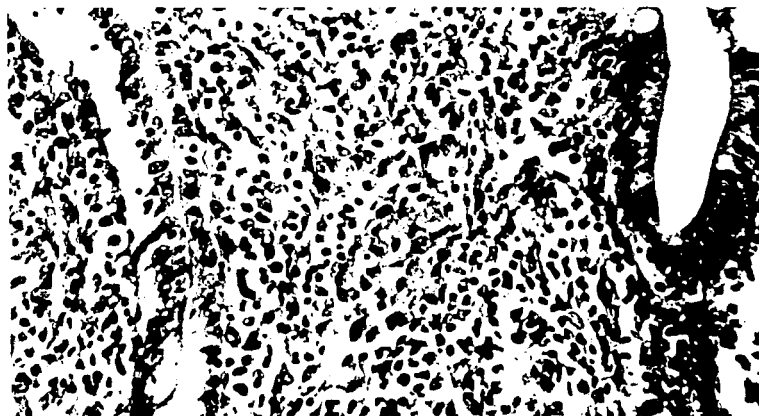


Figura 3. Lesión histológica tipo 2. Granuloma y macrófagos dispersos en la zona apical de las vellosidades de la mucosa intestinal asociada a placas de Peyer. HE. 40X.

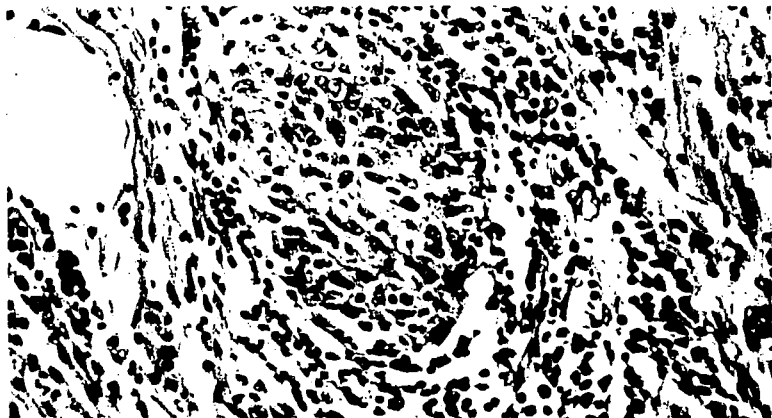


Figura 4. Lesión histológica tipo 3a. Granuloma en la submucosa.  
HE. 40X.

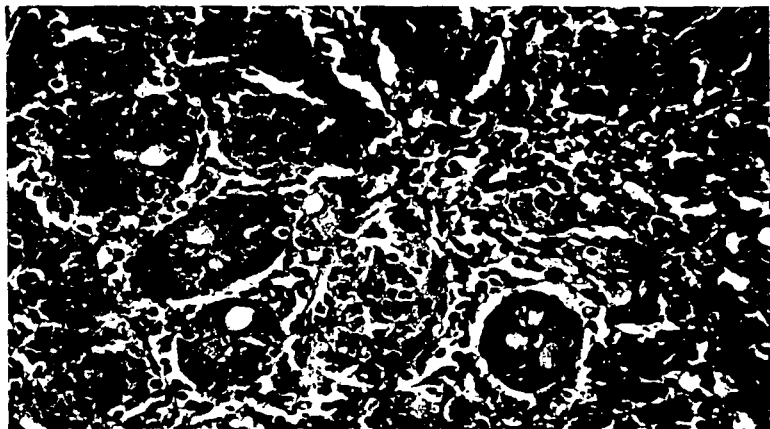


Figura 5. Lesión histológica tipo 3b. Numerosos granulomas y  
macrófagos con distribución difusa en la mucosa intestinal.  
HE. 40X.



Figura 6. Área de mucosa intestinal con presencia de bacilos ácido alcohol resistentes dentro del citoplasma de macrófagos. Ziehl-Neelsen 100X.

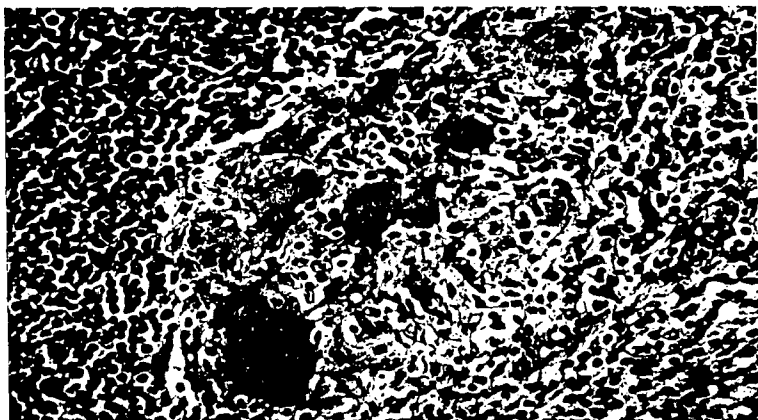
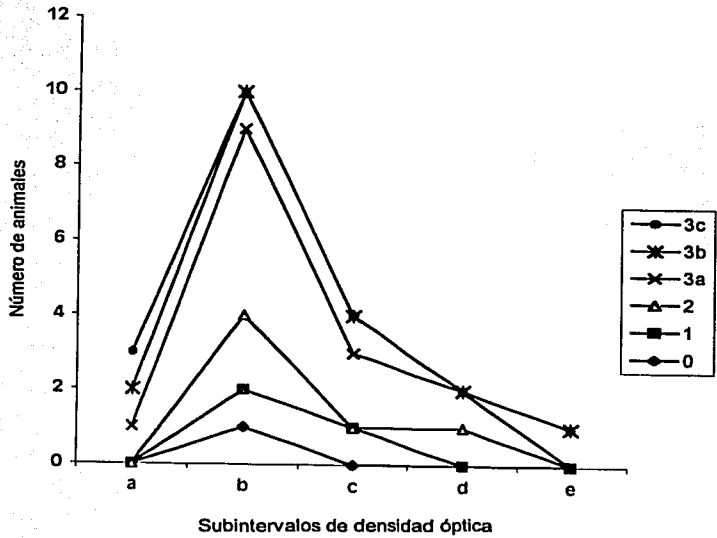


Figura 7. Lesión histológica tipo 3c. Presencia de granulomas formados por macrófagos y células gigantes tipo Langhans en mucosa intestinal asociada a tejido linfoide. HE. 40X.

Figura 8.

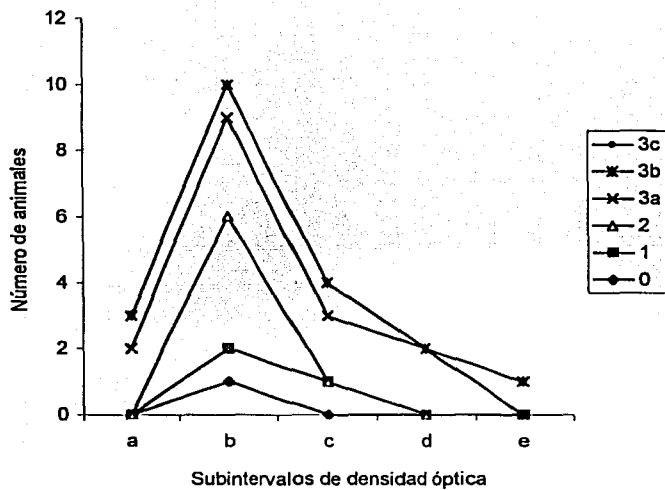
Distribución del grado de lesión histológica en válvula ileocecal en los subintervalos de densidad óptica de la prueba de ELISA en ovinos con sospecha de Paratuberculosis



Subintervalo a [0.700-0.789], subintervalo b [0.789-0.878], subintervalo c [0.878-0.967], subintervalo d [0.967-1.056], subintervalo e [1.056-1.145].

Figura 9.

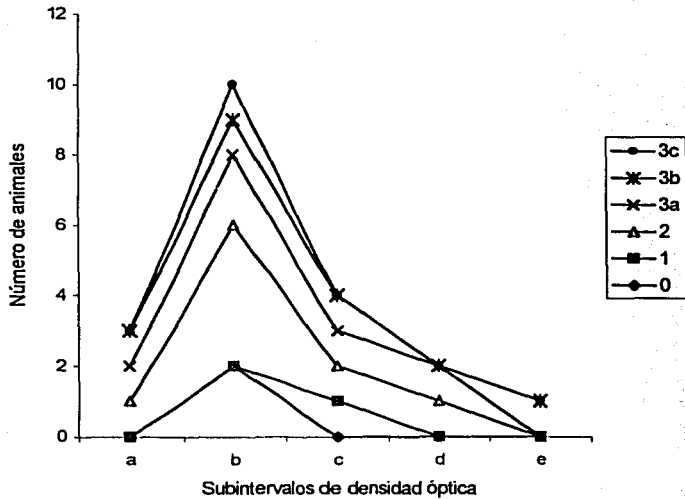
Distribución del grado de lesión histológica en ileon en los subintervalos de densidad óptica de la prueba de ELISA en ovinos con sospecha de Paratuberculosis



Subintervalo a [0.700-0.789]. subintervalo b [0.789-0.878]. subintervalo c [0.878-0.967]. subintervalo d [0.967-1.056]. subintervalo e [1.056-1.145].

Figura 10.

Distribución del grado de lesión histológica en yeyuno en los subintervalos de densidad óptica de la prueba de ELISA en ovinos con sospecha de Paratuberculosis



Subintervalo a [0.700-0.789), subintervalo b [0.789-0.878), subintervalo c [0.878-0.967), subintervalo d [0.967-1.056), subintervalo e [1.056-1.145].



Cuadro 6.

Número de animales con presencia de bacilos ácido alcohol resistentes en diferentes regiones anatómicas del intestino y su distribución en los grados de lesión histológica

Localización anatómica	Grado de lesión histológica y frecuencia de la lesión					Total
	1	2	3a	3b	3c	
Válvula ileocecal	-	-	4	4	1	n=9
Ileon	-	-	4	4	-	n=9
Yeyuno	-	-	-	4	-	n=9

Cuadro 7.

Número promedio de bacilos ácido alcohol resistentes por macrófago en válvula ileocecal y su distribución en los subintervalos de densidad óptica de la prueba de ELISA

## Subintervalos de densidad óptica de la prueba de ELISA

Grado de lesión	[0.700-0.789)	[0.789-0.878)	[0.878-0.967)	[0.967-1.056)	[1.056-1.145]
0	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-
3a	-	7.1 3.37	2.25	-	-
3b	89.6	82.5	91.87	-	113.3
3c	0.37	-	-	-	-

Cuadro 8.

Número promedio de bacilos ácido alcohol resistentes por macrófago en ileon y su distribución en los subintervalos de densidad óptica de la prueba de ELISA

Subintervalos de densidad óptica de la prueba de ELISA

Grado de lesión	[0.700-0.789)	[0.789-0.878)	[0.878-0.967)	[0.967-1.056)	[1.056-1.145]
0	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-
3a	-	1.25	7.6	0.5	-
			2.5		
3b	76.6	34.25	80.37	-	120.25
3c	-	-	-	-	-

Cuadro 9.

Número promedio de bacilos ácido alcohol resistentes por macrófago en yeyuno y su distribución en los subintervalos de densidad óptica de la prueba de ELISA

## Subintervalos de densidad óptica de la prueba de ELISA

Grado de lesión	[0.700-0.789)	[0.789-0.878)	[0.878-0.967)	[0.967-1.056)	[1.056-1.145]
0	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-
3a	-	-	-	-	-
3b	92.5	32.75	27.81	-	97.87
3c	-	-	-	-	-

## Discusión

Los signos clínicos y las lesiones macroscópicas fueron de uso limitado en algunos casos en indicar la lesión histopatológica presente. En este estudio 1/20 animales no mostró lesiones macroscópicas ni microscópicas. Las lesiones macroscópicas más graves se presentaron en 4 de 20 animales a nivel de la región terminal de íleon, así como en yeyuno, presentando lesiones histopatológicas del tipo 3b. Por su parte en los linfonodos mesentéricos se apreció aumento de tamaño mostrando un aspecto nodular, el cual correspondió a lesiones granulomatosas. El resto de los individuos (15/20) mostraron lesiones macroscópicas variables, las cuales en la mayoría de los casos no coincidieron con la gravedad histopatológica, lo que coincide con un estudio realizado por Carrigan MJ y Seaman JT (1990).

La distribución segmental en yeyuno e íleon que se presentó en 6/20 y 9/20 animales respectivamente, puede explicarse debido a que las lesiones se desarrollan primero en, o cerca de las placas de Peyer, mientras que áreas alejadas a estas se involucran solo cuando las lesiones confluyen<sup>32</sup>. Las lesiones macroscópicas más graves se localizaron en la región terminal del íleon, sitio aparente de la infección primaria<sup>15</sup>, e iban siendo menos graves conforme se extendían hacia el yeyuno hasta ser inexistentes en el duodeno, lo que fortalece

la postura de la importancia de la relación con el tejido linfoides intestinal<sup>32</sup>.

Tres de los 4 animales con una mala condición corporal presentaron lesiones microscópicas graves, grado 3a y 3b. Sin embargo, el otro individuo (1/4) presentó lesiones histológicas focales tipo 1, por lo que la emaciación podría atribuirse a una parasitosis intestinal grave por *Monezia* sp. En los otros 16 animales (80%), la condición corporal fue variable y no coincidió con las lesiones macro y microscópicas.

Existe poca correlación entre la gravedad de los signos clínicos y la gravedad de las lesiones, ya que en ocasiones se pueden observar lesiones graves en animales sin signos clínicos. Sin embargo, cuando las lesiones macroscópicas son notorias, los hallazgos microscópicos son obvios de una enteritis granulomatosa, por otro lado, cuando los hallazgos macroscópicos son mínimos o ausentes, las lesiones histológicas de PTB son más sutiles<sup>33</sup>. Por lo tanto, los hallazgos macroscópicos deben tomarse con reserva, ya que pueden ser mínimos en muchos casos o inespecíficos<sup>32,34</sup>. En animales seropositivos con lesiones macroscópicas segmentales de PTB en intestino, el estudio histopatológico es de gran utilidad para confirmar o descartar la infección de PTB.

El diagnóstico de Paratuberculosis puede ser difícil, particularmente si se hace a nivel individual. Las pruebas serológicas

combinadas con el examen clínico, estudio microscópico y bacteriológico de las heces, son usadas como diagnóstico en rumiantes. Las características histopatológicas han sido propuestas como un buen parámetro de la infección de PTB en ovinos, siendo más sensible que el cultivo bacteriológico, además de que el agente causal puede ser difícil de aislar en pequeños rumiantes<sup>17</sup>. En un estudio realizado en ovinos por Pérez V *et al.* (1997), la prueba de ELISA detectó a todos los animales (20/38) con grandes cantidades de micobacterias en tejidos y algunos sin estas en tejidos con lesiones de PTB, aunque no establece la proporción de estos casos, en comparación con la IDGA, la cual no identificó a los animales sin BAAR, lo que sugiere que la prueba de ELISA detecta un espectro histopatológico más amplio. En esta investigación se encontraron resultados similares, la prueba de ELISA detectó 4 animales con abundantes BAAR en diferentes tejidos, 5 individuos con escasos BAAR y 11 sin BAAR.

Una razón de la pobre sensibilidad de las pruebas serológicas, aún en estadios tardíos de la enfermedad, es la variabilidad de la respuesta inmunológica de los individuos. Una proporción de ovinos clínicamente enfermos (45) con lesiones histopatológicas avanzadas pueden tener resultados serológicos negativos, con la prueba de IDGA (9/45)<sup>34</sup>. En este trabajo, los animales seronegativos (3/20) presentaron lesiones avanzadas de PTB, tipo 3a, 3b y 3c, pero con una condición corporal regular. Una explicación de los resultados falsos

negativos en animales con lesiones 3b pueden indicar una anergia humoral o una deficiencia en la sensibilidad de la prueba<sup>21</sup>. El resultado falso positivo observado en un solo animal puede deberse a una reacción cruzada con otras especies del género *Mycobacterium* o reacciones cruzadas de anticuerpos contra otras bacterias como, *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

En este estudio la lesión tipo 3a fue la más común. La clasificación descrita como 3b ha sido tradicionalmente considerada la lesión clásica de PTB, la cual se observó en 4 animales. Doce de 20 animales (60%) presentaron el mismo tipo de lesión en válvula ileocecal, ileon y yeyuno, mientras que en el resto de la población (40%), las lesiones variaron, sobre todo en yeyuno, posiblemente debido a la diferente extensión de la lesión en los animales, lo cual podría indicar una variación en el desarrollo de la infección. El 50% de la población (10/20) se distribuyó en el subintervalo 0.789-0.878, donde las lesiones tipo 2 y 3a fueron las que predominaron, aunque también se distribuyeron lesiones tipo 1, 3b, 3c y sin lesiones. De acuerdo con los resultados obtenidos en el estudio histopatológico, se observó una variación en la distribución de las lesiones, con un aumento notorio de 3 a 10 casos del subintervalo 0.700-0.7890 al subintervalo 0.789-0.878, para que en el siguiente subintervalo 0.878-0.967 se presentara una disminución considerable a 4 casos. A pesar de esto, en los 2 últimos subintervalos, donde se pensaría que los



animales tienen altos niveles de anticuerpos, los 3 individuos distribuidos ahí, muestran en su mayoría lesiones avanzadas de PTB, tipo 3a y 3b. Esto podría indicar que en vista del espectro inmunológico e histopatológico de la PTB, pudiera ser posible que el rango de lesiones estuviera relacionado con la respuesta inmunológica, no obstante, son pocas observaciones. En el caso de las lesiones 3b, donde hay una alta respuesta inmune humoral, estos se distribuyeron en 4 de los 5 subintervalos, por lo que no se apreció una tendencia a localizarse en los subintervalos con mayor valor de densidad óptica, en los cuales debería haber también la mayor cantidad de anticuerpos. La lesión 3a se distribuyó en los 4 primeros subintervalos, sin mostrar tendencia hacia alguno de esos, lo cual se atribuye a una respuesta inmunológica variable. Algunos de los casos 3a que se localizaron en los subintervalos 0.878-0.967 y 0.967-1.056 podrían estar progresando al grado 3b o 3c, por lo que sus resultados serológicos estarían relacionados con la respuesta inmunológica que estuvieron montando al momento de la toma de muestra.

La clasificación histológica tipo 1 presente en un 10% en válvula ileocecal e ileon, respectivamente, y en un 5% en yeyuno, caracterizadas por una respuesta inmune celular fuerte, pueden ser lesiones latentes que perduraron por un largo periodo, después pueden desaparecer o progresar a lesiones más graves. Los tipos 2 (forma tuberculoide) y 3a, presentes en válvula ileocecal, ileon y yeyuno en

un 15, 20, 35% y 45, 45 25% respectivamente, son lesiones multifocales con respuestas inmunológicas variables, las cuales sugieren una forma temprana del grado 3b o 3c. Mientras que la lesión tipo 3b (forma límite lepromatosa), presente en un 20% en las 3 regiones anatómicas del intestino, está asociada a una fuerte respuesta inmune humoral, el tipo 3c (forma límite tuberculoide) observada en un 5% en válvula ileocecal y yeyuno, está influida por una fuerte respuesta inmune celular, la cual es insuficiente para limitar la proliferación bacteriana<sup>35</sup>. Todas estas formas patológicas probablemente son el resultado de varios mecanismos inmunológicos que operan en las reacciones inflamatorias micobacterianas granulomatosas, aunque el hecho de que solo pueden representar diferentes estadios en la evolución de la enfermedad, no puede excluirse por completo<sup>35</sup>.

Los focos de calcificación que se llegaron a encontrar en los diferentes tejidos se asociaron a infecciones parasitarias. Las cabras y con menor frecuencia los borregos desarrollan focos caseosos asociados a Paratuberculosis, usualmente con calcificación, en la mucosa, submucosa y vasos linfáticos<sup>33</sup>. Otras células inflamatorias además de células epitelioides y macrófagos que se observaron con frecuencia, incluyen linfocitos, neutrófilos y eosinófilos, en la mayoría de los animales (19/20).

Los BAAR siempre se observaron en mayor cantidad en la mucosa intestinal. Esto refleja la localización de las lesiones de PTB y

sugiere una susceptibilidad particular del intestino hacia la infección<sup>16</sup>. El haber observado que los animales con la lesión 3b presentaron la mayor cantidad de BAAR por macrófago coincide con Clarke CJ *et al* (1996) y Pérez V *et al* (1997). Solo en el caso del yeyuno no se encontraron BAAR en la lesión 3a. La persistencia de la poca cantidad de BAAR observado en algunos casos, por largos periodos puede reflejar un balance entre las defensas del huésped y la resistencia del agente, produciendo casos subclínicos<sup>1</sup>. lo cual se presentó en en 5/9 animales en este trabajo. La progresión de dichos casos, de meses hasta años de periodo de incubación, hacia el espectro multibacilar con signos clínicos de la PTB en la actualidad no se conoce, pero puede dispararse por una supresión o debilidad en la inmunidad celular, permitiendo la proliferación de micobacterias y su eliminación por heces<sup>1</sup>.

En la presente investigación, la población (9/20) con presencia de BAAR no presentó una distribución con tendencia hacia algún subintervalo de densidad óptica en específico en ninguna de las 3 regiones anatómicas del intestino. A pesar de que se mostró una ligera tendencia a aumentar el número promedio de BAAR por macrófago del subintervalo 0.878-0.967 hacia el último, no se determinó como una posible relación entre ambas variables, ya que en el último subintervalo solo se asignó un animal.

Un estudio realizado en borregos por Clarke CJ *et al.* (1996), se informó que los altos niveles de anticuerpos parecen correlacionarse con el gran número de micobacterias, posiblemente a causa de una respuesta inmune humoral en contra del agente causal liberado por la lisis de los macrófagos infectados, lo cual se observó solo en un animal identificado en el último subintervalo de densidad óptica (1.056-1.145), con la lesión clásica de PTB, y mayor número promedio de BAAR por macrófago.

Como se mostró en el cuadro 1 existen diferentes porcentajes de sensibilidad y especificidad de la prueba de ELISA, de acuerdo a la técnica empleada, estado clínico y especie animal. En el ganado bovino se cuenta con una prueba de ELISA empleando un kit comercial (IDEXX, Inc. Westbrook, ME), la cual refleja que las más altas relaciones S/P (muestra-control negativo/control positivo-control negativo), se localizan en bovinos con mayor cantidad de bacterias eliminadas en heces. Con base en esto, se tiene conocimiento del estado de enfermedad del animal, y a partir de esto se pueden implementar algunas medidas de control<sup>27</sup>. Aún cuando esta prueba solo puede emplearse en ganado bovino, es una base para que en un futuro se pueda utilizar en ganado ovino y caprino con el fin de tener conocimiento del estado en que se encuentra el hato.

Con el fin de comenzar un programa de control de la enfermedad de Paratuberculosis se decidió eliminar del hato a todos los animales positivos a la prueba de ELISA. Sin embargo esto no fue factible y solo 17 animales seropositivos se sacrificaron. A pesar de esto, los otros 33 animales seropositivos se eliminaron del hato, pero no fueron sacrificados, siendo un riesgo potencial de diseminación de la enfermedad.

El hecho de no haber observado una clara asociación entre los valores del coeficiente de densidad óptica de la prueba de ELISA con la gravedad de los hallazgos histopatológicos y la cantidad de bacilos ácido alcohol resistentes por macrófago en la población estudiada, puede atribuirse a las respuestas inmunológicas variables, durante el curso de la enfermedad, las cuales pueden influenciar en el resultado serológico e histopatológico. Sin embargo, con el fin de confirmar o descartar lo anterior, posteriores estudios deberán llevarse a cabo con una población mayor con resultados positivos a la prueba de ELISA.

## Referencias

- 1.- Clarke CJ. The pathology and pathogenesis of Paratuberculosis in ruminants and other species. *J Comp Pathol* 1997;116:217-261.
- 2.- Burrells C, Clarke CJ, Colston A, Kay JM, Porter J, Little D et al. A study of immunological responses of sheep clinically-affected with paratuberculosis (Johne's disease). The relationship of blood, mesenteric lymph node and intestinal lymphocyte responses to gross and microscopic pathology. *Vet Immunol Immunopathol* 1998;66:343-358.
- 3.- Mainar-Jaime RC, Vázquez-Boland JA. Factors associated with seroprevalence to *Mycobacterium paratuberculosis* in small-ruminant farms in the Madrid region (Spain). *Prev Vet Med* 1998;34:317-327.
- 4.- Muskens J, Barkema HW, Russchen E, van Maanen K, Schukken YH and Bakker D. Prevalence and regional distribution of paratuberculosis in dairy herds in the Netherlands. *Vet Microbiol* 2000;77:253-261.
- 5.- Buergelt CD and Ginn PE. The histopathologic diagnosis of subclinical Johne's disease in North American Bison (*Bison bison*). *Vet Microbiol* 2000;77:325-331.
- 6.- Sweeney RW, Whitlock RH, Buckley CL, Spencer P, Rosenberger A and Hutchinson L. Diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle, using enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. *Am J Vet Res* 1994; 55:905-909.

- 7.- Corpa JM, Garrido J, García-Marín JF and Pérez V. Classification of lesions observed in natural cases of paratuberculosis in goats. *J Comp Pathol* 2000; 122: 255-265.
- 8.-Muskens J, Bakker D, de Boer J and van Keulen L. Paratuberculosis in sheep: Its possible role in the epidemiology of paratuberculosis in cattle. *Vet Microbiol* 2000;78:101-109.
- 9.-. Wraight MD, McNeil J, Beggs DS, Greenall RK, Humphris TB, Irwin RJ, Jagoe SP *et al*. Compliance of Victorian dairy farmers with current calf rearing recommendations for control of Johne's disease. *Vet Microbiol* 2000;77:429-442
- 10.- Riemann HP and Abbas B. Diagnosis and control of bovine paratuberculosis (Johne's Disease) 1984;27:481-506.
- 11.- Burnside O and Rowley B. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of paratuberculosis in goats. *Am J Vet Res* 1994; 4:465-466.
- 12.- Gezon H, Bither D, Gibbs H *et al*. Identification and control of paratuberculosis in a large goat herd. *Am J Vet Res* 1998; 49:1817-1823.
- 13.- Pérez V, García Marin JF and Badiola JJ: Description and classification of different types of lesion associated with natural paratuberculosis in sheep. *J Comp Pathol* 1996;114:107-122.
- 14.- Domínguez M. Características anatomopatológicas, hallazgos bacteriológicos y respuesta inmune posteriores a un año de la inmunización de un rebaño caprino con antecedentes de

paratuberculosis. Tesis Maestría. Distrito Federal México FMVZ UNAM 2000.

15.- Clarke CJ and Little D: The Pathology of Ovine Paratuberculosis: Gross and Histological Changes in the Intestine and Other Tissues. J Comp Pathol 1996;114:419-437.

16.- Collins MT and Sockett DC: Accuracy and economics of the USDA-licensed enzyme-linked immunosorbent assay for bovine paratuberculosis. J Am Vet Med Assoc 1993;203:1456-1463.

17.- Pérez V, Tellechea J, Badiola JJ, Gutiérrez M, and García Marin JF. Relation between serologic response and pathologic findings in sheep with naturally acquired paratuberculosis. AJVR 1997;58:799-803.

18.- Whitlock RH, Wells SJ, Sweeney RW and Van Tiem J. ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease):sensitivity and specificity of each method. Vet Microbiol 2000;77:387-398.

19.- Colgrove GS, Thoen CO, Blackburn BO and Murphy CD:Paratuberculosis in cattle:A comparison of three serologic test with results of fecal culture. Vet Microbiol 1989;19:183-187.

20.- Molina A, Morera L and Llanes. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Mycobacterium paratuberculosis* in goats. Am J Vet Res 1991; 52:863-868.

21.- Clarke CJ, Patterson IA, Armstrong KE and Low J. Comparison of the absorbed ELISA and agar gel immunodiffusion test with



clinicopathological findings in ovine clinical paratuberculosis. Vet Res 1996; 139:618-621.

22.- Shulaw WP, Bech-Nielsen S, Rings DM, Getzy DM and Woodruff TS. Serodiagnosis of paratuberculosis in sheep by use of agar gel immunodiffusion. Am J Vet Res 1993;54:13-19.

23.- Milner AR, Lepper AWD, Symons WN and Gruner E. Analysis by ELISA and Western blotting of antibody reactivities in cattle infected with Mycobacterium paratuberculosis after absorption of serum with M phlei. Res Vet Sci 1987;140-144.

24.- Milner AR, Mack WN and Coates KJ. A modified ELISA for the detection of goats infected with Mycobacterium paratuberculosis. Aust Vet J 1989; 9:305-306.

25.- Dubash K, Shulaw WP, Bech-Nielsen S, Stills HF Jr, Slemons RD. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay licensed by the USDA for use in cattle for diagnosis of ovine paratuberculosis. J Vet Diagn Invest 1995;7:347-351 .

26.- Hilbink F, West DM, de Lisle GW, Kittelberger R, Hosie BD, Hutton J, Cooke MM, Penrose M. Comparison of complement fixation test, a gel diffusion test and two absorbed and unabsorbed ELISAs for the diagnosis of paratuberculosis in sheep. Vet Microbiol 1994;41:107-116.

27.- Christine R and Hansen D. Johne's Disease Diagnostic Test-the ELISA. Diagnostic Testing for Johne's Disease in Cattle (serial

- online)(cited 2002 March 22):(5 screens). Available from:  
URL:[http://www.aabp-orf/johnes/johnes4\\_2.html](http://www.aabp-orf/johnes/johnes4_2.html)
- 28.- Hope AF, Kluver PF, Jones SL and Condron RJ. Sensitivity and specificity of two serological test for the detection of ovine paratuberculosis. *Aust Vet J* 2000;78:850-856.
- 29.- García Marin JF, Chávez GG, Pérez PV, Aduriz JJ, Juste R y Badiola JJ. Estudio de lesiones intestinales en caprinos procedentes de rebaños afectados de paratuberculosis y comparación de métodos de diagnóstico. *Información técnica económica agraria* 1991; 2:650-652.
- 30.- Sweeney RW, Whitlock RH, Buckley CL *et al*. Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle: *J Vet Diagn Invest* 1995; 7:488-493.
- 31.- García E. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. 4ta ed. México (D.F.):SIGSA 1988.
- 32.- Carrigan MJ and Seaman JT. The pathology of Johne's disease in sheep. *Aust Vet J* 1990;67:47-50.
- 33.- Jubb KVF, Kennedy PC and Palmer N. *Pathology of Domestic Animals*, 4<sup>th</sup> edition, Academic Press, London, vol 2.(1993).
- 34.- Whittington RJ and Sergeant ESG. Progress toward understanding the spread, detection and control of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Aust Vet J* 2001;79:267-278.

35.- Pérez V, Tellechea J, Corpa JM, Gutiérrez M, García Marín JF.  
Relation between pathologic findings and cellular immune responses in  
sheep with naturally acquired paratuberculosis. AJVR 1999;60:123-127.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN