01672 3

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

División de Estudios de Posgrado e Investigación

Características Anatomopatológicas, Hallazgos Bacteriológicos y Respuesta Inmune Posteriores a un Año de la Inmunización de un Rebaño Caprino con Antecedentes de Paratuberculosis.

T E S I S

Para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS VETERINARIAS

Area Patología

Presentada por:

MVZ María de la Cruz Domínguez Punaro

Asesores:

MVZ, Dr., Gilberto Chávez Gris

MVZ, PhD., Francisco J. Trigo Tavera

MVZ, PhD., Francisco Suárez Güemes

México, D. F. 2000

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo forma parte del

Proyecto CONACyT 25395-B

"Evaluación inmunológica post-vacunal,

efecto sobre la producción y diferenciación de

Mycobacterium avium subsp *paratuberculosis*"

DEDICATORIAS

A **Dios**. Por permitirme llegar hasta aquí.

Con mucho cariño, a la memoria de mi papá, **Don Pepe.** Porque nos dimos la oportunidad de empezar de nuevo y llegar a ser los mejores amigos. Porque me enseñaste que a la vida hay que tomarla como viene y que nunca es tarde para volver a empezar. Espero volver a verte.

Hondo, muy hondo,
dentro del cuerpo habita el alma.
Nadie la ha visto nunca
pero todos saben que existe.
Hasta ahora no ha nacido hombre sin alma.
Porque el alma
se introduce en nosotros cuando nacemos,
y no nos abandona
ni siquiera una vez mientras vivimos.
Como el aire que el hombre respira
desde su nacimiento hasta su muerte.
Mijal Snunit

A **Gilberto**. Porque eres lo más importante en mi vida y mi mejor amigo. Porque deseo seguir recorriendo el camino a tu lado. Gracias por estar conmigo, apoyarme siempre y alentarme a seguir adelante. Espero nunca defraudarte. Te amo (hoy y siempre). xxx-ooo.

A mi **mamá**. Porque estás en mi corazón.

A mis queridísimos hermanos **Silvia** y **Pepe**, mis cuñados **Moisés** y **Paty** y a mis sobrinos **Max** y **Ricky.** Por estar siempre conmigo y apoyarme. Los quiero mucho.

A **Alex, Fausto, Josefina, Adriana, Abel, Rocío, Carlos U., Francisco B. y Toño V.** Me siento agradecida de haber encontrado nuevos amigos en el camino.

A **Norma D.** y **Karina**. Mis queridas amigas, muchas gracias por toda la "buena vibra".

A **Alicia, Rafael, Fernando, Cristina, Allein, Michelle, Rocío, Ernesto, Yael, Yolanda, Arturo, Elsa, Eloísa, Hugo y Hugito**. Porque los considero mi familia.

A mi pandilla: **Ramsés, Teté, Trompo, el Chicles, Mushi y Chicho** (q.e.p.d.). Los quiero mucho.

A las **cabras**.

AGRADECIMIENTOS

Con respeto y cariño, a mi *alma mater*, la **Universidad Nacional Autónoma de México**.

Al **Depto. de Patología** de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, del cual estoy muy orgullosa de formar parte, con mención especial para la **Dra. Nuria de Buen**.

A mis asesores, **MVZ, Dr., Gilberto Chávez Gris, MVZ, Ph.D., Francisco Trigo Tavera y MVZ, Ph.D., Francisco Suárez Guémes**, por guiarme y aconsejarme. Gracias por toda su ayuda.

A los laboratorios **CZ Veterinaria, S. L.**, (Pontevedra, España), en especial al **Dr. Jorge Estefanell** por la donación de la bacterina utilizada en el presente estudio.

Al **CONACyT** y **Fundación Telmex,** por haberme proporcionado una beca para realizar los estudios de maestría.

Al **Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal** (C.E.P.I.P.S.A.) de la FMVZ, por las facilidades otorgadas para la elaboración del presente estudio.

Al **Dr. Héctor Castell Blanch**, Director General de PRONABIVE por la donación de los derivados protéicos aviar y bovino.

A todos mis **profesores** de la maestría, tanto de la FMVZ como del Hospital General de México. Muchas gracias por compartir sus conocimientos.

A la **MVZ Josefina del Río Alfaro,** por toda tu ayuda, pero en especial, por tu compañía.

Al **MVZ, PhD., Roberto A. Cervantes O.**, por su ayuda para montar la técnica de CIE.

A la **MVZ Irasema Yela M.,** por su ayuda en el cultivo bacteriológico.

A los técnicos en histología, **Luis Antonio Morales A., Eduardo Miranda L.** y **Guadalupe Juárez J**. Quienes elaboraron las preparaciones histológicas y tinciones especiales.

A **Jaime Eugenio Córdova**, quien elaboró el material fotográfico. Te lo agradezco infinitamente.

A **Don Aureliano** y **Don Benito**, por toda su ayuda en la sala de necropsias.

A mi H. Jurado:
MVZ., PhD., Roberto A. Cervantes Olivares,
MVZ, MsC., Armando Mateos Poumian.,
MVZ, M en C., Francisco Javier Basurto Alcántara,
DVM, Ph.D., Garry Adams
y MVZ, Ph.D., Francisco J. Trigo Tavera.
Por todos sus comentarios, correcciones y sugerencias para mejorar este trabajo.

INDICE

GLOSARIO VIII

RESUMEN 1

ABSTRACT 2

INTRODUCCION 3
1.1 Definición de la enfermedad 3
1.2 Antecedentes históricos 3
1.3 Presencia de *Map* en México 4
1.4 Importancia económica 4
1.5 Agente causal de la paratuberculosis 5
1.6 Patogenia de la paratuberculosis 6
1.7 Características Anatomopatológicas 8
1.8 Características de la respuesta inmune en paratuberculosis 12
1.8.1 Respuesta inmune celular 12
1.8.2 Respuesta inmune humoral 14
1.9 Diagnóstico 15
1.9.1 Evaluación de la respuesta inmune humoral 15
1.9.1.1 Fijación de Complemento 16
1.9.1.2 Inmuno Ensayo Enzimático 17
1.9.1.3 Inmuno Difusión en Gel de Agar 19
1.9.1.4 Contrainmuno Electroforesis 20
1.9.2 Evaluación de la respuesta inmune celular 20
1.9.2.1 Intradermorreacción 20
1.9.2.2 Interferón gamma 21
1.9.2.3 Estimulación de la proliferación linfocitaria 22
1.9.3 Diagnóstico Bacteriológico 22
1.10 La paratuberculosis y las técnicas de biología molecular 24
1.11 Control 25
1.12 Inmunización 27

JUSTIFICACIÓN 32
OBJETIVOS E HIPÓTESIS 33

MATERIAL Y METODOS 34
2.1 Animales 34
2.2 Inmunógeno 34
2.3 Evaluación de la respuesta inmune humoral 35
2.3.1 Obtención y procesamiento de las muestras 35
2.3.2 Inmuno Difusión en Gel de Agar 35
2.3.3 Inmuno Ensayo Enzimático 36
2.3.4 Contrainmuno Electroforesis 37
2.4 Evaluación de la respuesta inmune celular 39
2.4.1 Prueba de intradermorreacción 39
2.5 Estudio anatomopatológico 39
2.5.1 Toma de muestras 40
2.5.2 Procesamiento de muestras 40
2.5.3 Clasificación de lesiones 40
2.6 Estudios bacteriológicos 41
2.6.1 Toma de muestras 41
2.6.2 Procesamiento de muestras 41
2.7 Análisis estadístico 42

RESULTADOS 43
3.1 Evaluación de la respuesta inmune humoral 43
3.1.1 Resultados por cada muestreo 43
3.2 Evaluación de la respuesta inmune celular 50
3.2.1 Intradermorreacción 50
3.3 Estudio *post mortem* 54
3.4 Estudio bacteriológico 61

DISCUSION 62
4.1 Respuesta inmune humoral 63
4.2 Respuesta inmune celular 65
4.3 Estudio anatomopatológico 67
4.4 Estudio bacteriológico 69

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 72

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.

Cuadro 1. Clasificación de las lesiones de paratuberculosis 11
Cuadro 2. Número de animales reactores positivos y negativos a las pruebas serológicas. Grupos A y B. 47
Cuadro 3. Porcentaje de animales reactores positivos a

las pruebas serológicas 47
Cuadro 4. Concordancia entre pruebas serológicas. Grupo A 48
Cuadro 5. Concordancia entre pruebas serológicas. Grupo B 48
Cuadro 6. Grupo A. Resultados pruebas de Intradermorreacción 52
Cuadro 7. Grupo A. Resultados pruebas de Intradermorreacción 52
Cuadro 8. Tipos de lesión intestinal. Grupos A y B 56

Figura 1. Animales positivos a pruebas serológicas. Grupo A 49
Figura 2. Animales positivos a pruebas serológicas. Grupo B 49
Figura 3. Prueba de intradermorreacción. Grupo A 53
Figura 4. Prueba de intradermorreacción. Grupo B 53
Figura 5. Prueba de contrainmuno electroforesis. 57
Figura 6. Engrosamiento de la mucosa intestinal 57
Figura 7. Reacción granulomatosa en la mucosa Intestinal. 58
Figura 8. Endolinfangitis granulomatosa 58
Figura 9. Endolinfangitis granulomatosa con BAAR 59
Figura 10. Linfonodo mesentérico con reacción granulomatosa y calcificación 59
Figura 11. Linfadenitis granulomatosa con BAAR 60
Figura 12. Medio de Löwenstein-Jensen con micobactina con colonias de *Map* 60

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Reactivos necesarios para la técnica de ELISA 82
Anexo 2. Reactivos necesarios para la técnica de CIE 84
Anexo 3. Reactivos y material necesarios para preparar el medio de Löwenstein-Jensen con Micobactina 85
Anexo 4. Resultados pruebas serológicas. Grupo A 87
Anexo 5. Resultados pruebas serológicas. Grupo B 89
Anexo 6. Resultados estudios *post mortem* y bacteriológico. Grupo A 90
Anexo 7. Resultados estudios *post mortem* y bacteriológico. Grupo B 94

GLOSARIO

BAAR	Bacilos ácido alcohol resistentes
GCM	Células gigantes multinucleadas
CIE	Contrainmuno electroforesis
Células M	Células epiteliales membranosas
CPH	Complejo principal de histocompatibilidad
dpi	Días posteriores a la inoculación
ELISA	Inmuno Ensayo Enzimático
FC	Fijación de Complemento
FNT-α	Factor de necrosis tumoral alfa
IDGA	Inmuno Difusión en Gel de Agar
IDR	Intradermorreacción
IFN-γ	Interferón gamma
IL	Interleucina
LAM	Lipidoarabinomanan
LT	Linfocito T
LTc	Linfocito T citotóxico
LTh	Linfocito T cooperador
Map	*Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*
mpi	Meses posteriores a la inoculación
NK	Linfocito "asesino natural"
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PP	Placa de Peyer
PPD-A	Derivado Proteico Purificado Aviar
PPD-B	Derivado Proteico Purificado Bovino
RIC	Respuesta inmune celular
RIH	Respuesta inmune humoral
TCR	Receptor de linfocitos T

RESUMEN

María de la Cruz Domínguez Punaro. "CARACTERISTICAS ANATOMOPATOLOGICAS, HALLAZGOS BACTERIOLOGICOS Y RESPUESTA INMUNE POSTERIORES A UN AÑO DE LA INMUNIZACION DE UN REBAÑO CAPRINO CON ANTECEDENTES DE PARATUBERCULOSIS". Bajo la supervisión de MVZ, Dr., Gilberto Chávez Gris; MVZ, Ph., Francisco J. Trigo T. y MVZ, PhD., Francisco Suárez Güemes.

La paratuberculosis es una enfermedad contagiosa crónica, causada por *Mycobacterium* avium *subespecie paratuberculosis (Map)*, la cual afecta rumiantes domésticos y salvajes, causando lesiones granulomatosas en intestino y linfonodos mesentéricos. Actualmente, en México no se aplica ningún tipo de inmunógeno para su control. El objetivo fue evaluar el tipo de lesión paratuberculosa y respuestas inmunes humoral y celular, así como los hallazgos bacteriológicos posteriores a la aplicación de una bacterina en ganado caprino con infección natural. Se utilizó un rebaño caprino con 120 animales adultos. 88 animales (grupo A) (73.4%) fueron inmunizados con una bacterina comercial con cepa 3T6F de *Map*. 32 (grupo B) (26.6%) quedaron como testigo. La evaluación de la respuesta inmune humoral (RIH) se hizo mediante Inmuno Difusión en Gel Agar (IDGA), Inmuno Ensayo Enzimático (ELISA) y Contra Inmuno Electroforesis (CIE). Con este fin, se realizó un total de 7 muestreos, uno antes de la aplicación del inmunógeno y los demás a los 15, 30, 60, 150, 240 y 330 días posteriores a la inmunización (dpi). La respuesta inmune celular (RIC) se evaluó mediante la prueba de intradermorreacción (IDR) empleando PPD-aviar y PPD-bovino antes de la inmunización y a los 21 y 150 dpi. Se realizó la necropsia a 17 animales del grupo A y 10 del grupo B. Las muestras fueron procesadas de manera rutinaria y teñidas con Hematoxilina-Eosina y Ziehl-Neelsen para su observación al microscopio de luz. Las lesiones intestinales de la enfermedad se graduaron de acuerdo a criterios ya establecidos. Se intentó el aislamiento bacteriológico en medios de Lowenstein-Jensen con y sin micobactina a partir de secciones de válvula ileocecal, íleon, yeyuno, linfonodos mesentéricos y heces de los animales a los que se les realizó el estudio *post mortem*. Los resultados se analizaron con las pruebas Exacta de Fisher, X^2 y Kruskal Wallis con empates, todas ellas con un $\alpha \leq 0.05$. Los estudios serológicos mostraron un incremento significativo en el nivel de anticuerpos en el grupo A entre los 15 y 60 dpi ($P<0.05$), para posteriormente, sufrir un descenso drástico en el nivel de los mismos. El grupo B no mostró variaciones significativas a lo largo del experimento ($P>0.05$). La respuesta inmune celular en el grupo A mostró un aumento significativo posterior a la inmunización ($P<0.05$), que además se mantuvo constante a lo largo del experimento. Con respecto al estudio *post mortem*, 10 animales del grupo A y 5 del grupo B mostraron lesiones de paratuberculosis, con diversos grados de severidad y presencia de bacilos ácido alcohol resistentes. No se observaron diferencias significativas entre grupos ($P>0.05$). Se obtuvo el aislamiento de *Map* a partir de muestras de tejido y de heces del 70% y 20%, respectivamente, de los caprinos del grupo A con lesiones de paratuberculosis. En el grupo B, se obtuvo el aislamiento de la micobacteria a partir de órganos del 100% de los animales con lesiones de la enfermedad y del 40% de éstos. Todo esto indica que aún animales inmunizados eran diseminadores de la enfermedad. La RIH indica que la inmunización solo interfiere con el diagnóstico serológico por un período breve, mientras que la RIC es más fuerte y posiblemente sería la responsable de modificar el curso de las lesiones en los animales infectados. Se concluye que si se desea disminuir la prevalencia de paratuberculosis en la explotación, es necesario proseguir con el programa de vacunación cada año con los animales de reemplazo, además de establecer medidas de manejo que ayuden a disminuir la presentación de la paratuberculosis.

ABSTRACT

María de la Cruz Domínguez Punaro. "Pathologic features, bacteriologic findings and immune responses after the immunization of a goat flock with Paratuberculosis". Assessors: MVZ, Dr., Gilberto Chávez Gris, MVZ, PhD., Francisco J. Trigo Tavera and MVZ, PhD., Francisco Suárez Güemes.

Paratuberculosis (Johne's disease) is a contagious, chronic disease caused by *Mycobacterum avium* subsp *paratuberculosis (Map)*, that affects both domestic and wild ruminants, causing granulomatous lesions in the intestine and mesenteric lymph nodes. There are no paratuberculosis vaccines in Mexico. The objective of this study was to evaluate the type of paratuberculous lesion, the humoral and cellular immune responses, as well as the bacteriological findings after vaccinating a goat flock with natural infection. The study was carried out in a goat flock with 120 adult animals. Eighty eight (Group A) goats were vaccinated using a commercial bacterine containing strain 316F of *Map*. Thirty two goats (Group B) were kept as controls. The evaluation of the humoral immune response was temporally measured seven times by AGID (Agar Gel Immunodifussion), ELISA (Enzime Linked Immuno Sorbent Assay) and CIE (Counter Immuno Electrophoresis). The 1st sample was collected just before vaccination, and the others at 15, 30, 60, 150, 240 and 330 days after vaccination (dav). Cellular immune response was evaluated by measuring delayed type hypersensivity dermal reactions using PPD-A and PPD-B. This test was performed before vaccination and at 21 and 150 dav. Seventeen animals from group A and 10 from group B were necropsied at different times during one year . Samples were processed and slides were stained using Hematoxiline-Eosine and Ziehl-Neelsen. Intestinal lesions were graduated according to established criteria. For bacteriological isolation, samples from ileocecal valve, ileum, jejunum, mesenteric lymph nodes and feces were collected and cultered using Löwenstein-Jensen culture media with and without mycobactin. Data were analized using Fisher Exact test, χ^2 and Kruskal- Wallis with an α=0.05. Group A had a significant increase in the antibody level between 15 and 60 days post vaccination ($p<0.05$), then, the antibody level decreased dramatically. Group B had no significant differences through all the experiment ($p>0.05$). In group A, cellular immune response increased significantly after vaccination ($p<0.05$) and did not decreased. Ten animals from Group A and 5 from Group B had paratuberculosis lesions, which varied in severity and in the amount of acid fast bacilli. No differences were observed between groups ($p>0.05$). *Map* isolation was obtained from 70% of tissue samples and 20% of feces from Group A with paratuberculosis lesions. In Group B, *Map* was isolated from 100% of animals with paratuberculosis lesions and from 40% from feces. All these findings indicate that vaccinated goats remained paratuberculosis carriers. Humoral immune responses seemed to interfere with serologic diagnosis just for a brief period, while the cellular immune response is stronger and possibly would be responsible of modifying the course of the lesions of infected goats. To control the prevalence of the disease in goats, could be necessary vaccinate annually and to implement effective management strategies.

INTRODUCCION

1.1 Definición de la enfermedad.

La Paratuberculosis o Enfermedad de Johne, es una enfermedad contagiosa de tipo crónico causada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, (*Map*) un bacilo ácido alcohol resistente de lento crecimiento (Elksen, *et al*; 1985; Sweeney, 1997). Esta enfermedad afecta a rumiantes domésticos y silvestres como bovinos, ovinos, caprinos, venados y camellos (Beeman, 1989; Elksen, *et al*; 1985; Juste, 1984; Seltz, 1989, Wren, 1993), causando lesiones granulomatosas en intestino y linfonodos mesentéricos (Juste, 1984). Existen evidencias de que esta enfermedad también puede afectar a cerdos y equinos (Thorel, 1989).

1.2 Antecedentes históricos.

El primer informe de paratuberculosis se estableció en Alemania por H. A. Johne y L. Frothingham, quienes describieron un "caso peculiar de tuberculosis" en una vaca con enteritis crónica en el año de 1895. Al examinar el cadáver, encontraron la mucosa intestinal con engrosamiento grave, difuso y con presencia de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) en las lesiones (Clarke, 1997). El material fue remitido a R. Koch, quien supuso que la infección era un tipo de tuberculosis intestinal. Años más tarde, se determinó que en realidad se trataba de una enfermedad diferente, causada por una micobacteria distinta a *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. avium* y se le denominó como bacilo pseudotuberculoso. Posteriormente, en 1912, Tworth e Ingram, lograron el primer aislamiento de esta bacteria y la clasificaron como *M. johnei* (Goudswaard, *et al*, 1972), la cual actualmente es designada como *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* (Sweeney, 1997; Thorel, 1990).

1. 3 Presencia de *Map* en México.

La paratuberculosis se encuentra ampliamente distribuida en todo el mundo, incluyendo a México. En nuestro país, el primer informe de *Map* se determinó mediante el aislamiento de la bacteria a partir de heces de bovinos (Ramírez, *et al*, 1979), sin embargo, hasta la fecha se carece de estudios que determinen la prevalencia de la enfermedad a escala nacional, así como las pérdidas económicas derivadas de su presencia (Chávez, 1996). Los estudios de paratuberculosis en México son escasos. En su mayoría han sido de tipo experimental y se han encaminado principalmente a la comparación de diferentes técnicas de diagnóstico de la enfermedad en pequeños rumiantes (De Lucas, 1984: Vélez, 1998), así como al ensayo de inmunógenos para su control (Oviedo, 1991).

1. 4 Importancia económica.

Esta enfermedad se considera como una de las más costosas y prevalentes en el ganado bovino (Collins, *et al*, 1994). Sin embargo, debido a que sus manifestaciones clínicas solamente llegan a ser evidentes en algunos casos, su importancia real se ha subvalorado en muchas ocasiones (Juste, 1984). Las pérdidas que provoca en la ganadería son debidas principalmente a la muerte o desecho de los animales, así como a la disminución en la productividad (Thoen, *et al*, 1988), llegándose a estimar que en hatos bovinos con una prevalencia mayor al 5% en paratuberculosis, ocasiona una disminución del 5 al 25% en la producción de leche (Collins, *et al*, 1994). Además, se considera que en algunos hatos es responsable del 3 al 10% de las muertes en animales adultos (Chiodini, *et al*, 1984). En el caso de rebaños ovinos, la paratuberculosis puede establecerse de manera subclínica, causando algunas pérdidas por año, hasta que estas llegan a ser de aproximadamente un 5% (Cranwell, 1993). Además, su presencia se asocia a fallas en la reproducción, aumento de la susceptibilidad a otras infecciones, disminución

en la producción de lana y costos elevados por diagnóstico (Beeman, 1989; Chiodini, *et al*, 1984 ; Collins, *et al*, 1994).

1. 5 Agente causal de la paratuberculosis.

Los principales agentes etiológicos de las infecciones micobacterianas pertenecen a los complejos *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium avium-intracellulare*, el cual incluye al *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* (*Map*), el agente causal de la paratuberculosis (Bercovier, 1997). Esta es una micobacteria de lento crecimiento, ácido alcohol resistente, que mide de 0.5 a 1.5 µm, con poca afinidad por la tinción de Gram, que es capaz de resistir en el medio ambiente por largos períodos y que para su crecimiento *in vitro* necesita de la adición de micobactina, un agente quelante del hierro (Beeman, 1989; Clark, 1997; Chiodini, *et al*, 1984). La micobactina es una molécula lipofílica que se encarga de transportar el hierro a través de las gruesas capas de la pared micobacteriana (Thorel, 1984). El hierro se libera de la micobactina al transformarse de ácido férrico a ácido ferroso, que se puede usar para el metabolismo intracelular (Macham, *et al*, 1975).

Este microorganismo se caracteriza por poseer una compleja pared micobacteriana relativamente impermeable, rica en lípidos. Esta pared celular consiste de una capa interna de peptidoglican, una doble capa interna, asimétrica, con ácidos grasos de cadenas largas (ácidos micólicos) unidos a arabinogalactan, además de una capa externa de peptidoglicolípidos (micósidos) (Clarke, 1997). Su pared celular también posee un glicolípido, el lipoarabinomanan (LAM), que está asociado a la inducción de la respuesta inmune celular (Bercovier, 1997). Con la ayuda de técnicas moleculares se ha determinado que *Map* posee una secuencia única de inserción, la IS900, con 15 a 20 copias por microorganismo (Thorel, 1989). El estudio de la expresión de proteínas celulares y extracelulares ha determinado la presencia de diversas proteínas con masas moleculares de 28 y 32KD, que se expresan tanto en *M. avium* como en *Map*, aunque con mayor firmeza en esta última. Además, *Map*

posee una proteína específica de 42KD. La comparación de estos perfiles podría ser de utilidad para diferenciar aislamientos de *Map* con otras micobacterias (White, *et al*, 1994).

1.6 Patogenia de la paratuberculosis.

La cronología de la infección y de la enfermedad involucra diferentes fases. La infección ocurre durante las etapas tempranas de vida, antes de los 4 meses de edad (Beeman, 1989; Collins, *et al*, 1994; Wren, 1993), con un período de incubación variable, ya que oscila entre 6 meses a varios años (Chiodini, 1984). Existen evidencias de que las cabras son más susceptibles a la infección y que al parecer se pueden infectar aún siendo adultas (Elksen, *et al*, 1985). Los signos clínicos se observan en animales de 2 a 5 años en el caso de los bovinos y de 1 a 3 años cuando se trata de ovinos y caprinos. Estos consisten en disminución progresiva de peso, edema intermandibular y en párpados por hipoproteinemia secundaria a la mala absorción, heces pastosas y disminución en la producción de leche. En los bovinos es característica la diarrea intermitente que se prolonga por meses y que no cede al tratamiento (Beeman, 1989; Chiodini, *et al*, 1984; Colgrove, *et al*, 1989; Cranwell, 1993; Seltz, *et al*, 1989; Thoresen, *et al*, 1994; Wren, 1993).

La vía de entrada del microorganismo es por la vía oral una vez que ha sido eliminado en la leche o heces (Beeman, 1989; Wren, 1993), aunque en menor medida también existe la infección *in utero* (Collins, *et al*, 1994; Seltz, *et al*, 1989). Después, la bacteria es internalizada hacia la mucosa intestinal del íleon y yeyuno. De acuerdo con Chiodini (1996b), parece ser que esto ocurre por tres vías diferentes, denominadas como la ruta de las células M, la vía paracelular y la ruta transcelular. En el primer caso, que es el más común, intervienen las células M (células epiteliales membranosas) que se encuentran en los domos que cubren el tejido linfoide organizado asociado a la mucosa, comúnmente denominado como Placas de Peyer (PP). En el íleon terminal de becerros, el epitelio que recubre a las

PP puede estar constituido en su totalidad por estas células (Jepson, *et al*, 1998; Momotani, *et al*, 1988). Las células M muestran microvellosidades delgadas, un citoesqueleto menos rígido y su superficie luminal carece de glucocálix. Estas células se encuentran unidas entre sí por desmosomas e interdigitaciones y se especializan en presentar antígenos no procesados a los macrófagos por medio de vacuolas, en un proceso denominado como trancitosis (Jepson, *et al*, 1998; Polotsky, *et al*, 1994; Siebers, *et al*, 1996). En la ruta paracelular, el antígeno penetra la mucosa a través de uniones intercelulares y llega intacto a la lámina propia, mientras que en la vía transcelular, el microorganismo entra a la célula epitelial intestinal por endocitosis y es procesado dentro de esta misma célula epitelial. Los antígenos así procesados son expresados en la cara basolateral de la superficie celular en asociación con moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad de tipo II (CPH-II) (Chiodini, 1996).

En todos los casos, la habilidad de *Map* para sobrevivir dentro de los macrófagos del hospedador es sin duda, esencial para el desarrollo de la enfermedad. El lipidoarabinomanan (LAM), los fosfolípidos, la cera D y otros glicolípidos presentes en la pared micobacteriana juegan un papel importante en la adhesión e internalización del microorganismo hacia el macrófago y posiblemente también en células epiteliales. Una vez dentro de esta célula, se inhibe la maduración del fagolisosoma posiblemente por inactivación de la bomba de ATPasa, la cual en circunstancias normales, acidificaría el fagosoma (Bercovier, 1997; Edwards, *et al*, 1986; Sweeney, 1997). Las lesiones iniciales de la enfermedad se observan en el área interfolicular de las PP (Chávez, *et al*, 1992; Chávez, 1993; Niesbet, *et al*, 1962). Posteriormente, las bacterias migran dentro de los macrófagos localizados en la PP hacia los linfonodos mesentéricos y hacia la lámina propia (Pérez, *et al*, 1996), lo que ocasiona en la mayoría de los casos una intensa respuesta inmune que produce las lesiones además de la eliminación de la bacteria (Bercovier, 1997; Edwards, *et al*, 1986; Sweeney, 1997). Una vez que se ha establecido la infección intestinal, la

bacteria migra vía linfática hacia linfonodos mesentéricos y sitios extra intestinales, tales como glándula mamaria (Sweeney, 1997). Además, se pueden presentar reinfecciones exógena y/o endógena, que conllevan a una falla en el sistema inmune. Solo aquellos animales que desarrollan una adecuada respuesta inmune celular (RIC) tanto en la infección inicial como en las re infecciones exógena o endógena son resistentes a la enfermedad (Chiodini, *et al*, 1996b).

1. 7 Características anatomopatológicas.

Existen diversos informes que describen las características anatomopatológicas de la infección por *Map*. Algunas de las descripciones más completas y que incluso sirven para entender la patogenia de la infección, se han realizado en ovinos (Clarke, *et al*, 1996; Pérez, *et al*, 1992; Pérez, *et al*, 1996). La primera descripción en pequeños rumiantes en la que se describe la naturaleza de las lesiones de paratuberculosis fue por Niesbet, *et al* (1962). Para este estudio se realizó una infección experimental en ovejas a las que se les inoculó *Map* por vía oral. Los primeros cambios microscópicos se observaron a los 4 meses post inoculación (mpi). Estos consistieron en discretos focos de células epitelioides en la mucosa y submucosa del íleon terminal y estaban en cercana relación con las Placas de Peyer (PP). A los 6 mpi, ocurrieron los primeros cambios macroscópicos e histológicamente se apreció engrosamiento de la mucosa debido al acúmulo de células epitelioides y células gigantes multinucleadas (CGM) tanto en la mucosa como en la submucosa asociada a las PP. Para los 12 mpi, existieron cambios tanto macroscópicos como histopatológicos a todo lo largo del intestino delgado, desde el duodeno hasta la válvula ileocecal. Histológicamente, estas lesiones estaban formadas por infiltración de linfocitos hacia la mucosa, además de numerosas células epitelioides y CGM. En 1968, Kluge, *et al*, realizan un estudio en corderos, con hallazgos similares a los descritos por Niesbet, *et al*, aunque en éste, se menciona que la primera alteración histopatológica consiste en acúmulos de

neutrófilos alrededor de los microorganismos, con una posterior asociación de macrófagos, linfocitos y CGM, además de hiperplasia de fibroblastos. Otros estudios más recientes coinciden con los mencionados anteriormente, con presencia de lesiones iniciales en el área interfolicular de las PP y una posterior extensión hacia otras áreas de la mucosa (Chávez, *et al*, 1992).

En el ovino, Clarke, *et al*, (1997), reconocen dos formas de la enfermedad, denominadas como paratuberculosis tuberculoide o paucibacilar y paratuberculosis lepromatosa o multibacilar, las cuales difieren en los tipos de células inflamatorias presentes en las lesiones y en la cantidad de BAAR observados. Esta clasificación también es aplicada al caprino. En el tipo tuberculoide, existe engrosamiento moderado de la pared del intestino, en algunas ocasiones con pliegues en la mucosa y dilatación de vasos linfáticos, aunque los cambios no son tan marcados como en el tipo lepromatoso. Al examen histológico el engrosamiento intestinal consiste principalmente en infiltración linfocitaria y algunos granulomas. La presencia de BAAR es escasa. Estos hallazgos sugieren una respuesta inmune celular, con altos niveles de γ-IFN e IL-2 y una débil respuesta humoral, al parecer regida por Th1 (Clarke, *et al*, 1996). Por su parte, la forma lepromatosa se caracteriza por un engrosamiento marcado de la pared intestinal, que incluso puede abarcar hasta la última porción del duodeno, con formación de pliegues en la mucosa, edema de la serosa intestinal y dilatación de vasos linfáticos, mientras que los linfonodos mesentéricos se encuentran aumentados de tamaño considerablemente. Microscópicamente, existe engrosamiento de la mucosa intestinal y fusión de vellosidades, debido a sábanas de macrófagos y CGM que infiltran la lámina propia e incluso la submucosa del intestino, aunque también existen numerosos linfocitos y neutrófilos. Con la tinción de Ziehl-Neelsen se aprecian numerosos BAAR dentro del citoplasma de macrófagos y CGM. En esta forma de presentación de la enfermedad al parecer se

presenta una débil respuesta inmune celular con altos niveles de anticuerpos, lo que sugiere una respuesta inmune basada en Th2 (Clarke, *et al*, 1996).

Actualmente, el sistema de clasificación de lesiones propuesto por Pérez, *et al*, (1992, 1996) es el más utilizado y al igual que la clasificación de Clarke (1997), puede ser utilizada para valorar las lesiones en el caprino. En este sistema, las lesiones microscópicas se ordenan del I al III, con base en su severidad (cuadro 1).

Cuadro 1. Clasificación de las lesiones de paratuberculosis según Pérez, *et al*, (1992, 1996).

Tipo de lesión	Características
I	No se aprecian lesiones macroscópicas. Histológicamente: Lesiones focales localizadas siempre en el área interfolicular y basal de las PP. Pequeños granulomas con macrófagos y células epitelioides. Por lo general no se observan BAAR.
II	Hallazgos macroscópicos: Discretos focos de engrosamiento de la mucosa intestinal. Hallazgos histológicos: Lesiones más marcadas en las PP, con extensión de los granulomas hacia la mucosa adyacente y lámina propia de las vellosidades intestinales. Presencia de algunos BAAR.
III	**IIIa.** Hallazgos macroscópicos: Sin cambios macroscópicos severos, solo discretos focos de engrosamiento de la mucosa. Hallazgos histológicos: Múltiples granulomas en la lámina propia, submucosa, serosa y dentro de vasos linfáticos, con extensión hacia el yeyuno. Distensión de vellosidades, engrosamiento de la mucosa. Presencia de moderada cantidad de BAAR. **IIIb.** Hallazgos macroscópicos: Engrosamiento marcado de la mucosa intestinal. Hallazgos histológicos: Numerosos macrófagos y cgm que infiltran en forma difusa a la mucosa, dando una apariencia de mosaico. Fusión de vellosidades. Presencia de numerosos BAAR. Forma lepromatosa según la clasificación de Clarke, *et al*, (1996). **IIIc.** Hallazgos macroscópicos: Engrosamiento marcado de la mucosa intestinal. Hallazgos histológicos: Enteritis granulomatosa difusa, con marcada infiltración linfocitaria. Pequeños granulomas y algunas células gigantes multinucleadas en la mucosa. BAAR escasos o nulos. Forma tuberculoide según la clasificación de Clarke, *et al*, (1996).

1. 8 Características de la respuesta inmune en paratuberculosis.

1.8.1 Respuesta inmune celular.

Al igual que con otras micobacterias, la RIC es necesaria para controlar el desarrollo de la enfermedad (Sweeney, 1997). Es bien conocida la importancia de los linfocitos T (LT) en la respuesta inmune hacia diferentes patógenos intracelulares. Todos estos LT expresan un receptor de células T (TCR) y una molécula de CD3. Este TCR es un heterodímero que está compuesto por una cadena alfa y una beta o por una cadena gama y una delta. En la sangre periférica del ratón, estas células T con cadenas α/β representan más del 90% de los linfocitos circulantes, mientras que los LT con cadenas γ/δ solo constituyen cerca del 10%. Sin embargo, se ha demostrado que estos LT γ/δ se encuentran presentes en mayor proporción en la piel, así como en los recubrimientos epiteliales del pulmón, tracto reproductivo y gastrointestinal. Adicionalmente al TCR y CD3, los LT expresan otras dos moléculas, denominadas como marcadores CD4+ y CD8+, de tal manera, que los LT pueden ser divididos en 4 grandes grupos: los LT CD4+CD8– (comúnmente denominados como CD4+), los LT CD4–CD8+ (conocidos como CD8+) , los CD4+CD8+ o "doble positivos" y los CD4–CD8–, también llamados "doble negativos". Los linfocitos CD4+ y CD8+ por lo general tienen un TCR α/β, mientras que los LT que expresan cadenas γ/δ son DN, aunque algunos son CD8+. Por lo general, los CD4+ se comportan como cooperadores (LTh), que requieren que el antígeno esté asociado a moléculas del CPH-II. Los CD8+ usualmente actúan como citotóxicos (LTc) y se asocian con moléculas del CPH-I. Por su parte, los LTγ/δ no solo se limitan al CPH-I y II, sino que también interactúan con el antígeno por medio de moléculas del CPH tipo 1b (Edwards, *et al*, 1986; Kuby, 1997; Munk, *et al*, 1990).

Los LTh a su vez se subdividen en dos poblaciones diferentes, denominadas LTh1 y LTh2 sobre la base de las citocinas que producen. Los LTh1 se relacionan directamente con la RIC ya que producen interleucina 2 (IL-2) e IFN-γ. La IL-2 es

necesaria para la proliferación de LTh y LTc, además de que estimula la clonación de linfocitos B. El IFN-γ incrementa la actividad fagocítica de los macrófagos y aumenta la expresión de moléculas del CPH-I y II. Por otra parte, los LTh2 producen IL-4 e IL-10. Estas citocinas se relacionan con la activación de linfocitos B y la respuesta inmune humoral (RIH). La IL-4 estimula la proliferación y diferenciación de linfocitos B hacia células plasmáticas, con lo que se estimula la producción de anticuerpos, mientras que la IL-10 actúa directamente sobre el macrófago y hace que esta célula detenga su producción de citocinas, por lo que también disminuye la producción de citocinas por parte de los Th1 (Edwards, *et al*, 1986; Kuby, 1997; Munk, *et al*, 1990; Sweeney, 1997). Todos estos hallazgos sugieren que aquellos animales que desarrollan una respuesta inmune basada en LTh1 resisten a la infección, mientras que aquellos en los que predomina una respuesta inmune con LTh2 sucumben a la enfermedad. Estas hipótesis se han fortalecido con diferentes hallazgos, por ejemplo, se ha visto que la producción de IFN-γ en el íleon de bovinos infectados, asintomáticos y que eliminan pocas bacterias es más alta que en animales clínicamente enfermos y que eliminan grandes cantidades de bacterias por heces (Sweeney, 1997).

En lo que concierne a los LTγ/δ, todavía no están bien definidas sus funciones efectoras (Hayday, 1995). Sin embargo, se conoce que estos linfocitos también producen diferentes interleucinas, entre las que se cuentan al IFN-γ, factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos, IL-2 (Munk, et al, 1990) e IL-4, además de que son capaces de reconocer proteínas de choque térmico (Hayday, 1995), por lo que también intervienen en la inmunidad antimicobacteriana. Así mismo, existen evidencias de que los LTc antígeno específicos y los linfocitos NK (natural killer) no antígeno específicos, participan en la respuesta inmune hacia micobacterias (Munk, *et al*, 1990).

El macrófago, al igual que el LTh tiene un sitio relevante dentro de los aspectos inmunológicos de las enfermedades micobacterianas, ya además de procesar antígenos micobacterianos y presentarlos a estos LTh (Munk, et al, 1990), produce diferentes citocinas como el IFN-γ, que en este caso, favorece la formación de células gigantes multinucleadas, además de que también secreta factor de necrosis tumoral alfa (FNT-α), IL-2, IL-6, IL-8 e IL-12. Todas estas citocinas reclutan y activan más macrófagos y linfocitos dando como resultado la muerte de los bacilos. Los LT CD4+ y CD8+ así como los LT γ/δ completan el control del crecimiento micobacteriano al matar las células infectadas (Bercovier, 1997).

1.8.2 Respuesta inmune humoral.

Por largo tiempo se ha reconocido que la respuesta inmune humoral (RIH) no provoca protección contra *Map* y que de hecho, los anticuerpos séricos aparecen hasta etapas avanzadas de la infección, cuando el animal se acerca a la etapa clínica de la enfermedad (Sweeney, 1997). En infecciones micobacterianas la RIH parece que se inicia por un aumento en la IgM, seguida por un incremento de IgG (Edwards, *et al*, 1986). Clarke (1997), menciona que varios meses después de que ocurrió la infección, al haber lisis de las células infectadas y liberación del antígeno, la RIC se debilita, por lo que las micobacterias intracelulares proliferan y se producen los anticuerpos, aunque éstos no son útiles para destruir a las micobacterias restantes que todavía están dentro de los macrófagos.

Se han realizado varios trabajos en pequeños rumiantes encaminados a diferenciar los tipos de respuesta inmune intestinal. Por ejemplo, en las ovejas se han podido establecer dos tipos de respuesta inmune, la tuberculoide o paucibacilar y la lepromatoso o multibacilar, que se relacionan directamente con el tipo de lesión intestinal (Clarke, 1997; Sweeney, 1997). La tipo tuberculoide se caracteriza por una fuerte RIC basada en Th1, con bajos niveles de anticuerpos y un aumento en los niveles de IFN-γ e IL-2. La lepromatoso, al contrario de la tuberculoide, está

formada por una pobre RIC, con bajos niveles de IFN-γ e IL-2, con un alto nivel de anticuerpos y por lo tanto, un gran número de Th2 (Clark, et al, 1996). En las cabras, se ha visto que en aquellos animales con paratuberculosis, conforme se incrementa el grado de lesión, existe un decremento en el número de CD4+ tanto en la mucosa intestinal como en linfonodos, con subsecuente aumento en los niveles de CD8+ (Navarro, *et al*, 1998).

1.9 Diagnóstico.

El diagnóstico oportuno de la paratuberculosis presenta gran número de problemas, debido a la falta de pruebas específicas y sensibles. La mayoría de los estudios enfocados hacia el diagnóstico de esta enfermedad se han realizado en bovinos y ovinos, existiendo información limitada en caprinos (Elksen, *et al*, 1985; Molina, *et al*, 1996). Los métodos disponibles fallan en identificar a todos los animales infectados y con muchas de ellos se obtienen numerosos falsos positivos o negativos (Chiodini, 1984). En general, se espera que estas pruebas diagnósticas cumplan con varias funciones. Los productores por ejemplo, necesitan una prueba que facilite el distinguir que animales están diseminando la bacteria y cuales serían los más susceptibles a desarrollar signos clínicos. Por otro lado, los compradores e importadores solo necesitan una prueba que les permita conocer aquellos animales infectados y de esta manera evitar introducir la enfermedad a la explotación, a países libres de la enfermedad o que estén en programas de control (Merkal, 1984).

1.9.1 Evaluación de la respuesta inmune humoral.

Para la identificación de animales paratuberculosos han sido utilizadas diferentes pruebas serológicas, entre las que se incluyen la fijación del complemento (FC), la inmuno difusión en gel agar (IDGA), el inmuno ensayo enzimático (ELISA) y la contra inmuno electroforesis (CIE) (Chiodini, 1984; Elksen, *et al*, 1985; Juste, 1984; Molina, *et al*, 1996; Ridge, *et al*, 1991; Shome, *et al*, 1996; Thoen, 1988; Wren, 1993).

Sin embargo, hasta el momento ninguna de ellas ofrece suficientes garantías de confiabilidad (Beeman, 1989; Goudswaard, 1972; Juste, 1984; Pérez, 1992; Sherman, 1980; Thoen, 1988), ya que aunque son sencillas y rápidas, su sensibilidad se ve influenciada por el número de bacterias que se eliminan por las heces, así como por reacciones cruzadas con otras bacterias (Tsai, *et al*, 1989; Wilks, *et al*, 1981). Sockett, *et al*, (1992) mencionan que las pruebas serológicas no deben ser utilizadas como único método diagnóstico en un programa de control o erradicación de paratuberculosis, sino que su utilidad radica en estimar periódicamente la prevalencia de la enfermedad en las explotaciones, una vez que la enfermedad haya sido controlada.

1.9.1.1 Fijación de complemento (FC).

La FC fue durante mucho tiempo la prueba serológica más utilizada para el diagnóstico de la paratuberculosis en el ganado vacuno (Colgrove, *et al*, 1989; Ratnamohan, *et al*, 1986a), considerándose incluso en algunos países como pre requerimiento para mover animales a otros estados o al extranjero (Ridge, *et al*; 1991; Sherman, *et al*; 1990), esto a pesar de que puede haber falsos negativos si los bovinos infectados no están eliminando a la bacteria o la eliminan, pero en baja cantidad (Colgrove, *et al*, 1989). En caso de los caprinos, el uso de la FC se ha limitado al diagnóstico de animales con signología clínica (Elksen, *et al*, 1985). La mayor desventaja de esta prueba es que proporciona numerosos falsos positivos y negativos (Merkal, *et al*, 1968). Se considera que al utilizar esta prueba, los falsos negativos en animales infectados por *Map* son el resultado de variaciones en la respuesta inmune, mientras que el problema de los falsos positivos es debido a la previa exposición del animal con algún otro micro organismo antigénicamente similar al bacilo paratuberculoso, por ejemplo, *Corynebacterium renale* (Wilks, *et al*, 1981).

Thoen, *et al*, (1989), al comparar la sensibilidad de la prueba de FC con las técnicas de ELISA e IDGA para el diagnóstico de paratuberculosis en bovinos, observaron que ésta era intermedia en su sensibilidad, y que presentó fallas para identificar algunos animales infectados, esto probablemente fue debido a que los anticuerpos que fijan el complemento se producen durante etapas tardías de la enfermedad y que solo son positivos aquellos animales que estén eliminando por heces gran número de micobacterias. Por otro lado, Sockket, *et al*, (1992), en un estudio similar, mencionan que la FC tiene baja sensibilidad (38.4%) y una relativamente alta especificidad (99%) debido a su alto límite de detección de anticuerpos. Este último se puede ver afectado por no utilizar antígenos heterólogos (*M. phlei*) para absorber anticuerpos no específicos.

Ratnamohan, *et al*, (1986a), encontraron una especificidad y una sensibilidad del 92.3% y 74.4%, respectivamente, considerando que los falsos positivos podrían tener diferentes orígenes. El primero de ellos sería la presencia de lesiones localizadas en animales infectados las cuales pudieran pasar desapercibidas en el estudio *post mortem*. El segundo corresponde a contacto del animal con el microorganismo con una subsecuente formación de anticuerpos, pero sin desarrollo de la enfermedad. El tercero se refiere a la exposición del animal con otro tipo de micobacterias, que pudieran dar lugar a reacciones cruzadas. Finalmente, también se considera como una causa para la presencia de falsos positivos, una infección con otros microorganismos no identificados que comparten antígenos con *Map*.

1.9.1.2 Inmuno ensayo enzimático (ELISA).

Esta técnica utiliza anti-anticuerpos específicos unidos (conjugados) con una enzima y de esta manera detecta y cuantifica anticuerpos unidos a un antígeno el cual está adsorbido a una fase sólida. La enzima conjugada sirve como indicador al convertir un substrato incoloro hacia una un producto coloreado que puede ser

medido ópticamente (O'Reilly, 1993). La prueba de ELISA ofrece varias ventajas para el diagnóstico de la paratuberculosis, entre ellas detecta pequeñas cantidades de anticuerpo (O'Reilly, 1993; Tsai, *et al*, 1989), además de que es más sensible y específica que la FC y la IDGA (Colgrove, *et al*, 1989; Tsai, *et al*, 1989; Yokomizo, *et al*, 1983). También permite detectar animales en etapas más tempranas de infección (Merkal, 1984), por lo que facilita eliminar animales que no muestran signos clínicos de la enfermedad, pero que pueden estar eliminando a la bacteria por heces (Yokomizo, *et al*, 1983).

Al igual que otras pruebas serológicas, se tiene el problema de los falsos positivos debido a reacciones cruzadas con otras bacterias, lo cual se ha podido disminuir en gran medida al adsorber previamente los sueros problema con *M. phlei* (Beech-Nielsen, *et al*, 1992; Braun, *et al*, 1990; Molina, *et al*, 1991; Tsai, *et al*, 1989). Las reacciones no específicas son causadas por la Ig M, por lo que es más conveniente el utilizar un antígeno protoplásmico fraccionado y de esta forma medir solo los niveles de Ig G1, que es más específica (Abbas, *et al*, 1983; Yokomizo, *et al*, 1983). En cabras, este método al ser utilizado con un antígeno protoplásmico (PPA-3) y preadsorbiendo los sueros con *M. phlei*, resultó ser muy confiable, con una sensibilidad y especificidad del 88.2% y 95.2%, respectivamente (Molina, *et al*, 1991). En otro estudio, también en ganado caprino, se realizó la adaptación de un *kit* comercial, originalmente diseñado para el diagnóstico de paratuberculosis en bovinos, los resultados mostraron una sensibilidad del 77.9% y una especificidad del 93.1% (Reviriego, 1996).

Existe una modificación a esta prueba, conocida como ELISA-Dot. Esta se ha utilizado en bovinos y tiene las ventajas de ser más barata y más sencilla. En el ELISA-Dot se utiliza una membrana de nitrocelulosa que posee una estructura porosa, lo que permite una mayor unión y una mejor estabilidad para el antígeno, en comparación con la superficie sólida de los pozos de poliestireno que se utilizan en la prueba de ELISA (Tsai, *et al*, 1989). En estudios realizados con

bovinos con signos clínicos de paratuberculosis, en donde se comparó esta prueba con otras más, la ELISA-Dot mostró una sensibilidad del 85% y una especificidad del 100%, con una tasa estimada de falsos positivos del 2.1%, mientras que la ELISA y la IDGA obtuvieron un 80% y 50.5% de sensibilidad, respectivamente (Woodrof, *et al*, 1991).

1.9.1.3 Inmuno Difusión en Gel Agar (IDGA).

Esta prueba diagnóstica se ha utilizado principalmente en animales con signos clínicos debido a que su sensibilidad es baja en infecciones subclínicas (Goudswaard, 1976; Sherman, 1990). Por este motivo, se recomienda en programas de control de paratuberculosis en explotaciones con aislamiento previo de la bacteria o para detectar animales que estén eliminando grandes cantidades del bacilo (De Lucas, 1984; Merkal, *et al*, 1968; Merkal, 1984; Sherman, *et al*, 1989; Shulaw, *et al*, 1993). Sin embargo, en infecciones experimentales esta prueba ha detectado anticuerpos séricos a partir de los 60 dpi (Chávez, 1993). Se considera que tiene una mayor sensibilidad en animales con lesiones severas al estudio *post mortem* (Shulaw, *et al*, 1993). Asimismo, se prefiere sobre la FC, ya que detecta anticuerpos en etapas más tempranas de enfermedad (Goudswaard, *et al*, 1972; Merkal, 1984). Esta prueba ofrece varias ventajas, entre ellas, el equipo sencillo, la rapidez de los resultados y el bajo costo para su elaboración. Sin embargo, al igual que otras pruebas serológicas, se tiene la desventaja de las reacciones cruzadas (Sherman, *et al*, 1980) con otras micobacterias o con bacterias del género de los Actinomicetos que contienen ácidos micólicos en su pared, tales como *Nocardia spp* y *Corynebacterium spp*, sobre todo si se utilizan antígenos no purificados (Sherman, *et al*, 1980; Shome, *et al*, 1996).

LA IDGA, en ovejas ha probado tener una sensibilidad del 88.2% (Sherman, 1990), mientras que en caprinos, esta prueba y el cultivo de heces han presentado la misma sensibilidad y especificidad, del 77.5% y 80%, respectivamente (Sherman, *et*

al, 1990). En los caprinos, al igual que en el caso del ganado bovino, esta técnica, aunada al cultivo de heces, ha probado ser muy efectiva para el control de la enfermedad con una sensibilidad y especificidad similares, del 77.5% y 80%, (Sherman, *et al*, 1980). Incluso, puede detectar caprinos con y sin manifestaciones clínicas de la enfermedad (Vélez, 1998).

1.9.1.4 Contrainmuno Electroforesis (CIE).

Esta es una prueba que se utiliza de manera rutinaria para la detección de anticuerpos contra hongos y actinomicetos patógenos, tanto en medicina humana como veterinaria (Mackenzie, *et al*, 1975; Dee, 1975), así como para el diagnóstico de la tuberculosis en humanos (Quesada, 1983). Son escasos los informes del uso de la CIE para el diagnóstico de la paratuberculosis. Los resultados de estos estudios sugieren que es menor el número de reacciones cruzadas, en comparación con la IDGA (Oviedo, 1991; Shome, *et al*, 1996). En el caso de paratuberculosis caprina, al parecer es más sensible que algunas pruebas encaminadas a determinar el grado de inmunidad celular, como la intradermorreacción (IDR), además de que tiene la ventaja de ser sencilla y de que se pueden obtener resultados de animales con niveles elevados de anticuerpos en aproximadamente 30 minutos, en comparación con 18 horas, que es el tiempo mínimo de incubación en una prueba de IDGA (Collins, *et al*, 1984).

1.9.2 Evaluación de la respuesta inmune celular.

1.9.2.1 Intradermorreacción (IDR).

Esta prueba tiene como fin provocar una reacción de hipersensibilidad de tipo IV (retardada) en los animales infectados con paratuberculosis por medio de la inoculación intradérmica, de preferencia en las tablas del cuello, de diversos derivados proteicos purificados (PPD) obtenidos de micobacterias, tales como la johnina, o PPD-Aviar (Juste, 1984; Larsen, *et al*, 1950; Merkal, *et al*, 1968; Suther, *et*

al, 1974) e incluso PPD-Bovino (Thorel, *et al*, 1992). Posterior a la inoculación de dichos productos micobacterianos, aparece un área de induración en el sitio de inoculación, que alcanza su pico máximo entre las 48 y 72 horas y que histologicamente se compone de linfocitos y macrófagos (Roitt, *et al*, 1991). En ovejas, con infección experimental, se ha observado que estas reacciones alérgicas se manifiestan entre 8 y 16 semanas posteriores a la inoculación del bacilo y persisten por 6 a 8 meses. En estos animales, al inocular johnina y PPD-A por vía intradérmica, se ha visto que algunos animales son positivos a ambos productos micobacterianos, aunque la reacción hacia el PPD-A generalmente es más fuerte (Karpinsky, *et al*, 1975). En programas de control con vacunación, esta reacción de hipersensibilidad cutánea puede ser el resultado de la vacunación misma, de la vacunación e infección natural por *Map* o una respuesta hacia micobacterias atípicas que comparten antígenos similares. También se ha observado, que animales con lesiones severas de paratuberculosis pueden ser negativos a una prueba de IDR (Wentink, *et al*, 1993). En cabras, el uso de esta prueba ha tenido resultados variados, ya que en algunos casos se considera como poco eficiente (Elksen, *et al*, 1965), mientras que en otros estudios se menciona que la prueba de IDR es confiable, sobre todo si se aplica en animales entre 1 ó 2 años de edad (Collins, *et al*, 1984). Por otro lado, algunos investigadores están en contra del uso de esta prueba, ya que al igual que las pruebas serológicas, pueden haber reacciones cruzadas con otras micobacterias, además de que se dificulta la detección de otras enfermedades micobacterianas, como la tuberculosis (Stabel, 1996).

1.9.2.2 Interferón gamma (IFN-γ).

Hasta la fecha, es la prueba más efectiva para detectar la inmunidad celular en animales paratuberculosos, especialmente en infecciones subclínicas, cuando predomina una respuesta inmune celular. Se basa en cuantificar el IFN-γ

producido por linfocitos que han sido previamente estimulados por antígenos micobacterianos. Para esto, se recolecta sangre completa de los animales sospechosos y se le estimula con derivados protéicos purificados aviar y bovino (PPD-A y PPD-B, respectivamente), para posteriormente obtener el suero. Los niveles de IFN-γ se detectan usando anticuerpos contra éste por medio de una prueba de ELISA. Se considera que un animal está infectado con *Map* si la respuesta hacia PPD-A es más elevada que la obtenida para PPD-B. (Stabel, 1996).

1.9.2.3 Estimulación de la proliferación linfocitaria.

Consiste en incubar sangre completa o linfocitos con un PPD, preferentemente de *Map* y posteriormente determinar el grado de estimulación linfocitaria, que se expresa como un índice de estimulación. Para este fin, se mide la cantidad de timidina o yododeoxiuridina que se incorporan durante la síntesis de ácido ribonucleico de los linfocitos. Se considera que esta prueba puede servir para determinar si existe la enfermedad en una explotación, pero no para indicar el estado de infección de un solo animal (Hintz, 1981). Al igual que la IDR, esta prueba no es muy sensible y carece de especificidad hacia el tipo de micobacteria, además de que es laboriosa y requiere de largos tiempos de incubación (Stabel, 1996).

1.9.3 Diagnóstico bacteriológico.

El aislamiento de *M. avium* subsp *paratuberculosis* a partir de heces fecales, mucosa intestinal y linfonodos mesentéricos, es considerado hasta la fecha por muchos investigadores, como el método diagnóstico más confiable de la paratuberculosis en las diversas especies animales afectadas. Se considera de especial utilidad para detectar ganado infectado antes de que aparezcan los signos clínicos (Kim, *et al*, 1989) y en aquellas explotaciones donde se efectúan programas de control de la enfermedad, ya que es posible identificar incluso animales que estén eliminando

pocas bacterias (50-100 bact/gr de heces) (Juste, 1984), siendo 100% específico y casi 100% sensible en explotaciones con tasas de infección del 20% o más (Merkal, 1984), debiéndose realizar un mínimo de 2 veces al año en todos los animales adultos (Whipple, *et al*, 1985) debido a que la bacteria se elimina en forma intermitente (Sherman, *et al*, 1980).

Para este propósito se utilizan diferentes medios de cultivo, por lo que en el ganado bovino, se recomienda el medio de Herrold adicionado con yema de huevo (HEEY) con piruvato de sodio. En rumiantes pequeños, tales como ovinos y caprinos, se obtienen mejores resultados con el medio de Löwenstein-Jensen sin piruvato de sodio (Juste, *et al*, 1991).

En ambos casos es indispensable la adición de micobactina, que funciona como agente quelante del hierro (Merkal, 1984; Thorel, 1984). Este metal es necesario para el metabolismo de esta bacteria y se encuentra presente en gran cantidad en la yema de huevo que se utiliza en la preparación de estos dos medios de cultivo (Ramírez, *et al*, 1979).

El aislamiento bacteriológico tiene varias desventajas, entre ellas lo laborioso de la técnica, el largo período de incubación, que varía de 6 a 16 semanas (Whipple, *et al*, 1985; Colgrove, *et al*, 1989; Kim, *et al*, 1989) y la presencia de gran número de bacterias saprófitas y hongos en las heces que contaminan los medios de cultivo (Fales, *et al*, 1985; Kim, *et al*, 1989).

Con el fin de disminuir la carga de microorganismos contaminantes en las heces, es necesario utilizar técnicas que disminuyan al máximo su presencia sin dañar al *Map* (Juste, 1984). Esto se obtiene al procesar las muestras con descontaminantes, tales como el cloruro de hexa-decyl pyridinium (HPC) al 0.7% (Merkal, 1984; Fales, *et al*, 1985; Vihan, *et al*, 1989; Juste, *et al*, 1991) o el cloruro de benzalconio (Zepiran) al 0.1% (Richards, 1981; Ratnamohan, *et al*, 1986b), además de adicionar varios antibióticos a los medios de cultivo. Entre los antibióticos más utilizados se

mencionan la anfotericina B (Fales, *et al*, 1985; Vihan, *et al*, 1989), la penicilina, la ampicilina (Whipple, *et al*, 1985; Rarnamohan, *et al*, 1986b), el cloramfenicol (Whipple, *et al*, 1985; Juste, *et al*, 1991), la ciclohexamida (Whipple, *et al*, 1985) y el miconazol (Kim, *et al*, 1989).

Otro de los factores que interfieren en el aislamiento bacteriano es el congelamiento de las muestras. Este se utiliza en aquellos casos en donde debido al gran número de especímenes no se pueden procesar de una sola vez, haciendo necesario su almacenamiento a una temperatura de -70°C para evitar una posible contaminación (Richards, *et al*, 1977). Sin embargo, el congelamiento disminuye la viabilidad bacteriana, por lo que un animal que esté eliminando pocas bacterias puede tener un aislamiento negativo, mientras que otro animal que esté eliminando gran número de ellas, mantiene su estado de positivo al cultivo bacteriológico, aunque con menor número de colonias (Richards, 1981).

La identificación del *M. avium* subsp *paratuberculosis* se basa en el tiempo de crecimiento, la morfología de la colonia bacteriana, la dependencia de micobactina y la presencia de bacilos ácido alcohol resistentes con la tinción de Ziehl-Neelsen (Fales, *et al*, 1985; Whipple, *et al*, 1985; Vihan, *et al*, 1989; Colgrove, *et al*, 1989).

1.10 La paratuberculosis y las técnicas de biología molecular.

Las diversas técnicas de biología molecular han probado ser útiles para el estudio de diversas enfermedades micobacterianas, tales como la tuberculosis y la lepra (Clarke, 1997). En cuanto a la paratuberculosis, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction-PCR) ha sido la más utilizada tanto para establecer la taxonomía de *Map* (Clarke, 1997; Stevenson, *et al*, 1997), como en el diagnóstico de la enfermedad (Ambrosio, *et al*, 1991; Vary, *et al*, 1990). La PCR consiste en sintetizar millones de copias de una secuencia de nucleótidos de una bacteria y de esta manera amplificar su DNA en pocas horas. En el caso de *Map*, se amplifica la secuencia IS900, la cual se repite de 15 a 20 veces en su genoma

(Stevenson, *et al*, 1997). Existen diversos estudios en los cuales se ha utilizado la PCR para detectar el ADN de esta micobacteria a partir de heces de ganado bovino. Los resultados de estos trabajos prueban que esta técnica es igual o incluso más sensible que el cultivo bacteriano, además de que es mucho más rápida y que se requiere de cantidades mínimas de ADN (Ambrosio, *et al*, 1991; Vary, *et al*, 1990). Por otro lado, al utilizar la PCR a partir de secciones de tejido incluidas en parafina, probó tener una sensibilidad del 90%, en comparación con una sensibilidad del 100% y 86% que se obtuvieron con las tinciones de inmunohistoquímica y Ziehl-Neelsen, respectivamente (Plante, *et al*, 1996).

1.11 Control.

Los programas de control de paratuberculosis son laboriosos. Para lograr el éxito, es necesario catalogar a la paratuberculosis como un problema de hato y no como una enfermedad que afecta a los animales de manera aislada (Collins, 1994). Se considera que es difícil el obtener y mantener un hato como libre de paratuberculosis (Chiodini, *et al*, 1984), por lo que más que la eliminación, se recomienda disminuir la tasa de infección a menos del 3%, ya que a este nivel los efectos económicos que se derivan de su presencia serán mínimos (Wren, 1993).

De acuerdo con Chiodini, *et al*, (1984), en aquellos casos en los que se desee la erradicación de la enfermedad, se deberán mandar al rastro a todos los animales, además que se deberán limpiar y desinfectar todas las instalaciones. La materia fecal tendrá que ser retirada de los establos e incluso de las áreas de pastoreo. Así mismo, será necesario exponer todas las áreas de pastoreo al sol. Una vez que se hayan realizado los pasos antes mencionados, se podrán introducir nuevos animales, aunque no se les permitirá el paso hacia las áreas de pastoreo que hayan sido expuestas a la bacteria por un período de 6 a 12 meses.

En hatos grandes, es mejor establecer un programa de control (Chiodini, *et al*, 1984). Para disminuir la prevalencia de esta enfermedad, la clave consiste en la

detección rápida y confiable de los animales infectados (Spangler, *et al*, 1991). A pesar de esto, existen múltiples factores que en un momento dado dificultan el control de esta enfermedad. Entre ellos se cuentan como los más importantes a la capacidad económica del ganadero (Collins, 1994), el largo período de incubación de la enfermedad (Chiodini, *et al*, 1984), la presencia de portadores asintomáticos que podrían estar diseminando al microorganismo (Sherman, *et al*, 1980), la capacidad de *Map* para sobrevivir por largos períodos en el medio ambiente (Beeman, *et al*, 1989; Chiodini, *et al*, 1984) y la falta de pruebas serológicas confiables para detectar animales infectados (Thoen, *et al*, 1988). Para obtener buenos resultados, el programa de control deberá establecerse por un período de al menos 5 años (Collins, 1994).

Dentro de las medidas generales de manejo a considerar dentro de un programa de control de paratuberculosis se incluyen:

1. Medir la tasa de infección en el hato o rebaño. Esto se realiza identificando a los animales con signos clínicos y asumir que por cada caso clínico, se tienen 5 a 10 animales con infección subclínica. Se sugiere el uso de pruebas serológicas tales como ELISA o IDGA en todos los animales mayores a 2 años. Para fines prácticos, se considera que estas pruebas tienen una sensibilidad del 50% en infecciones subclínicas, por lo que si se detecta con estas pruebas un 5% de positivos en el hato (prevalencia aparente), se deberá asumir que el doble de los animales, es decir, el 10% están infectados (prevalencia real) (Collins, 1994). Además de la relativa baja sensibilidad de estas pruebas, su uso se limita cuando se incluye la vacunación como medida de control ya que se podría estar detectando anticuerpos postvacunales (Spangler, *et al*, 1991).
2. Tomar muestras de heces de todos los animales mayores a 2 años cada 6 meses para aislamiento de la bacteria. El ganado positivo tendrá que ser eliminado inmediatamente (Chiodini, *et al*, 1984; Thoen, *et al*, 1988). El aislamiento bacteriano permite la identificación de animales infectados aún en hatos

vacunados, sin embargo, los resultados se obtienen de 5 a 20 semanas (Thoen, *et al*, 1988).

3. Mandar al rastro a todos los animales adultos que presenten signos clínicos de paratuberculosis, junto con sus crías (Chiodini, *et al*, 1984).
4. Obtención de animales de reemplazo a partir de explotaciones libres de paratuberculosis (Thoen, *et al*, 1988; Wren, 1993).
5. No usar animales positivos con fines reproductivos (Wren, 1993).
6. Utilizar compuestos fenólicos para la desinfección periódica de instalaciones (Chiodini, *et al*, 1984; Thoen, *et al*, 1988).
7. Desinfectar las heces con cal hidratada al 20% (pH 11.0) para disminuir la viabilidad del bacilo (Chiodini, *et al*, 1984).

Una segunda parte del programa de control debe incluir el manejo de las crías con el propósito de evitar que se infecten, por lo que se les debe retirar de sus madres inmediatamente después del nacimiento, antes de que mamen y alimentarlas con calostro pasteurizado de animales sanos. Estos tendrán que permanecer en áreas no contaminadas y separados de animales adultos (Chiodini, *et al*, 1984; Collins, 1994; Thoen, *et al*, 1988). Los animales jóvenes podrán convivir con los adultos hasta que alcancen la edad reproductiva (Chiodini, *et al*, 1984).

Todos los pasos antes descritos están encaminados a disminuir el número de microorganismos en el medio ambiente y proteger a los animales durante la edad más susceptible. Estas medidas de control junto con un buen programa de inmunización pueden controlar satisfactoriamente a la enfermedad (Chiodini, *et al*, 1984; Saxegaard, *et al*, 1985).

1.12 Inmunización.

Como suele suceder con otros procesos infecciosos, la inmunización es una de las prácticas recomendadas para el control de la paratuberculosis en bovinos, ovinos y caprinos (Chávez, 1996; Molina, *et al*, 1996).

La primera vacuna contra la paratuberculosis se originó en Francia por Vallé y Rinjard, quienes en 1926 vacunaron vía subcutánea a ganado bovino con una cepa viva no virulenta de *Map* suspendida en una mezcla de aceite de oliva y parafina líquida con trazas de piedra pómez en polvo ((Saxegaard, *et al*, 1985; Spears, 1959). El principio de este método de vacunación fue el establecer un estado de hipersensibilidad que protegiera al animal durante el tiempo que permaneciera la bacteria en el nódulo formado en el sitio de inoculación (Saxegaard, *et al*, 1985). Actualmente se sabe que la aplicación de inmunógenos derivados de micobacterias genera estado de hipersensibilidad (Chiodini, *et al*, 1984) en el que se incrementa la capacidad de los macrófagos para inhibir la multiplicación intracelular de las bacterias (Larsen, 1973). Se obtienen mejores resultados al utilizar inmunógenos desarrollados a partir de bacterias completas, ya sean vivas atenuadas o muertas (Chávez, 1996), mientras que aquellos inmunógenos que solo contienen fracciones protoplasmáticas causan una hipersensibilidad leve o nula y por lo tanto no confieren protección (Chiodini, *et al*, 1984).

Larsen (1973) menciona que en el ganado bovino, se han utilizado 5 métodos para evaluar los inmunógenos contra la paratuberculosis. Estos son:

1. Uso de animales de laboratorio. Si el inmunógeno es eficaz en estos animales, entonces será necesario el hacer más pruebas en el hospedador natural.
2. Inmunización de bovinos en el laboratorio y posteriormente infectar a éstos y a otros que sirvan como controles. Con esto se podrá comparar el grado de infección en ambos grupos por medio de pruebas inmunológicas, conteo de colonias bacterianas y evaluando los cambios patológicos a un tiempo determinado posterior a la infección experimental.
3. Inmunización e infección de bovinos en el laboratorio. El inmunógeno es evaluado por medio de la presentación de los signos clínicos de la enfermedad entre inmunizados y controles. Este método es demasiado caro, por lo que queda fuera del alcance de la mayoría de los laboratorios.

4. Estudios de campo con bovinos infectados. Este método es similar al anterior, solo que trata de reproducir condiciones naturales.
5. Estudios de campo en el cual tanto los inmunizados como los controles son seleccionados al azar dentro de un hato infectado. En este caso, la eficacia del inmunógeno se evalúa a través de la presentación de signos clínicos en animales inmunizados y controles.

La mayoría de las investigaciones encaminadas al desarrollo de inmunógenos contra la tuberculosis se han realizado en bovinos y ovinos. Son pocos los informes en los que se menciona el uso de inmunógenos en caprinos (Molina, 1996; Saxegaard, *et al*, 1985).

En el caso de los bovinos, es amplia la bibliografía al respecto. En estos animales, la inmunización contra paratuberculosis se ha utilizado preferentemente en hatos lecheros con diferentes tasas de infección. A pesar de que su uso aumenta la resistencia a una infección por *Map*, en algunos casos la aplicación de una vacuna puede ser insuficiente para impedir que aparezca la forma clínica de la enfermedad. La vacunación en explotaciones con altos índices de infección es útil para controlar la enfermedad en un tiempo razonablemente breve. Es necesario implementar medidas higiénicas con objeto de disminuir la infección de animales jóvenes (Huitema, 1967). Un claro ejemplo al respecto es el programa de control de paratuberculosis realizado en el Reino Unido. En este caso, se evaluó la incidencia de la enfermedad durante 10 años en 231 hatos lecheros en los que se vacunaron a todos los becerros al mes de edad durante 4 años. Los resultados indican que fue posible erradicar la enfermedad en 4 años promedio y solo se observaron casos clínicos en el 9.7% de estos hatos a 10 años del comienzo del programa de vacunación. La erradicación de la enfermedad se complementó con prácticas de manejo aduecuadas, tales como desecho de los animales con signos clínicos y limpieza de las instalaciones (Wilesmith, 1981).

En los ovinos se ha promovido ampliamente la inmunización contra la paratuberculosis, especialmente en países ovinocultores, tales como Nueva Zelanda (Hilbink, 1990) y España (Juste, *et al*, 1994). Los programas aplicados son muy similares a los realizados en bovinos. Aunque se han obtenido mejores resultados al vacunar a los animales entre las 2 y 6 semanas de edad (Larsen, *et al*, 1964), también ha sido posible obtener resultados favorables al vacunar animales adultos ya infectados (Juste, *et al*, 1994).

En lo que se refiere a los caprinos, hasta la fecha son escasos los informes en los que se evalúa el uso de inmunógenos contra la paratuberculosis (Molina, *et al*, 1996).

Saxegaard, *et al*, (1985), mencionan que anteriormente la erradicación de la paratuberculosis en Noruega se basaba principalmente en métodos convencionales, que incluían medidas higiénicas, aislamiento y sacrificio de animales con signos clínicos y serológicamente positivos. Este programa no tuvo resultados satisfactorios, por lo que se inició la inmunización de caprinos en 1967. Para este propósito se utilizaron vacunas vivas con cepas 2E y 316F de *Map*. Este esquema de vacunación se basó en la aplicación de una sola dosis del producto en animales de 2 a 4 semanas de edad, evitando vacunar adultos, ya que esto hubiera hecho imposible el diferenciar por métodos serológicos entre un título vacunal y una verdadera infección. En este trabajo se observó una disminución gradual en la tasa de infección que se inició posterior a la vacunación, además de un decremento en los casos clínicos de paratuberculosis y un aumento en la producción de leche de los animales. Los resultados también indican que es posible eliminar la enfermedad de un rebaño, ya que los animales vacunados que permanecen en un medio ambiente en donde prevalece la enfermedad, muestran un alto nivel de resistencia.

Por otro lado, en España, con el objeto de evaluar la respuesta inmune en cabras infectadas con paratuberculosis se realizó la vacunación en un rebaño caprino con

vacuna viva con cepa 316F de *Map*. En este caso, se concluyó que al parecer al vacunar con una cepa viva de esta micobacteria, se induce una respuesta celular específica sin afectar la capacidad linfoproliferativa de los LT. Esta respuesta celular aparece dentro de los 3 meses posteriores a la vacunación. Así mismo, probablemente exista un efecto protector contra la infección relacionado con la capacidad linfoproliferativa del hospedador que pudiera estar condicionada por el número de microorganismos inoculados (Molina, *et al*, 1996).

Todos los inmunógenos contra la paratuberculosis presentan dos características desfavorables. Una es el desarrollo de un nódulo fibrocaseoso en el sitio de inoculación, el cual puede medir entre 2 a 5 cm y que puede permanecer por mucho tiempo e incluso ulcerarse (Larsen, 1973). La otra es la sensibilización contra la johnina y tuberculinas aviar y bovina (Larsen, 1973; Saxegaard, *et al*, 1985), por lo que resulta inconveniente el inmunizar animales en sitios con programas de control o erradicación de tuberculosis (Chávez, 1996).

Cabe resaltar que la mayoría de los estudios encaminados a evaluar el uso de inmunógenos para el control de la paratuberculosis tanto en bovinos como ovinos y caprinos, han tenido una duración de 5 a 6 años. Esto es porque gran parte de los investigadores consideran que los programas de control a largo plazo ofrecen buenos resultados. Sin embargo, Niesbet *et al*, (1962) sugieren que para evaluar la eficacia de un plan de inmunización contra esta enfermedad, sería conveniente el establecer un programa de inmunización a corto plazo en el que se incluyan estudios de bacteriología e histopatología.

JUSTIFICACIÓN

Como se mencionó con anterioridad, la paratuberculosis es una enfermedad infecciosa altamente contagiosa, presente en nuestro país. Para lograr el control y erradicación de esta enfermedad es necesario implementar diferentes prácticas de manejo. Una de estas medidas a considerar es la inmunización. Hasta la fecha, la mayoría de las investigaciones dirigidas a evaluar la respuesta inmune de los animales inmunizados contra *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* se han llevado a cabo en bovinos y ovinos, por lo que se tiene la necesidad de realizar más estudios de este tipo en caprinos. Así mismo, estos trabajos se han realizado en períodos de 5 o más años, por lo que actualmente existen pocos informes que mencionen la variación a corto plazo en la respuesta inmune tanto humoral como celular en animales inmunizados contra esta enfermedad.

OBJETIVOS

Comparar durante un año la variación en las respuestas inmunes humoral y celular entre animales inmunizados y no inmunizados que se presentan posteriores a la aplicación de una bacterina de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* en un rebaño caprino del Valle de México con alta incidencia de paratuberculosis.

Evaluar las diferencias anatomopatológicas posteriores a la inmunización entre animales inmunizados y aquellos no inmunizados.

HIPÓTESIS

El inmunizar un rebaño de cabras con antecedentes de paratuberculosis, contra *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* estimula la respuesta inmune, por lo que en un período de un año, en aquellos animales así inmunizados disminuirá la presentación de casos clínicos de la enfermedad y la severidad de las lesiones, en comparación con los no inmunizados.

OBJETIVOS

Comparar durante un año la variación en las respuestas inmunes humoral y celular entre animales inmunizados y no inmunizados que se presentan posteriores a la aplicación de una bacterina de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* en un rebaño caprino del Valle de México con alta incidencia de paratuberculosis.

Evaluar las diferencias anatomopatológicas posteriores a la inmunización entre animales inmunizados y aquellos no inmunizados.

HIPÓTESIS

El inmunizar un rebaño de cabras con antecedentes de paratuberculosis, contra *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* estimula la respuesta inmune, por lo que en un período de un año, en aquellos animales así inmunizados disminuirá la presentación de casos clínicos de la enfermedad y la severidad de las lesiones, en comparación con los no inmunizados.

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Animales.

Se utilizó el rebaño caprino del rebaño caprino del Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (C.E.P.I.P.S.A.), ubicado en Topilejo, D. F., el cual pertenece a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. Este rancho, al inicio del experimento, constaba de 120 animales adultos (113 hembras y 7 sementales) y contaba con antecedentes clínicos, serológicos, bacteriológicos y anatomopatológicos de Paratuberculosis (Vélez, 1998). Los animales de este rancho, al inicio del experimento, tenían entre 1.5 y 5 años.

Los animales fueron divididos aleatoriamente en 2 grupos, de manera tal que 88 (73.4%) fueron inmunizados (grupo A) y 32 animales (26.6%) quedaron como grupo testigo (grupo B). Los animales se mantuvieron juntos, con el fin de evaluar la bacterina ante un desafío natural y para no establecer prácticas que implicaran un doble manejo del rebaño.

2.2 Inmunógeno.

Se utilizó una bacterina comercial que contiene la cepa 316F de *M. avium* subsp *paratuberculosis*[1]. Este producto está autorizado para su uso en ganado ovino y caprino en España. Cada animal recibió una sola dosis de 1 ml del producto, aplicado vía subcutánea en la región del encuentro. Los caprinos del grupo testigo fueron inoculados por la misma vía con 1 ml de excipiente oleoso.

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Animales.

Se utilizó el rebaño caprino del rebaño caprino del Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (C.E.P.I.P.S.A.), ubicado en Topilejo, D. F., el cual pertenece a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. Este rancho, al inicio del experimento, constaba de 120 animales adultos (113 hembras y 7 sementales) y contaba con antecedentes clínicos, serológicos, bacteriológicos y anatomopatológicos de Paratuberculosis (Vélez, 1998). Los animales de este rancho, al inicio del experimento, tenían entre 1.5 y 5 años.

Los animales fueron divididos aleatoriamente en 2 grupos, de manera tal que 88 (73.4%) fueron inmunizados (grupo A) y 32 animales (26.6%) quedaron como grupo testigo (grupo B). Los animales se mantuvieron juntos, con el fin de evaluar la bacterina ante un desafío natural y para no establecer prácticas que implicaran un doble manejo del rebaño.

2.2 Inmunógeno.

Se utilizó una bacterina comercial que contiene la cepa 316F de *M. avium* subsp *paratuberculosis*[1]. Este producto está autorizado para su uso en ganado ovino y caprino en España. Cada animal recibió una sola dosis de 1 ml del producto, aplicado vía subcutánea en la región del encuentro. Los caprinos del grupo testigo fueron inoculados por la misma vía con 1 ml de excipiente oleoso.

2.3 Evaluación de la respuesta inmune humoral.

2.3.1 Obtención y procesamiento de las muestras.

El primer muestreo se realizó justo antes de la aplicación del inmunógeno. Los demás muestreos tuvieron lugar a los 15, 30, 60, 150, 240 y 330 días posteriores a la inmunización. De esta manera, se obtuvieron muestras de 7 períodos diferentes a lo largo de la fase experimental.

A todos los animales se les extrajeron de 10 ml de sangre de la vena yugular colectándola en tubos de cristal[1] de 10 ml sin anticoagulante. Para la obtención del suero las muestras fueron centrifugadas a 2000 rpm/15 min. Los sueros así obtenidos, fueron colectados en viales[2] de 1.5 ml y almacenados a -20°C hasta la realización de las pruebas de Inmuno Difusión en Gel Agar (IDGA), Inmuno Ensayo Enzimático (ELISA) y Contra Inmuno Electroforesis (CIE), utilizando para los dos primeros casos las técnicas descritas por Chávez (1993) y en el último una adaptación a las técnicas empleadas por Cervantes (1983), Mackenzie, *et al*, (1975), Oviedo (1991) y Quesada (1983).

2.3.2 Inmuno Difusión en Gel de Agar (IDGA).

Esta prueba se elaboró empleando cajas de Petri con gel de agarosa[3] disuelto al 1% en solución salina amortiguada (PBS). El gel fue perforado mediante un sacabocados que forma rosetas de 6 pocillos periféricos y uno central de 5 mm de diámetro cada uno. En el pocillo central se depositaron 30µl de antígeno protoplasmático de *M. avium* subsp *paratuberculosis* PPA-3[4] con una concentración de 4 mg/ml de agua destilada. En los pocillos superior e inferior fueron agregados los sueros controles positivos, provenientes de caprinos procedentes del mismo

---

[1] Gudair. CZ Veterinaria, S. L., España.
[1] *Vacutainer.*
[2] *Eppendorf.*
[3] *Merck*
[4] *Allied, Mo.*

rebaño, mientras que en los 4 pocillos restantes se depositaron los sueros problema.

Las placas se mantuvieron en cámara húmeda y a temperatura ambiente, realizando la lectura a las 24 y 48 horas. Los sueros se consideraron como positivos si se producía una banda de identidad total entre el antígeno y el suero problema, la cual debía continuar con la del control positivo.

2.3.3 Inmuno Ensayo Enzimático (ELISA).

Primero se adsorbió el antígeno a las placas, depositando en cada pocillo 100 µl del antígeno PPA-3 a una concentración de 4 mg/ ml de agua destilada y posteriormente se diluyeron 0.04 mg de este antígeno por ml de tampón carbonato. Las placas se mantuvieron a 4°C durante toda la noche y después se lavaron 3 veces de forma automática con solución salina conservándose a -20°C hasta la realización de la prueba. Los sueros problema fueron adsorbidos en viales de 0.5 ml con una suspensión de *M. phlei* [2] en proporción de 1:1, es decir, 5 µl de suero problema/ 5 µl de *M. phlei* dejándolos reposar por 24 horas a 4°C. Los sueros controles positivo y negativo fueron adsorbidos de la misma manera. Posteriormente, se depositaron de manera doble 100 µl de cada uno de los sueros ya adsorbidos en cada uno de los pocillos de las placas fijadas con una dilución de 1:100 de PBS-TG para de esta manera, correr pruebas pareadas de cada uno de los sueros. Las placas se incubaron a temperatura ambiente en cámara húmeda por 2 horas, para después ser lavadas 3 veces de manera automática. Acto seguido, se añadieron a cada uno de los pocillos 100 µl de suero anti Ig-G de caprino marcado con peroxidasa de rábano a una dilución de 1:4500 y se volvieron a incubar por 2 horas en cámara húmeda a temperatura ambiente para de nuevo ser lavadas 3 veces de manera automática. Después, se añadieron 100 µl del sustrato ABTS (2,2'-

[2] *Allied, Mo.*

Azinobis (3-ethil-benzthiazoline-sulfonic-acid)[3] y se incubaron por 20 minutos en agitación constante y en obscuridad. La reacción fue bloqueada adicionando 100 µl de solución paro (ácido fluorhídrico al 45%) en cada pocillo. Finalmente, los resultados se obtuvieron con ayuda de un espectofotómetro de 8 canales empleando un filtro de 450 nm.

Los resultados fueron valorados mediante la obtención de un cociente, al dividir el valor medio de la densidad óptica de cada suero entre el valor medio del control positivo de la placa. Se consideraron como positivos aquellos sueros con un cociente ≥ 0.800.

Los reactivos empleados para la elaboración de esta técnica, se describen en el anexo 1.

2.3.4 Contra Inmuno Electroforesis (CIE).

Para esta prueba se utilizó una placa de acrílico de 22.5 x 11.8 cm con un espacio de 20.5 x 7.7 cm en donde se colocaron 8 laminillas de cristal de 7.7 x 2.7 cm cada una. Sobre la placa se colocaron 55 ml de agarosa purificada al 1% disuelta por calentamiento en una mezcla de tampón de Veronal y agua destilada (1:1) y se vaciaron 55 ml de ésta sobre la placa, dejándola solidificar a temperatura ambiente ó a 4°C. Posteriormente, con un horadador se hicieron filas de pocillos de 3mm de diámetro y 5 mm de altura. A cada laminilla se le hicieron 18 pocillos, divididos en 6 filas verticales de 3 pocillos cada una. La distancia vertical entre cada pocillo fue de 5 mm. La distancia entre una hilera y otra fue de 10 mm. Las filas verticales de pocillos se enumeraron de izquierda a derecha. En las filas pares se colocaron 25 µl de suero y en las filas nones 25µl de antígeno comercial PPA-3 a una concentración de 1.5 mg/ml. En la última laminilla, se destinaron dos pocillos para los controles positivo y negativo. De esta manera, se corrieron 72 sueros por placa, incluyendo a los controles. Una vez ya lista la placa, se colocó en una cámara de electroforesis

[3] *Merk*

llena de tampón de Veronal. La placa se colocó de tal manera que del lado del cátodo quedaran los sueros y del lado del ánodo el antígeno. A los lados izquierdo y derecho de la placa, se colocó un pedazo de tela absorbente humedecido en este mismo buffer para favorecer el paso de la corriente eléctrica entre el buffer y la placa. La cámara se conectó a una fuente de poder[4] y se aplicó una corriente eléctrica de 200V/40 min. Posteriormente, la placa se retiró de la cámara de electroforesis para la lectura de los resultados, tomándose como positivos aquellos que presentaran una línea de precipitación (identidad) entre el suero y el antígeno. Para una mejor observación de estas líneas de precipitación, la placa se sumergió en PBS con pH de 7.2-7.4 y se colocó a 4°C por 10 minutos. Con ayuda de un bisturí se desmoldaron las laminillas, sujetando el gel ligas de hule. Las laminillas se volvieron a introducir en PBS por 48 horas a 4°C, realizando un cambio de buffer a las 24 horas. Después, se introdujeron en agua destilada por 24 horas. Ya lavadas las laminillas, se secaron en una estufa a 37°C/24 horas y se tiñeron con azul de Coomassie al 1% disuelto en una mezcla de metanol: ácido acético glacial: agua destilada (4:1:5). Las laminillas se introdujeron en el colorante por 10 minutos y se realizaron 5 enjuagues de 3 minutos cada uno en la misma mezcla que se utilizó para disolver el colorante.

Los reactivos empleados para la elaboración de esta técnica, se describen en el anexo 2.

[4] *Beckman*

RESULTADOS

3.1 Evaluación de la respuesta inmune humoral.

Los resultados obtenidos en las diferentes pruebas serológicas a lo largo de los 7 muestreos para el grupo A y el grupo B se presentan en los cuadros 2 y 3. Los resultados individuales se incluyen en los anexos 4 y 5, respectivamente.

3.1.1 Resultados por cada muestreo.

En el primer muestreo, se obtuvo el suero de 118 animales, 87 del grupo A y 31 del grupo B. Los resultados se citan en los cuadros 1 y 2. En este muestreo, por IDGA se obtuvieron 4 sueros positivos, que representaron una prevalencia del 3.38% en todo el rebaño. Los 3 caprinos positivos del grupo A representaron el 3.44% de éste y el caprino positivo del grupo B el 3.22.%. Trece sueros fueron positivos con la prueba de ELISA, lo que representó una prevalencia del 10.83% en todo el hato, con un 9 (10.34%) positivos en el grupo A y 4 (12.90%) en el B. Por otro lado, mediante la técnica de CIE, se obtuvieron 8 (6.77%) positivos en todo el hato, con 7 (8.04%) positivos en el grupo A y 1 (3.22%) en el grupo B. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos ni entre las técnicas utilizadas ($p>0.05$).

Para el segundo muestreo, realizado 15 días después de la aplicación de la bacterina, se tomaron muestras a 120 animales, 88 del grupo A y 32 pertenecientes al grupo B. En este muestreo, se apreció un aumento considerable en el número de animales del grupo experimental positivos con las 3 diferentes pruebas serológicas. Con IDGA, se tuvieron 39 animales del grupo A positivos (44.32%) y 3 (9.4%) positivos en el grupo B. Con ELISA, en el grupo A hubo 43 (48.86%) positivos y 8 (25%) positivos en el grupo B. Con CIE, el grupo A tuvo 44 positivos, que presentó el 50% de este grupo y el grupo B 3 (9.4%). Se obtuvieron diferencias

estadísticamente significativas entre grupos con las tres pruebas serológicas empleadas ($p<0.05$). No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre las pruebas empleadas ($p>0.05$).

Par el tercer muestreo, realizado un mes posterior a la inmunización, se obtuvo el suero de 118 animales, 87 de ellos pertenecientes al grupo A y 31 al grupo B. En el tercer muestreo, el número de animales inmunizados positivos a las pruebas serológicas alcanzó su pico máximo. Con la técnica de IDGA, se obtuvieron 44 sueros positivos (50.57%) en el grupo A y 3 (9.67%) en el B. Con ELISA, el grupo A, mostró 66 positivos (75.86%) y el grupo B 12 (38.7%). Mediante CIE, en el grupo A se obtuvieron 54 (62%) positivos y en el B 5 sueros positivos (16.13%). Con las tres pruebas serológicas empleadas se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo A y el B ($p<0.05$). No existieron diferencias estadísticamente significativas entre pruebas ($p>0.05$).

El cuarto muestreo se realizó a los 2 meses de aplicada la bacterina. En éste, se procesaron muestras de 120 animales, 88 del grupo A y 32 del grupo B. A los dos meses de aplicada la bacterina, se observó una disminución en el número de animales inmunizados positivos, por las tres pruebas, en comparación a los resultados obtenidos al mes de haber bacterinizado. Con IDGA, se observaron 38 sueros positivos (43.18%) en el grupo A y 3 (9.4%) en el B. Con ELISA, 42 (47.42%) de los sueros del grupo A y 5 (15.62%) del grupo B fueron positivos. Con CIE, 50 (56.82%) muestras del grupo A y 4 (12.50%) del grupo B fueron positivas. Los resultados de este muestreo indican que existieron diferencias estadísticamente significativas entre grupos con las pruebas de ELISA y CIE ($p<0.05$). Con la prueba de IDGA no se observaron diferencias ($p>0.05$). Por otro lado, existieron diferencias estadísticamente significativas entre las pruebas empleadas ($p<0.05$).

El quinto muestreo se llevó a cabo 5 meses después de haber bacterinizado. Se procesaron muestras de 116 animales, 84 de ellos pertenecientes al grupo A y 32 al B. A partir de este muestreo, se apreció una disminución considerable en el número de animales positivos en el grupo A, principalmente con IDGA y CIE. En este muestreo, con IDGA se obtuvieron 5 (5.95%) positivos en el grupo A y también 5 (15.62%) en el B. Con ELISA en el grupo A se observaron 36 (42.85%) positivos y 6 (18.75%) en el B. Con CIE, el grupo A obtuvo 10 positivos, que representaron el 11.9%, en comparación con 3 positivos en el grupo B, que significaron el 9.37%. Existieron diferencias estadísticamente significativas entre grupos solo con la prueba de ELISA ($p<0.05$). Las pruebas de IDGA y CIE no mostraron diferencias entre grupos ($p>0.05$). Hubo diferencias estadísticamente significativas entre pruebas ($p<0.05$).

El sexto muestreo se realizó a los 8 meses de haber aplicado la bacterina. Se obtuvieron muestras de 112 animales, 82 de ellos del grupo A y 30 el grupo B. En este muestreo, se apreció que el número de animales bacterinizados positivos seguía en disminución. Mediante IDGA, se obtuvo 7.31% de animales positivos en el grupo experimental y 13.33% en el testigo. Con ELISA, se obtuvo un 31.70% de positivos en el grupo de inmunizados y un 6.66% en el de no inmunizados. Con CIE, el primer grupo mostró 21.95% de positivos y 23.33% de positivos en el segundo grupo. Las pruebas de IDGA y CIE no mostraron diferencias entre grupos ($p>0.05$). Hubo diferencias estadísticamente significativas entre pruebas ($p<0.05$).

El séptimo muestreo se realizó a los 11 meses posteriores a la vacunación. Se procesaron muestras de 103 animales, 75 del grupo A y 28 del B. En este último muestreo, con IDGA se observaron 2 animales positivos (2.66%) en el grupo A y 5 (17.85%) en el B, mientras que con ELISA el primer grupo hubieron 18 (24%) positivos y 4 (14.28%) en el segundo grupo. Con CIE, los caprinos del grupo A

tuvieron 5 (6.66%) positivos y los del grupo B 5 (17.85%). Las pruebas estadísticas mostraron que exitieron diferencias significativas entre grupos solo con IDGA ($p<0.05$), mientras que con ELISA y CIE los grupos fueron homogéneos ($p>0.05$). Hubo diferencias significativas entre pruebas ($p<0.05$).

En la figura 1 se muestra la variación en la respuesta en las diferentes pruebas serológicas a lo largo de los 7 muestreos en el grupo A. Los resultados para el grupo B se muestran en la figura 2. En la figura 5 se muestra una prueba de intradermorreacción.

La concordancia entre pruebas serológicas para el grupo A se muestra en el cuadro 4, mientras que para el grupo B se encuentra en el cuadro 5.

Cuadro 2. Pruebas serológicas. Grupos A y B. Número de animales reactores positivos y negativos.

		GRUPO A						GRUPO B					
m	dpi	IDGA		ELISA		CIE		IDGA		ELISA		CIE	
		(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
1	0	3	84	9	78	7	80	1	30	4	27	1	30
2	15	39	49	43	45	44	44	3	29	8	24	3	29
3	30	44	43	66	22	54	33	3	28	12	19	5	26
4	60	38	50	42	46	50	38	3	29	5	27	4	28
5	150	5	79	36	48	10	74	5	27	6	26	3	29
6	240	6	76	26	56	18	64	4	26	2	28	7	23
7	330	2	73	18	57	5	70	5	23	4	24	5	23

m=muestreo dpi= días post inmunización

Cuadro 3. Pruebas serológicas. Grupos A y B. Porcentaje de animales reactores positivos.

m	dpi	GRUPO A			GRUPO B		
		IDGA	ELISA	CIE	IDGA	ELISA	CIE
1	0	3.44	10.34	8.04	3.22	12.90	3.22
2	15	44.32	48.86	50	9.40	25	9.34
3	30	50.57	75.86	62	9.67	38.7	16.13
4	60	43.18	47.42	56.82	9.40	15.62	12.50
5	150	5.95	42.85	11.90	15.62	18.75	9.37
6	240	7.31	31.70	21.95	13.33	6.66	23.33
7	330	2.66	24	6.66	17.85	14.28	17.85

m=muestreo dpi= días post inmunización

Cuadro 4. Grupo A. Concordancia entre pruebas serológicas.

	Día 0	Día 15	Día 30	Día 60	Día 150	Día 240	Día 330	Promedio
IDGA/CIE	20%	43.4%	38.8%	36.4%	33.3%	25%	14.3%	30.17%
ELISA/CIE	12.5%	31%	36.7%	27.2%	15.2%	16%	8.7%	21%
IDGA/ELISA	8.3%	30.5%	31.8%	22.5%	12.2%	12.5%	5%	17.5%

Cuadro 5. Grupo B. Concordancia entre pruebas serológicas.

	Día 0	Día 15	Día 30	Día 60	Día 150	Día 240	Día 330	Promedio
IDGA/CIE	0%	33.3%	50%	42.9%	37.5%	27.3%	20%	30.14%
ELISA/CIE	0%	18.2%	11.8%	33.3%	33.3%	33.3%	22.2%	21.7%
IDGA/ELISA	0%	18.2%	13.3%	37.5%	27.3%	50%	33.3%	25.6%

IDGA- Inmuno Difusión en Gel de Agar
CIE- Contra Inmuno Electroforesis
ELISA- Inmuno Ensayo Enzimático

Fig. 1. Grupo A. Pruebas serológicas. Animales positivos.

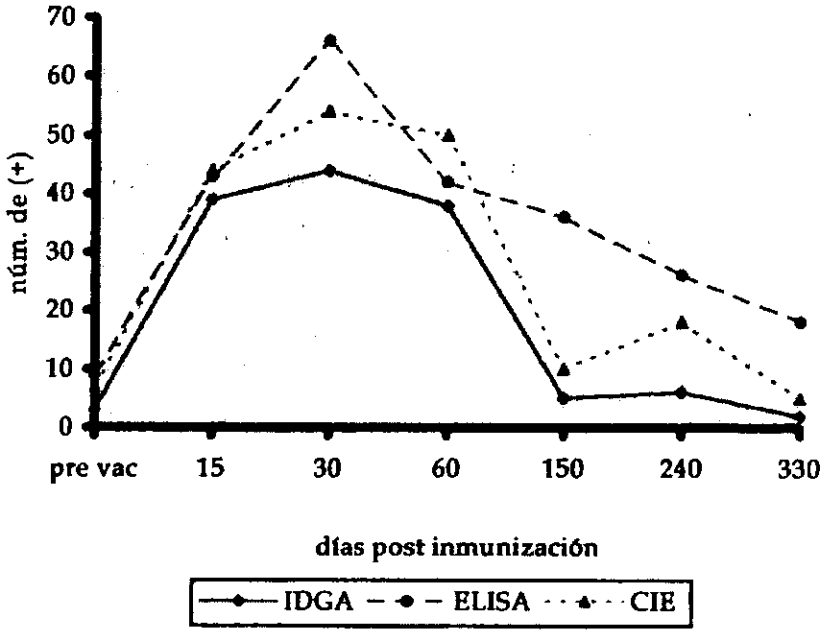
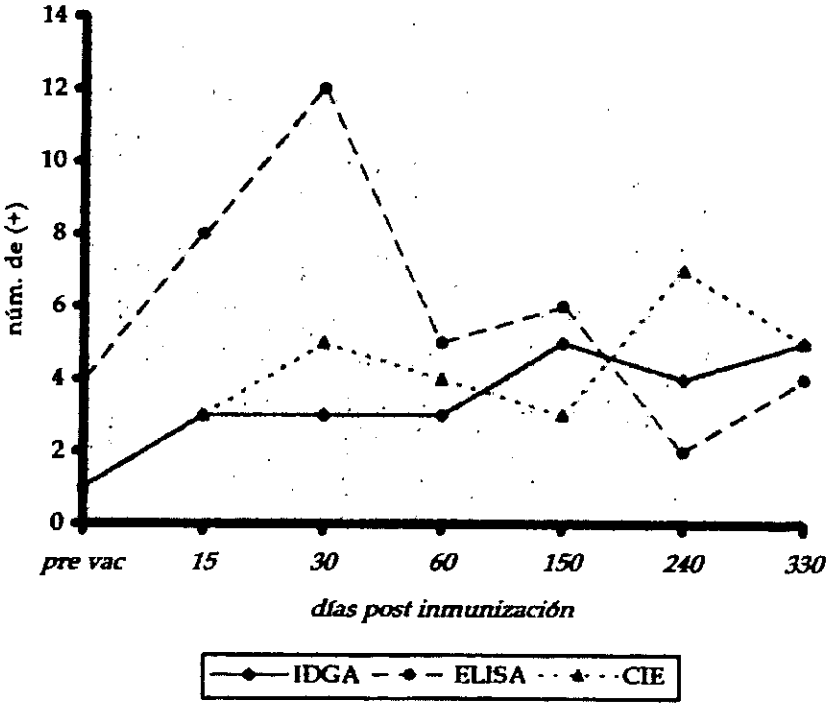


Fig. 2. Grupo B. Pruebas serológicas. Animales positivos.



3.2 Evaluación de la Respuesta inmune celular.

3.2.1 Intradermorreación.

Los resultados de la prueba de IDR utilizando PPD-A y PPD-B en tablas del cuello para el grupo A se presentan en el cuadro 6.

En la primera de estas pruebas, que se realizó a 75 cabras del grupo A, se obtuvieron 14 animales positivos a PPD-A, que representó el 18.7% y 4 (5.3%) fueron positivos a PPD-B. Ocho cabras tuvieron una reacción intradérmica con un grosor de la piel mayor a 4 mm después de 72 horas en los sitios de inoculación tanto de PPD-A como de PPD-B, por lo que se les consideró como positivas a ambas. Cuarenta y nueve animales (65.3%) no mostraron un aumento en el grosor de la piel mayor a 4 mm después de 72 horas, por lo que se consideraron negativos. La segunda prueba de IDR se hizo a las tres semanas posteriores a la inmunización, en 88 animales, en la que se obtuvo 8 (9.1%) positivos a PPD-A, 5 (5.7%) a PPD-B, 65 (74%) positivos a ambas y 10 (11.2%) negativos. La tercera IDR se llevó a cabo a los 5 meses posteriores a la inmunización, en 84 cabras. Dos de ellas (12.4%) fueron positivas a PPD-A, 5 (6%) a PPD-B, 59 (70.2%) fueron positivas a ambas y 18 (21.4%) fueron negativas.

En estas pruebas de IDR realizadas al grupo A, se destaca el hecho de que la mayoría de las cabras en el primer muestreo no mostraron una reacción de hipersensibilidad retardada a la aplicación de los derivados proteicos aviar y bovino. Sin embargo, en el segundo muestreo, realizado 3 semanas posteriores a la aplicación de la bacterina, se aprecia un aumento considerable en el número de reactores positivos tanto a PPD-A como PPD-B. Se obtuvieron 2 positivos a PPD-A (2.4%) y 5 (6%) positivos a PPD-B, así como 59 (70.2%) animales con reacción intradérmica positiva a PPD-A y PPD-B y 18 (21.4%) negativos. El número de reactores positivos a PPD-A fluctuó entre 18.7% en el primer muestreo a 2.4% en el último. Por

su parte, el número de positivos solo a PPD-B no varió considerablemente en los tres muestreos, ya que osciló entre 5.3 y 6% (figura 3).

Estadísticamente, hubo diferencias significativas entre la 1a. IDR con respecto a la 2ª IDR y 3ª IDR ($p<0.05$). La 2ª y 3ª IDR no tuvieron diferencias estadísticamente significativas entre ellas.

Por otro lado, en el grupo B, los resultados de las 3 pruebas de IDR se citan en el cuadro 7.

La primera de las pruebas dobles comparativas en el grupo B se realizó en 29 animales, en la que se obtuvo 21 negativos que representaron el 72.40%, 5 positivos a PPD-A que significaron el 17.25%, 3 positivos a PPD-A y PPD-B, representando el 10.35% y ningún positivo solo a PPD-B. Para 2ª. IDR se tuberculinizaron 32 animales y se obtuvieron los siguientes resultados: 22 negativos (68.70%), 7 positivos tanto a PPD-A como PPD-B (21.90%), 3 positivos a PPD-A (9.4%) y ningún positivo solo a PPD-B. En la 3ª prueba de IDR, se utilizaron 30 animales, en ésta 22 de ellos (73.33%) fueron negativos, 4 (13.33) se consideraron positivos a PPD-A y PPD-B, 3 (10%) fueron positivos a PPD-A y un animal (3.33%) fue positivo a PPD-B (figura 4). No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los 3 muestreos ($p>0.05$).

Con el fin de valorar las características histopatológicas de estas reacciones intradérmicas, se procedió a repetir la prueba doble comparativa 72 horas antes del sacrificio 2 cabras del grupo A y 2 del grupo B, que en la primera y segunda pruebas de IDR habían mostrado una fuerte positividad hacia PPD-A o PPD-B. A las 72 horas post inoculación de los derivados proteicos, los cuatro animales mostraron dermatitis linfocitaria perivascular grave.

Cuadro 6. Grupo A. Resultados de las pruebas de IDR.

IDR	(+) PPD-A	(+) PPD-B	(+) PPD-A y PPD-B	negativos	total
1º	14	4	8	49	75
2º	8	5	65	10	88
3º	2	5	59	18	84

Cuadro 7. Grupo B. Resultados de las pruebas de IDR.

IDR	(+) PPD-A	(+) PPD-B	(+) PPD-A y PPD-B	negativos	total
1º	5	0	3	21	29
2º	3	0	7	22	32
3º	3	1	4	22	30

IDR-Intradermorreacción
PPD-A. Derivado proteico purificado aviar.
PPD-B. Derivado proteico purificado bovino.

Figura. 3. Grupo A. Prueba de IDR.

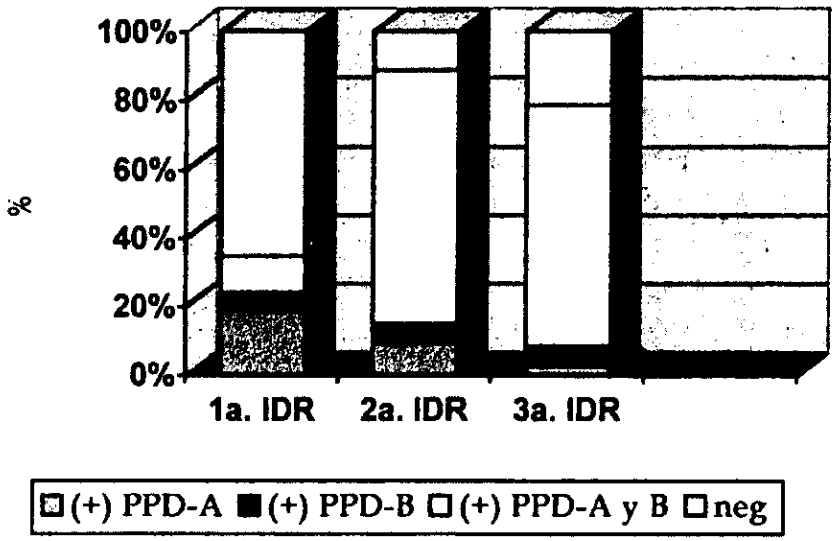
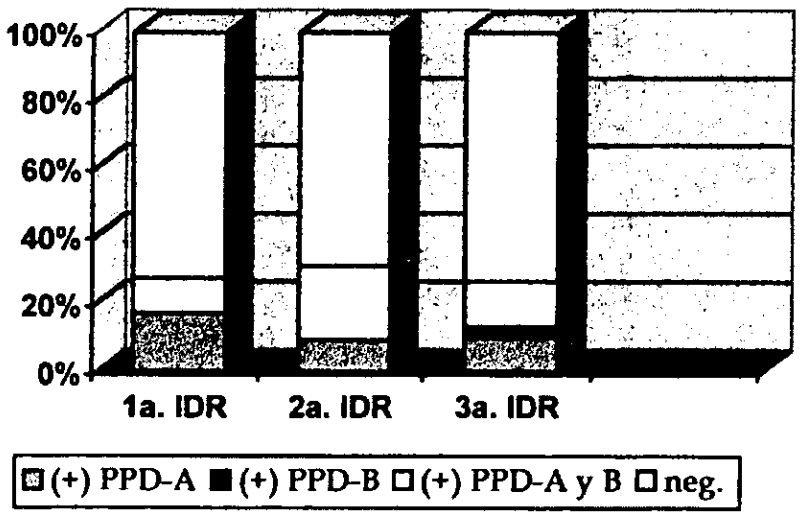


Figura 4. Grupo B. Prueba de IDR.



3.3 Estudio *post mortem*.

De diciembre de 1997 a septiembre de 1998 se realizaron las necropsias de 27 caprinos, 17 del grupo A y 10 del grupo. El resultado de los estudios anatomopatológicos para ambos grupos se resumen en los anexos 6 y 7, respectivamente.

En el grupo A, la condición corporal fue buena en 4 (23.5%) animales, regular en 7 (41.2%) y mala en 6 (35.3%). De los 17 animales con estudios *post mortem*, solo 4 (23.5%) presentaron un nódulo subcutáneo en la región del encuentro, resultado de la aplicación de la bacterina. Diez (58.8%) de estos 17 animales, tuvieron lesiones compatibles con paratuberculosis. Ocho (47%) mostraron lesiones de la enfermedad, mientras que 2 caprinos (11.8%) presentaron lesiones paratuberculosas, así como de otras enfermedades, tales como bronconeumonía supurativa y mastitis necrótica con aislamiento de *Mycoplasma* spp. Los 7 animales restantes (41.2%) murieron o fueron sacrificados por causas independientes a paratuberculosis.

Las lesiones intestinales de la enfermedad variaron del tipo I al III. Las lesiones tipo I, se observaron en 1 de los animales (10%). Al examen macroscópico no se observó engrosamiento de la mucosa intestinal. El examen histopatológico reveló acúmulos de macrófagos con relación a Placas de Peyer. En este tipo de lesiones no se apreciaron bacterias con la tinción de Ziehl Neelsen. Las lesiones tipo II se presentaron también en 1(10%) de los caprinos. En ésta, tampoco fue evidente un engrosamiento de la mucosa intestinal. Sin embargo, en la evaluación histopatológica, la reacción granulomatosa fue más evidente, abarcando áreas en de la mucosa con relación a Placas de Peyer y con moderada cantidad de bacilos ácido alcohol resistentes. Seis (60%) de los animales presentaron lesiones tipo III b, ya que se apreció engrosamiento moderado a grave de la mucosa intestinal, con plegamiento de la misma y afectación de la serosa del órgano (Fig. 6). Al estudio histopatológico, se observó enteritis granulomatosa grave difusa, con numerosos

macrófagos de citoplasma espumoso y algunas células gigantes, en ocasiones daban un aspecto de mosaico a la mucosa con engrosamiento y fusión de vellosidades intestinales (Fig. 7), además de que 2 de ellos tuvieron serositis y endolinfangitis granulomatosas (Fig. 8 y 9). Los bacilos ácido alcohol resistentes variaron de escasos a abundantes. Dos (20%) de los animales tuvieron lesiones tipo IIIc (cuadro 8). Estos presentaron engrosamiento de la mucosa intestinal que histologicamente, se caracterizaron por infiltrado linfocitario grave y presencia de numerosas células gigantes multinucleadas, además de áreas de necrosis. La tinción de Ziehl Neelsen fue negativa en estos casos. Nueve (90%) de los animales con paratuberculosis presentaron afectación de linfonodos mesentéricos, con presencia de bacilos ácido alcohol resistentes e incluso con calcificaciones en el parénquima del órgano (Figs. 10 y 11), mientras que en 8 (80%) también se vio involucrado el hígado (anexo 6).

De los 7 animales que no mostraron lesiones sugestivas de paratuberculosis, 3 de ellos presentaron enteritis asociada a coccidias, 1 presentó mastitis linfoplasmocitaria grave que sugiere un origen viral, posiblemente artritis encefalitis caprina y otra más presentó mastitis necrótica con aislamiento de *Mycoplasma* spp. Otra de las cabras murió por iatrogenia y la restante por neumonía (anexo 6).

Con respecto al grupo B, la condición corporal de los animales se consideró como buena en 4 (40%), regular en 2 (20%) y mala en los 4 restantes (40%). De los 10 animales de este grupo, 5 (50%) presentaron lesiones compatibles con paratuberculosis, en 3 (60%) de ellos solo se apreciaron lesiones de esta enfermedad, mientras que los otros 2 (40%) también mostraron lesiones de otras patologías, entre ellas mastitis no supurativa, sugestiva a infección viral y un colangiocarcinoma. Cuatro cabras (40%) no mostraron lesiones compatibles con paratuberculosis y una (10%) presentó avanzados cambios autolíticos.

De los 5 animales con paratuberculosis, 4 (80%) presentaron lesiones que se clasificaron como tipo IIIb y una de ellas se clasificó como tipo II (cuadro 8). Todos ellos (100%) presentaron afectación de linfonodos mesentéricos (Fig. 9), 4 (80%) tuvieron hepatitis granulomatosa y en 2 (40%) hubo además serositis granulomatosa. Todos los animales con lesiones histológicas de la enfermedad presentaron de moderada a abundante cantidad de bacilos ácido alcohol resistentes con la tinción de Ziehl Neelsen tanto en intestino como en linfonodos mesentéricos y en la serosa intestinal (anexo 7).

De los 4 animales sin lesiones de paratuberculosis, 3 (75%) presentaron enteritis linfoplasmocitaria asociada a coccidias y una (25%) murió por traumatismo (anexo 7).

El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre ambos grupos con respecto a la severidad de las lesiones ($p>0.05$).

Cuadro 8. Tipo de lesión intestinal. Diferencias entre grupos.

	sin lesiones de paratb	I	II	III	total
grupo A	7	1	1	8	17
grupo B	5	0	1	4	10

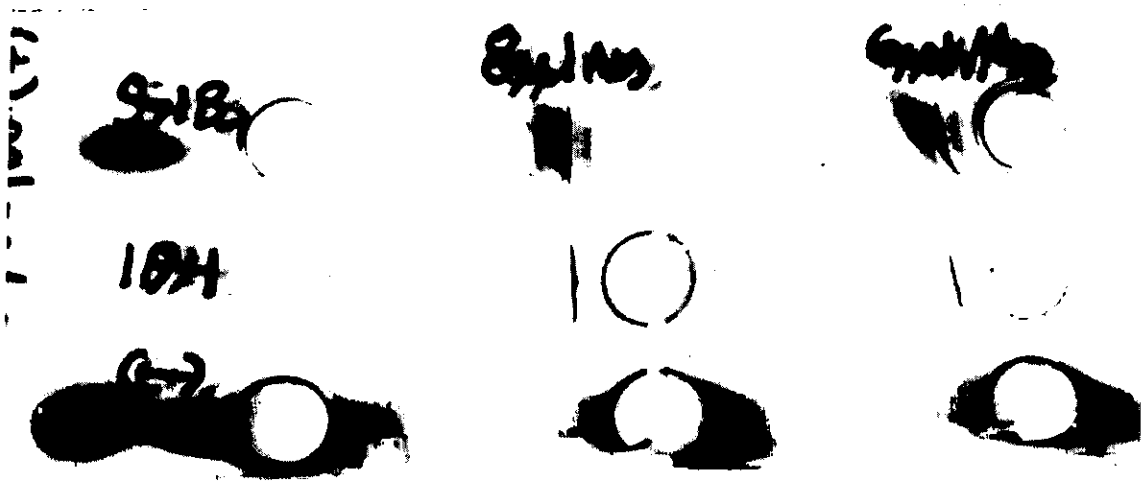


Fig. 5. Prueba de contrainmuno electroforesis. Cabras S-13 (inmunizada), 194 (no inmunizada) y control negativo. Presencia de bandas de precipitación al utilizar dos concentraciones diferentes de antígeno, 8μg/ml y 6 μg/ml. Tinción de azul de Coomassie.

Fig. 6. Cabra 133 (no inmunizada). Yeyuno. Engrosamiento severo de la mucosa intestinal con formación de pliegues transversales.

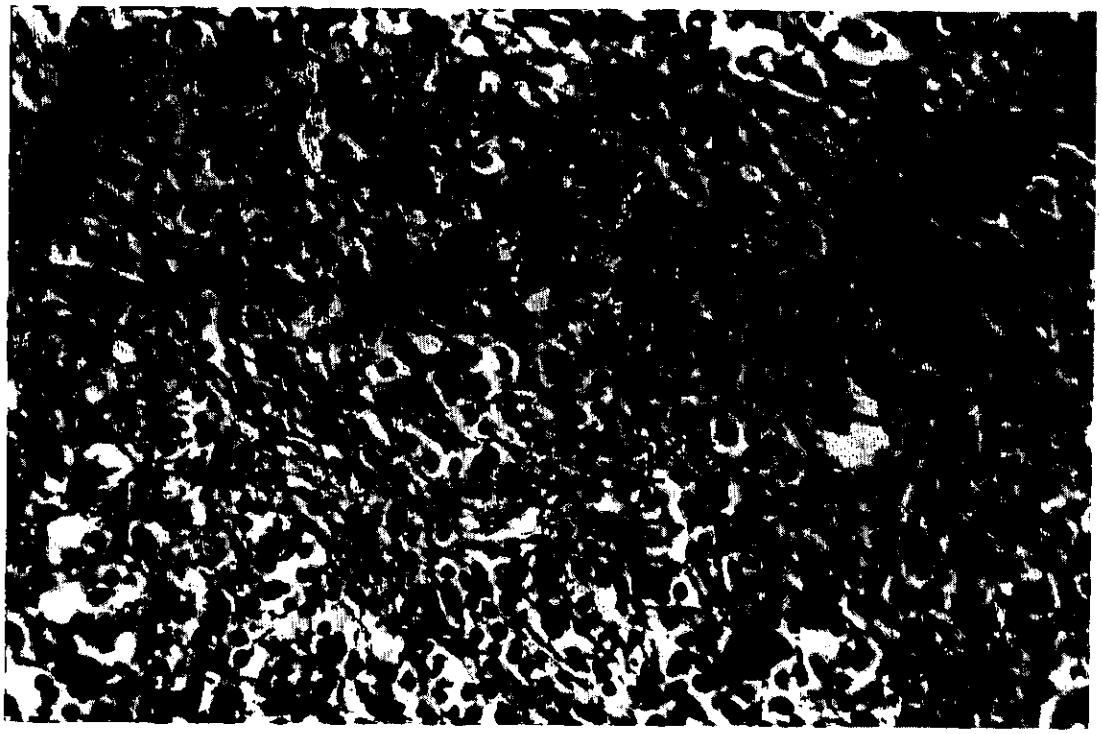


Fig. 7. Cabra S-13 (inmunizada). Reacción granulomatosa en la Placa de Peyer, con grupos de macrófagos (M) con citoplasma espumoso, rodeados por linfocitos (L). H-E (40 X).

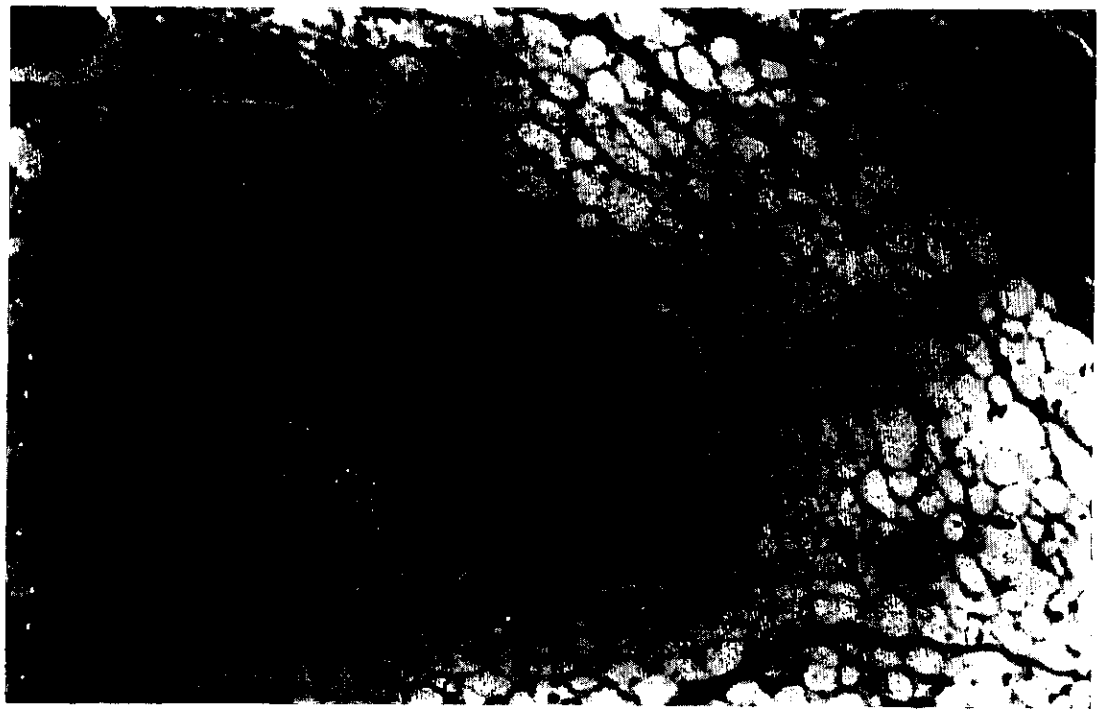


Fig. 8. Cabra S-30 (inmunizada). Endolinfangitis granulomatosa. Vaso linfático mesentérico con presencia de infiltrado linfoplasmocitario perivascular. En su lumen se aprecia un trombo formado por macrófagos y linfocitos. H-E (4 X).

Fig. 9. Cabra S-30 (inmunizada). Endolinfangitis granulomatosa. Acercamiento del vaso linfático mostrado en la Fig. 8, en el que se observan numerosos bacilos ácido alcohol resistentes en el citoplasma de macrófagos (flecha). Tinción de Ziehl-Neelsen (40 X).

Fig. 10. Cabra 235 (no inmunizada). Linfonodo mesentérico aumentado de tamaño, con reacción granulomatosa y focos de calcificación (flecha).

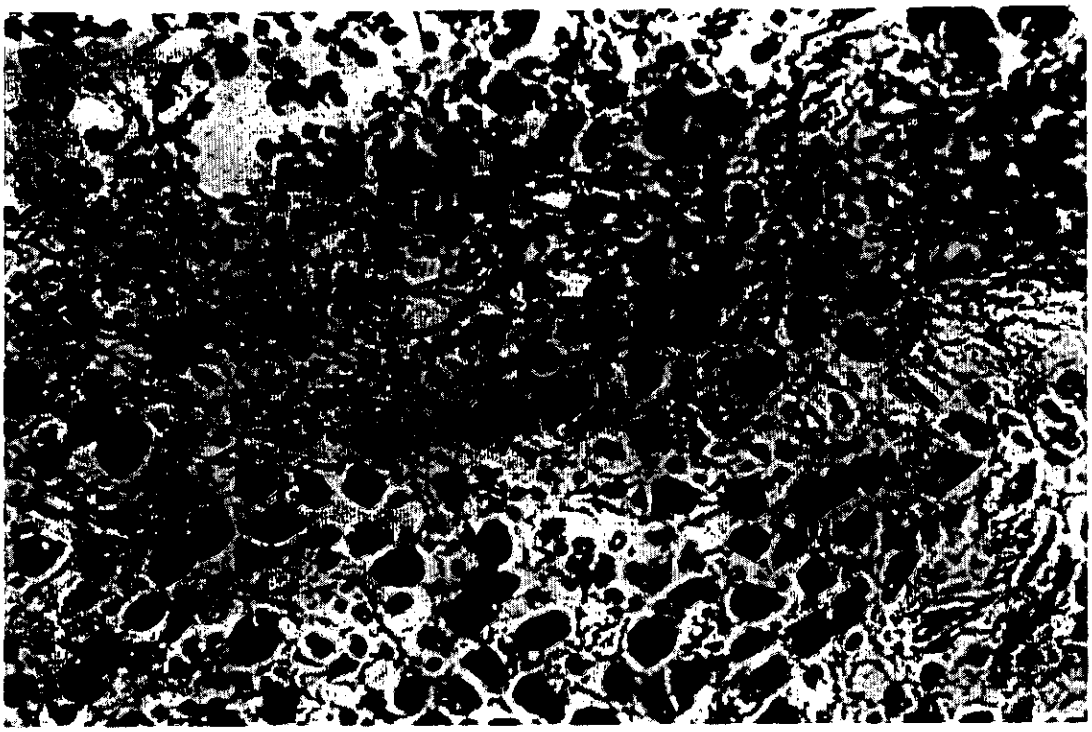


Fig. 11. Cabra 154 (inmunizada). Linfadenitis granulomatosa. Presencia de numerosas bacterias ácido alcohol resistentes en el citoplasma de macrófagos (flecha). Tinción de Ziehl Neelsen (40 X).

Fig. 12. Cabra 200 (inmunizada). Medio de cultivo Löwenstein-Jensen con micobactina en el que se observan numerosas colonias de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*.

3.4 Estudios bacteriológicos.

Se procesaron muestras de intestino, linfonodos mesentéricos y heces de los 27 caprinos a los que se les realizó el estudio *post mortem*, con el fin de obtener el aislamiento de *M. avium* subsp *paratuberculosis*.

En el grupo A, se obtuvo el aislamiento de la micobacteria en 7 (70%) de las cabras con lesiones histológicas de paratuberculosis, 6 de ellas con lesión IIIb y una con lesión tipo II. Las cabras con lesiones histológicas tipo I y IIIc (30%) fueron negativas. En este grupo, el tiempo de aislamiento varió de 6 a 14 semanas y se obtuvo un total de 23 aislamientos a partir de órganos y 2 aislamientos de heces, que correspondieron al 20% de los animales con lesiones de paratuberculosis. El órgano en el que se obtuvo el mayor número de aislamientos fue la válvula ileocecal, con 6 (26%), seguida por el linfonodo ileocecal con 5 (21.8%), el yeyuno con 4 (17.5%), linfonodos mesentéricos anterior y medio con 3 cada uno (13% cada uno) e íleon, con 2 (8.7%) (Fig. 12). No se obtuvieron aislamientos a partir del linfonodo mesentérico posterior (Anexo 6).

Con respecto al grupo B, se obtuvo el aislamiento de *M. avium* subsp *paratuberculosis* en el 100% de las cabras con lesiones de paratuberculosis, las cuales mostraron lesiones tipo II y IIIb. En este grupo, se obtuvieron 17 aislamientos de órganos y 2 de heces, equivalentes al 40% de los animales con lesiones de paratuberculosis. El tiempo de aislamiento varío de 8 a 14 semanas. El órgano con mayor número de aislamientos fue la válvula ileocecal con 4 (23.5%), seguido por el linfonodo ileocecal, linfonodo mesentérico anterior e íleon con 3 aislamientos cada uno (17.6% cada uno) y finalmente y el yeyuno y linfonodo mesentérico posterior con 2 aislamientos cada uno (11.8% cada uno). No se obtuvieron aislamientos a partir del linfonodo mesentérico medio (Anexo 7).

DISCUSION

El uso de inmunógenos para el control de la paratuberculosis se inició en bovinos, mientras que en pequeños rumiantes, especialmente en caprinos, se han desarrollado pocos estudios al respecto, por lo que no existe suficiente información de ciertos aspectos, tales como las características de la respuesta inmune que se presentan posteriores a la inmunización (Molina, *et al*, 1996) o el comportamiento de estos inmunógenos en animales adultos ya infectados. De hecho, la mayoría de los estudios se han realizado en animales jóvenes con infección experimental o como parte de programas de control a largo plazo, cuyos resultados sugieren que esta inmunización modifica y limita el desarrollo de lesiones y de casos clínicos de la enfermedad (García Marín, *et al*, 1997). En este rancho se había realizado un trabajo anteriormente, enfocado hacia la comparación de diferentes pruebas de paratuberculosis caprina. En este estudio, para marzo de 1997, se habían identificado un 6.73% de animales positivos a Paratuberculosis con la prueba de IDGA y un 15.38% de animales positivos por ELISA. El estudio anatomopatológico realizado a lo largo de 2 años en 17 de estos animales reveló que el 58.82 % de ellos presentaron lesiones tipo IIIb, en 17.64 % y 11.76% las lesiones se clasificaron como IIIa y IIIc, respectivamente, mientras que el 11.76% restante presentó lesiones tipo II. A pesar que se trató de establecer un programa de control basado en desechar animales positivos a IDGA, con signos clínicos o ambos ("Probar y Eliminar"), no se siguieron las recomendaciones sugeridas, por lo que se concluyó que no hubo diferencias significativas entre la prevalencia inicial y final de Paratuberculosis (Vélez, 1998). Posteriormente, se decidió establecer el uso de una bacterina como parte de la estrategia para lograr el control de la enfermedad. Por este motivo, se aplicó una sola dosis de bacterina de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* (*Map*) cepa 316F a los animales adultos de este rebaño y durante un año se compararon las respuestas inmunes tanto humoral como celular, así como los

hallazgos anatomopatológicos y bacteriológicos. No se inmunizaron a las crías debido a que todavía no se había determinado cuales de ellas iban a ser mantenidas en el rebaño como animales de reemplazo.

4.1 Respuesta inmune humoral.

Por largo tiempo se ha considerado que la RIH no confiere protección en contra de infecciones micobacterianas. En el caso de la Paratuberculosis, la utilidad de la detección de anticuerpos séricos radica en estimar periódicamente la prevalencia de la misma (Sockett, *et al*, 1992). En aquellos lugares en donde se ha aplicado la inmunización como una medida de control, es necesario el determinar por cuanto tiempo esta RIH podría interferir con el diagnóstico de la enfermedad (Molina, *et al*, 1996). Aunque la respuesta inmune basada en anticuerpos no confiere un efecto protector, sí es indicativa del grado de activación del sistema inmune en contra de la micobacteria (Corpa, *et al*, 1999). En este estudio, se realizó un total de 7 muestreos, a los días 0, 15, 30, 60, 150, 240 y 330 post inoculación (dpi), con el fin de comparar la respuesta inmune humoral entre animales inmunizados (grupo A) y no inmunizados (grupo B). Al comparar los resultados entre ambos grupos, se apreció con las 3 pruebas serológicas aplicadas, Inmuno Difusión en Gel de Agar (IDGA), Contra Inmuno Electroforesis (CIE) e Inmuno Ensayo Enzimático (ELISA), un incremento significativo en el nivel de anticuerpos en el grupo A con respecto a los caprinos del grupo B a partir de los 15 dpi y que alcanzó su máximo a los 60 dpi, para posteriormente sufrir una disminución gradual en el nivel de los mismos, hasta los 330 dpi. A partir de los 150 dpi, se apreciaron desigualdades entre grupos, ya que con ELISA se apreciaron diferencias a los 150 y 240 dpi, con IDGA solo a los 330 dpi, mientras que con CIE se apreció en el grupo A un comportamiento similar al grupo B a partir de los 150 dpi.

Estos resultados coinciden parcialmente con los obtenidos en otros estudios en los que se ha aplicado esta misma bacterina u otros productos similares. En el trabajo

de García Marín, *et al*, (1999), realizado en cabritos, la RIH posterior a la inmunización se evaluó mediante IDGA y ELISA, apreciándose al igual que en este estudio, que la RIH tuvo un fuerte incremento entre los 15 y 30 dpi y aumentó hasta el día 60, para sufrir una disminución gradual hasta el día 300. Por otro lado, en el caso de López, *et al*, (1999), el uso de esta bacterina en ganado bovino con infección natural, provocó una elevada y duradera RIH, además de que se incrementó la producción de leche y no se observaron signos clínicos de Paratuberculosis en el hato 3 meses después de su aplicación. Estos resultados sugieren que la aplicación de esta bacterina en caprinos, induce una fuerte RIH capaz de ser detectada por diversas pruebas serológicas solo durante los primeros 3 meses posteriores a su aplicación. Si posteriormente, como parte del programa de control se desea eliminar a aquellos animales seropositivos, se podrían desechar aquellos que resulten positivos por IDGA, esto debido a que esta técnica es altamente confiable para detectar animales con paratuberculosis con o sin signos clínicos (Vélez, 1998), que están eliminando a la micobacteria por heces (Goudswaard, 1976; Sherman, 1990) o con lesiones avanzadas (Shulaw, *et al*, 1993). Para este mismo propósito, la prueba de ELISA podría no ser de mucha utilidad, ya que se recomienda como ideal para detectar animales en etapas tempranas de infección (Merkal, 1984; Vélez, 1998) debido a que es muy sensible y detecta cantidades mínimas de anticuerpo (Colgrove, *et al*, 1989; O'Reilly, 1993), por lo que en programas de control en los que se practique la inmunización, un resultado positivo podría deberse a la producción de anticuerpos vacunales y no por infección. En este trabajo, se apreció que aún después de 330 días, ELISA fue capaz de detectar una gran cantidad de animales seropositivos en el grupo A.

En lo que se refiere a la prueba de CIE, por lo general se utiliza en el diagnóstico de enfermedades micóticas y pocos han sido los estudios encaminados a probar su eficacia en Paratuberculosis. Los resultados sugieren que la CIE podría ser una herramienta útil para detectar la RIH en animales con Paratuberculosis o

inmunizados contra la enfermedad, ya que con esta prueba se apreció un gran porcentaje de animales inmunizados positivos, con un máximo de 62% a los 30 dpi. Sin embargo, Oviedo (1991), al evaluar la RIH posterior a la inmunización oral, menciona que ninguno de los animales inmunizados fue positivo a la prueba de CIE durante los 2 años posteriores a la aplicación de la bacterina. Esto podría haberse debido a que la aplicación de una bacterina oral no indujo la producción de anticuerpos séricos. Así mismo, Molina, *et al*, (1996), informan que con CIE no se detectaron anticuerpos en ninguno de los animales inmunizados. Estas diferencias podrían deberse tanto a la cantidad y concentración del antígeno utilizado, así como al voltaje y tiempo de aplicación de la corriente eléctrica. Con los protocolos utilizados, la CIE y la IDGA utilizan una cantidad similar de antígeno, de 0.37 mg y 0.30 mg, respectivamente, por cada muestra. Además, en la CIE, a diferencia de la IDGA, los resultados se obtienen en aproximadamente 1 hora, en comparación con las 24 horas que se requieren como mínimo para una lectura de IDGA.

4.2 Respuesta inmune celular.

Este tipo de respuesta inmune es responsable de controlar una infección por *Map* (Sweeney, 1997). Esto se logra una vez que el macrófago ha procesado el antígeno que a su vez será presentado a los linfocitos cooperadores LTh. Estos, si corresponden a la subpoblación LTh1, se encargarán de producir IL-2 e IFN-γ, con un subsecuente incremento en la actividad fagocítica de los macrófagos, así como un aumento en la proliferación de LTh y LTc. Por otro lado, los LTh2, son responsables de la proliferación y diferenciación de linfocitos B, por lo que también se relacionan con la respuesta inmune humoral (Munk, *et al*, 1990; Sweeney, 1997). En este caso, la medición de la RIC, se hizo mediante la prueba de intradermorreacción (IDR), la cual ha sido previamente utilizada para el diagnóstico de Paratuberculosis. En los animales bacterinizados, esta RIC se caracterizó por ser fuerte y constante, además de que la gran mayoría de estos

caracterizó por ser fuerte y constante, además de que la gran mayoría de estos animales fueron positivos tanto al PPD-A como al PPD-B. En contraste, en el grupo testigo no se observaron cambios significativos a lo largo del experimento. Al igual que con la RIH, los resultados obtenidos coinciden con investigaciones previas. En el estudio de García Marín, *et al* (1999), la RIC tuvo un comportamiento similar a la RIH, en donde los animales del grupo experimental, al igual que los caprinos del grupo A del presente estudio, mostraron un considerable aumento en la RIC, la cual fue constante durante todo el año. De acuerdo con estos investigadores, esta elevada RIC favorecería el desarrollo de la forma tuberculoide de la enfermedad que se cree limita el desarrollo de la infección. En el estudio de López, *et al,* (1999), la RIC también fue marcada y persistente, además, se observó que los animales bacterinizados eran positivos tanto a PPD-A como a PPD-B. La comparación entre estas investigaciones y el presente estudio, sugiere que esta bacterina que contiene cepa 316F de *Map,* provoca una fuerte y persistente RIC, por lo que animales así bacterinizados y a los que posteriormente se les aplique una prueba doble comparativa para diagnóstico de tuberculosis, podrían dar un falso positivo. Cabe mencionar que hasta el momento, en México no existen informes de tuberculosis en cabras, además de que la bacterina aplicada solo está autorizada para ser usada en pequeños rumiantes, los cuales no entran dentro del programa de erradicación de tuberculosis. Además, esta bacterina no sería la única causa de falsos positivos en una prueba doble comparativa para diagnóstico de tuberculosis, ya que también podría deberse a que el animal esté infectado con otras bacterias, como *Corynebacterium, Actinomyces, Nocardia* e incluso micobacterias saprófitas.

Corpa, *et al,* (1999) mencionan que para detectar esta RIC en animales inmunizados, sería más confiable realizar una prueba de IFN-γ, ya que hasta la fecha, se considera como la prueba más específica para medir la RIC en casos de Paratuberculosis (Stabel, 1996). La medición de IFN-γ en caprinos se ha realizado con la ayuda de un *kit* comercial de IFN-γ de bovino para diagnóstico de

tuberculosis y que también funciona para detectar esta citocina en la cabra y el borrego (Corpa, *et al*, 1999; García Marín, *et al*, 1999). En el estudio de Corpa, *et al*, (1999) este IFN-γ aumentó dentro de los primeros 30 días posteriores a la inmunización y sus niveles disminuyeron en el transcurso de un año. Al igual que en una prueba de IDR, los animales mostraron mayor reactividad hacia el PPD-A. Sin embargo, García Marín, *et al*, (1999), mencionan que los animales inmunizados presentaron un aumento considerable en el IFN-γ, el cual fue incrementando con el tiempo. En este caso, hubiera sido deseable el realizar un estudio de IFN-γ para comparar los resultados con los obtenidos en la IDR y observar si éste aumentaba o disminuía con el transcurso del tiempo y tener su correlación con el grado de lesión en los animales a los que se les practicó el examen post mortem.

4.3 Estudio Anatomopatológico.

La mayor parte de la literatura donde se describen las características de las lesiones de Paratuberculosis en animales inmunizados se han realizado en individuos jóvenes, entre 15 y 30 días de edad, con infección experimental, que primero fueron inmunizados y posteriormente infectados. En estos estudios se menciona que la inmunización contra Paratuberculosis, aunque no previene la infección, sí altera el curso de la enfermedad, esto al disminuir la presentación de signos clínicos y modificar la respuesta inflamatoria, además de que se favorece la presentación de lesiones de tipo tuberculoide que se limitan a las Placas de Peyer (Corpa, *et al*, 1999; García Marín, *et al*, 1997; Juste, *et al*; 1994). Para que esto suceda, es necesario que el inmunógeno favorezca el desarrollo de una fuerte RIC. Sin embargo, en animales adultos ya infectados y con diferentes grados de lesión, es probable que aunque se desarrolle una elevada RIC, esta no sea suficiente para favorecer la disminución de la carga micobacteriana dentro del intestino u otros órganos afectados, tales como linfonodos, además de que si tienen una infección avanzada, es posible que presenten emaciación severa e hipoproteinemia, lo cual no favorecería el desarrollo

de una adecuada respuesta inmune. En este estudio, se apreció que la mayoría de los animales, tanto del grupo A como del B presentaron una condición corporal que varío de regular a mala. En el grupo A, 10 animales (58.8%) mostraron lesiones de Paratuberculosis y 5 (50%) en el B. Así mismo, varios de los animales mostraron evidencias de otras patologías, tales como artritis o mastitis crónicas. Todo esto, es indicativo de un mal estado general de los animales. El estudio *post mortem,* realizado durante el año que duró la fase experimental, mostró que de los animales del grupo A con lesiones de Paratuberculosis, el 10% presentó lesiones discretas; el 70% tuvo lesiones de moderadas (tipo II) a severas (tipo IIIb), con escasas a abundantes micobacterias. No hubo diferencias significativas con los animales del grupo B ($p>0.05$). Estos hallazgos sugieren que el comportamiento de la bacterina es diferente en animales adultos con infección crónica. Las lesiones observadas en el grupo A fueron muy similares a las que se presentaron dentro del grupo B, con engrosamiento severo de la mucosa intestinal, debido a reacción granulomatosa grave difusa, con fusión de vellosidades y abundantes macrófagos que daban un aspecto de mosaico y que en ocasiones abarcó hasta la serosa del órgano, con afectación de linfonodos mesentéricos e incluso el parénquima hepático. Estas lesiones corresponden a la forma lepromatosa que indican una respuesta inmune con altos niveles de anticuerpos y bajas cantidades de IFN-γ e IL-2 (Clarke, *et al,* 1996), lo que puede indicar que no existió regresión de las mismas, tal y como mencionan otros autores, como en el trabajo de Corpa, *et al,* (1999), en el que las lesiones que se limitaban al tejido linfoide asociado a mucosa y eran del tipo tuberculoide según la clasificación de Clarke, *et al* (1996), las cuales corresponden a una respuesta inmune basada principalmente en Th1 con altos niveles de IFN-γ. En dos de los animales (20%) se observaron lesiones fueron severas (IIIc), con reacción inflamatoria granulomatosa formada en su mayoría por numerosas células gigantes multinucleadas, rodeadas por un collar de linfocitos, que abarcaban hasta la serosa del órgano, aunque a diferencia de los otros animales, no se apreciaron

bacilos ácido alcohol resistentes, lo que hace suponer que estos animales pudieron desarrollar una RIC, capaz de eliminar al bacilo paratuberculoso. En este caso, al igual que para la evaluación de la RIC, también hubiera sido conveniente medir los niveles de IFN-γ en los animales inmunizados y tener la correlación con el tipo de lesión paratuberculosa presente, ya que con la prueba de IDR no se puede establecer el tipo de citocina que está predominando en la RIC.

4.4 Estudio bacteriológico.

Respecto al aislamiento bacteriano, se ha señalado que el uso de esta bacterina limita el desarrollo de lesiones intestinales de paratuberculosis y la disminución en la presentación de casos clínicos de la enfermedad, aunque no se especifica si disminuye la eliminación de *Map* por heces. En este estudio se obtuvo el aislamiento de *Map* a partir de órganos del 70% de los animales del grupo A con lesiones de paratuberculosis y en el 100% de los animales del grupo B con lesiones de la enfermedad. Se observó que la mayoría de los aislamientos del bacilo paratuberculoso a partir de órganos, tanto en el grupo A como en el grupo B, se obtuvieron a partir de la válvula ileocecal, lo que coincide con otros estudios (Vélez, 1998). El tiempo de aislamiento fue similar para ambos grupos, con un máximo de 14 semanas para la observación de colonias. El aislamiento de la micobacteria a partir de heces se obtuvo en el 20% de los caprinos del grupo A y en el 40% de los del grupo B. El aislamiento a partir de heces fue el más problemático, debido a que las muestras se contaminaban con frecuencia, aún después de haber sido descontaminadas. Es probable que por este motivo no se hayan obtenido un mayor número de aislamientos. Todos estos resultados indican que los animales todavía eran diseminadores de la enfermedad, capaces de infectar a otros individuos.

Existen otros estudios en donde se ha evaluado especialmente la presencia de *Map* en heces de animales inmunizados. En los Países Bajos, en un estudio de 10 años,

se determinó si la vacunación prevenía la eliminación de la bacteria por heces en bovinos. Después de este período, la tasa de animales con presencia de la micobacteria en heces era similar entre hatos vacunados y no vacunados, por lo que se recomienda que un programa de vacunación se combine con uno de eliminar además de mejorar prácticas de higiene y manejo (Kalis, *et al*, 1999). Sin embargo, en el trabajo de Körmendy (1994), realizado también en ganado bovino, se apreció que después de 5 años de establecer un programa de vacunación, la prevalencia de la micobacteria en heces disminuyó de 48% a 1.4%, en comparación de 30% en el ganado no vacunado. En este caso, la bacterina disminuyó la eliminación de la bacteria por heces, mas no eliminó la infección. Los resultados obtenidos en el presente estudio son similares a los anteriores, ya que a un año de haber aplicado la bacterina, existen animales que aún eliminan la bacteria por heces y es probable que lo sigan haciendo por años, por lo que es esencial continuar con el programa de vacunación si es que se desea controlar y eventualmente, eliminar la presencia de *Map* en el rancho.

Los hallazgos expuestos en este estudio no son concluyentes, ya que un programa de control de Paratuberculosis, incluso en aquellos lugares donde se establezca la vacunación, necesita de varios años para obtener resultados favorables. Los resultados obtenidos durante el año posterior a la inmunización muestran que aún no se ha obtenido un control sobre la presencia de *Map* en la explotación. Aunque la RIC de los caprinos inmunizados es alta y persistente, además de que los hallazgos anatomopatológicos en algunos animales sugieren una regresión en la severidad de las lesiones, es evidente que aún existen portadores y diseminadores de la enfermedad. Por esto, es necesario que en el rancho se establezcan otras prácticas de control que favorezcan tanto el funcionamiento de la bacterina como una disminución en la presentación de casos clínicos, tales como seguir con el programa de vacunación anualmente con los animales de reemplazo, mejorar la

alimentación, establecer un programa de desechos, llevar una bitácora con los diagnósticos *post mortem* con la intención de establecer cuales son las patologías más comunes dentro de la explotación y tomar las medidas pertinentes para controlarlas, limpieza de instalaciones, así como realizar pruebas serológicas y cultivo de heces para evaluar periódicamente la prevalencia de la enfermedad.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Elsken, L.; Lewis-Hintz A. and Whipple, D., 1985. The pathogenesis, diagnostic and control of paratuberculosis (Johne's disease) in goats. Amer Assn Vet Lab Diag, 28th Annual Proceedings: 121-130.

2. Sweeney, R., 1997. Pathogenesis and immunology of paratuberculosis. Proceedings of the 5th Inter Colloq Paratuberculosis: 1-4. USA.

3. Beeman, K. B.; Huber, B. and Leipold, H. W., 1989. Johne's disease (Paratuberculosis) in sheep. Comp Cont Educ 11: 1415-1422.

4. Juste, R. A., 1984. Paratuberculosis: una revisión. Med. Vet. 1: 197-210.

5. Setz, S.; Heider, L.; Heston, W. D.; Bech-Nielsen, S.; Rings, M. and Spangler, L. 1989. Bovine fetal infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. JAVMA 194: 1423-1426.

6. Wren, G., 1993. What's new with Johne's disease? Bovine Veterinarian 39: 40-43.

7. Thorel, M. F., 1989. Relationship between *Mycobaterium avium, M. paratuberculosis* and mycobacteria associated with Crohn's disease. Am Rech Vet 20: 417-429.

8. Clarke, C. J., 1997. Paratuberculosis and molecular biology. Vet Journal 153: 245-247.

9. Goudswaard, J. and Terporten, W. M., 1972. Johne's disease in goats: Comparison of serological tests. Neth J Vet Sci 4: 93-112.

10. Ramírez, C.; Trigo, E.; Suárez, F. y Merkal, R., 1979. Aislamiento e identificación de *Mycobacterium paratuberculosis* en México. Técnica Pecuaria México 36: 74-75.

11. De Lucas Tron, J., 1984. Comparación de cuatro formas de diagnóstico de la paratuberculosis en caprinos. Tesis de Licenciatura. FES-Cuautitilán, UNAM.

12. Vélez, Hernández M., 1996. Comparación de diferentes técnicas de diagnóstico en paratuberculosis caprina (*Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*). Tésis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.

13. Oviedo, G., 1991. Ensayo de una bacterina oral de *Mycobacterium paratuberculosis* en un rebaño ovino infectado naturalmente. Tesis de Maestría. Fac. de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

14. Collins, P., Davies, D. and Matthews, P., 1984. Mycobacterial infection in goats: diagnosis and pathogenicity of the organism. Br Vet J 140: 196-201.
15. Thoen, C. O. and Baum, K. H., 1988. Current knowledge on paratuberculosis. JAVMA 192: 1609-1611.

15. Collins, M. T., 1994. Clinical approach to control of bovine paratuberculosis. JAVMA 204: 208-210.

16. Chiodini, R. J.; Van Kruiningen, H. J. and Merkal, R., 1984. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): The current status and future prospects. Cornell Vet 74: 218-262.

17. Cranwell, M. P., 1993. Control of Johne's disease in a flock of sheep by vaccination. Vet Record 133: 219-220.

18. Bercovier, H., 1997. Molecular basis of pathogenicity in mycobacterial infections. Proceedings of the 5th Inter Colloq Paratuberculosis: 5-29. USA.

19. Thorel, M.F., 1984. Review of the occurrence of mycobactin dependence among Mycobacteria species. Ann. Rech. Vét. 15: 405-409.

20. Macham, L.; Ratledge, C. and Nocton, J., 1975. Extracellular iron acquisition by mycobacteria: role of the exochelines and evidence against the participation of mycobactin. Infection and Immunity 12: 1242-1251.

21. White, W. B.; Whipple, D.; Stabel, J. R. and Bolin, C. A., 1994. Comparison of cellular and extracellular proteins expressed by various isolates of *Mycobacterium paratuberculosis* and other mycobacterial species. Am J Vet Res 10: 1399-1405.

22. Colgrove, G. S.; Thoen, C. O.; Blackburn, B. O. and Murphy, C. D., 1989. Paratuberculosis in cattle: A comparison of three serologic tests with results of fecal culture. Vet Microbiol 19: 183-187.

23. Thoresen, O. V. and Eversen, O., 1994. Comparison of immunochemestry, acid-fast staining and cultivation for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in goats. J Vet Diagn Invest 6:195-199.

24. Chiodini, R. M., 1996b. Resistance to paratuberculosis. Vet Clin North Am: Food Anim Prac 12: 313- 345.

25. Jepson, M. and Clark, M., 1998. Studying M cells and their role in infection. Trends in Microbiol 6: 359-365.

26. Momotani, E.; Whipple, D. L.; Thiermann, A. B. adn Chessatlle, N. F., 1988. Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches in calves.

27. Polotsky, Y.; Dragunsky, E. and Khavkin, T., 1994. Morphologic evaluation of the pathogenesis of bacterial enteric infections. Crit Rev Microbiol 20: 161-208.

28. Siebers, A. and Finlay, B., 1996. M Cells and the pathogenesis of mucosal and systemic infections. Trends in Microbiol 4: 22-29.

29. Edwards, D. And Kirkpatrick C. H., 1986. The immunology of mycobacterial diseases. Am J Respir Dis 134:1062-1071.

30. Chávez, G.; García, F.; Aduriz, G.; Moreno, B.; Gutiérrez, M. and Badiola, 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.

31. Chávez, G., 1993. Estudio comparativo de las lesiones y de la respuesta inmunológica observadas en corderos infectados experimentalmente con *Mycobacterium paratuberculosis* y *Mycobacterium avium* sp. *silvaticum*. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza, España.

32. Niesbet, D. I.; Gilmour, N. J. and Brotherson, J. C., 1962. Quantitative studies of *M. johnei* in tissues of sheep. J Comp path 72: 80-91.

33. 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.

34. Kuby, J. 1997. T-cell receptor. En: Immunology. W. H. Freeman and Co., New York. Págs. 263-284.

35. Munk, M.; Gatrill, A.; Schoel, B.; Gulle, H.; Pfeffer, K.; Wagner, H. and Kaufmann, H., 1990. Immunity to mycobacteria: possible role of alpha/beta and gamma/delta T lymphocytes. APMIS 98: 669-673.

36. Hayday, A. C., 1995. γδ T cell specificity and function. En: T Cell Receptors. Oxford Univ Press. Págs. 70-91.

37. Clarke, C. J.; Colston, A.; Little, D.; Alzuherri, H.; Sharp, M. and Burrells, C., 1996. The immune response in paratuberculosis infection of small ruminants. Vet Immunol and Immunopath 54: 321.

38. Navarro, J. A.; Ramis, G.; Seva, J.; Pallarés, F.J. and Sánchez, J., 1998. Changes in lymphocyte subsets in the intestine and mesenteric lymph nodes in caprine paratuberculosis. J Comp Path 118: 109-121.

39. Pérez, V.; García-Marín J. F. and Badiola, J. J: 1992. Pathological features in sheep naturally infected with *M. paratuberculosis.* Med Vet 9: 20-23.

40. Kluge, J. P.; Merkal, R. S.; Monlux, W. S.; Larsen, A. B.; Kopecky, K. E.; Ramsey, F. K. And Lehmann, R. P., 1968. Experimental paratuberculosis in sheep after oral, intratracheal or intravenous inoculation: lesions and demonstration of etiologic agent. Am J Vet Res 29: 953-962.

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

42. Merkal, R. S., 1984. Paratuberculosis: Advances in cultural, serologic and vaccination methods. J.A.V.M.A. 184: 939-943.

43. Ridge, S.; Morgan, I.; Collins, M.; Condron R.; Skilbeck, N. and Webber., 1991. Comparison of the Johne's adsorbed EIA and the complement-fixation test for the diagnosis of Johne's disease in cattle. Australian Vet J 68:253-257.

44. Shome, R.; Krishnappa, G. and Shome, B., 1996. Studies on cross-reactions among *Mycobacterium paratuberculosis, Mycobacterium phlei* and *Corynebacterium renale* by Agar Gel Immunodifusion test an Counter Immuno Electrophoresis. Indian J Anim Hlth 35:129-131.

45. Sherman, D. M. and Gezon, H. M., 1980. Comparison of agar gel immunodiffusion and fecal culture for identification of goats with paratuberculosis. JAVMA 177: 1208-1211.

46. Tsai, J.; Hutchinson, L and Zarkower, A., 1989. Comparison of Dot Immunobinding Assay, Enzime-linked Immunosorbent Assay and Immunodiffusion for serodiagnosis of paratuberculosis. Can J Vet Res 53:405-410.

47. Wilks,C. R.; Taylor, T. K. and Russell, E. G., 1981. Isolation of mycobacteria inducing cross-reactions in the complement fixation test for Johne's disease. Res. Vet. Sc. 30: 323-327.

48. Sockett, D.; Conrad, T.; Thomas, C. and Collins, M., 1992. Evaluation of four serological tests for bovine paratuberculosis. J. Clin. Microbiol. 30:1134-1139.

49. Ratnamohan, T. N.; Norris, M. J.; Mitchell, G.; and Spencer, T. L., 1986a. A reappraisal of the complement fixation test using soluble *Mycobacterium avium* for the detection of *M. paratuberculosis* infection in cattle. Aust. Vet. J. 63: 133-134.

50. Sherman, D. M.; Gay, J. M.; Bouley, D. S. and Nelson, G. H., 1990. Comparison of the complement-fixation and agar gel immunodifussion tests for diagnosis of subclinical bovine paratuberculosis. Am. J. Vet. Res. 51: 461-465.

51. Merkal, R. S.; Larsen, A. B.; Kopecky, K. E. and Ness, R. D., 1968. Comparison of examination and test methods for early detection of paratuberculous cattle. Am. J. Vet. Res. 29: 1533-1539.

52. Thoen, C. O. and Moore, L. A., 1989. Control of Johne's disease in four commercial dairy herds in Iowa. J Vet Diagn Invest 1: 223-226.

53. O'Reilly, L. M., 1993. The usefulness of ELISA for the diagnosis of tuberculosis in man and animals: A review. Curso de Postgraduados. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad de Zaragoza. España.

54. Yokomizo, Y.; Merkal, R. S. and Lyle, P., 1983. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine immunoglobulin G1 antibody to a protoplasmic antigen of *Mycobacterium paratuberculosis*. Am J Vet Res 44: 2205-2207.

55. Bech-Nielsen, S.; Jorgensen, J.; Ahrens, P. and Feld, N., 1992. Diagnostic accuracy of a *Mycobacterium phlei*-adsorbed serum enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of bovine paratuberculosis in dairy cows. J Clin Microbiol 30:613-618.

56. Braun, R.; Buergelt, C.; Lillet, R.; Linda, S. and Simpson, J., 1990. Use of an enzyme-linked immunosorbent assay to estimate prevalence of paratuberculosis in cattle of Florida. JAVMA 196: 1251-1254.

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

58. Abbas, B.; Riemann, H. and Lonnerdal, B., 1983. Isolation of specific peptides from *Mycobacterium paratuberculosis* protoplasm and their use in an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of paratuberculosis (Johne's disease) in cattle. Am J Vet Res 44: 2229-2235.

59. Reviriego, F., 1996. Diagnóstico de la paratuberculosis caprina por Enzimoinmunoensayo. Estudio preliminar. Rev Salud Anim 18: 69-76.

60. Woodruff, T.; Shulaw, W.; Bech-Nielsen, S.; Hoffsis, G.; Spangler, E. and heider, L., 1991. Serodiagnosis of bovine paratuberculosis by use of a dot enzyme-linked immunosorbent assay. Am J Vet Res 52: 217-221.

61. Goudswaard, J.; Gilmour, N. J.; Dijkstra, R. G. And Van Beek, J. J., 1976. Diagnosis of Johne's disease in cattle: a comparison of five serological tests under field conditions. Vet Rec 98: 461-462.

62. Sherman, D. M.; Bray, B.; Gay, J. M: and Bates, B. S., 1989. Evaluation of the agar gel immunodifussion test for diagnosis of subclinical paratuberculosis in cattle. Am J Vet Res 50:525-530.

63. Mackenzie, D. and Philpot, C., 1975. Counterimmunoelectrophoresis as a routine mycoserological procedure. Mycopathologia 57: 1-7.

64. Dee, T. H., 1975. Detection of *Aspergillus fumigatus* serum precipitins by Counterimmunoelectrophoresis. J Clin Microb 2: 482-485.

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

66. Larsen, A. B.; Groth, A. H. and Johnson, H. W., 1950. Allergic response to Johnin and Tuberculin of various skin regions of cattle. Am J Vet Res 11: 301-303.

67. Larsen, A. B.; Hawkins, W. W. and Merkal, R., 1964. Experimental vaccination of sheep against Johne's disease. Am J Vet Res 25: 106-107.

68. Shuter, D.; Franti, C. and Page, H., 1974. Evaluation of a comparative intradermal tuberculin test in California dairy cattle. Am J Vet Res 35: 379- 387.

69. Thorel, M. F.; Vialard, J.; Manfroni, F.; Bernardot, J.; Ostyn A. and Vandevelde, J., 1992. Paratuberculose experimentale chez le mounton apres inoculation par voie veineuse ou par voie orale: pouvoir pathogene et diagnostic biologique. Ann Rech Vet 23: 105-115.

70. Roitt, I.; Brostoff, J. y Male, D., 1991. Inmunología. 2° edición. Ed. Salvat, España. Pág. 22.4.

71. Karpinsky, T. and Zorawski, C., 1975. Experimental paratuberculosis of sheep. I. Clinical, allergical, bacteriological and post-mortem examinations. Bull Vet Inst Pulawy 19: 59-63.

72. Wentink, G.; Bongers, J.; Vos, J. and Zeeuwen, P., 1993. Relationship between negative skin test with johnin after vaccination and post mortem findings. Vet Record 9: 38-40.

73. Stabel, J., 1996. Production of γ-interferon by peripheral blood mononuclear cells: an important diagnostic tool for detection of subclinical paratuberculosis. J Vet Diagn Invest 8: 345-350.

74. Hintz, A., 1981. Comparative lymphocyte stimulation studies no whole blood from vaccinated and nonvaccinated cattle with paratuberculosis. Am J Vet Res 42: 507-510.

75. Kim, Y. G.; Bech-Nielsen, S.; Gordon, J. C.; Slemons, R. D. and Spangler, E., 1989. Comparison of two methods for isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples. Am. J. Vet. Res. 50: 1110-1113.

76. Whipple, D. and Merkal, R., 1985. Procedures for the field and laboratory processing of fecal specimens for the isolation on *Mycobacterium paratuberculosis*. 28th Annual Proceedings Amer. Assn. Vet. Lab. Diag.: 239-246.

77. Ratnamohan, T. N. and Spencer, T. L., 1986b. A technique for the purification of *Mycobacterium paratuberculosis* from the ileal mucosa of infected cattle. Aust. Vet. J. 63: 185-187.

78. Juste, R. A.; Marco, J. C.; Sáenz de Ocáriz, C. and Adúriz, J. J., 1991. Comparison of different media for the isolation of small ruminant strains of *Mycobacterium paratuberculosis*. Vet. Microbiol. 28: 385-390.

79. Fales, W. H.; Morehouse, L. G.; Nelson, S. L. and Kintner, L. D., 1985. Development of a Johne's disease culture service in a veterinary medical diagnostic laboratory. Amer Assn Vet Lab Diag, 28th Annual Proceedings.: 269-276.

80. Vihan, V. S., Singh, N. and Singh, S. V., 1989. Preliminary observations on faecal culture test fir the detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in goats. In. J. Anim. Sc. 59: 1522-1524.

81. Richards, W. D. and Thoen, C. O., 1977. Effect of freezing on the viability of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine feces. J. Clin. Microbiol. 6: 392-395.

82. Richards, W. D., 1981. Effects of physical and chemical factors on the viability of *Mycobacterium paratuberculosis*. J. Clin. Microbiol. 14: 587-588.

83. Stevenson, K. and Sharp, M., 1997. The contribution of molecular biology to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* research. Vet Journal 153: 269-286.

84. Ambrosio, R. E.; Harris, Y. and Huchzermeyer, F., 1991. A DNA probe for the detection of *Mycobacterium paratuberculosis*. Vet Microbiol 26: 87-93.

85. Vary, P.; Andersen, P.; Green, E.; Hermon-Taylor J. and McFadden, J., 1990. Use of highly specific DNA probes and the polymerase chain reactionto detect *Mycobacterium paratuberculosis* in Johne's disease. J Clin Microbiol 28: 933-937.

86. Plante, Y.; Remenda, B.; Chelack, B. and Haines, D., 1996. Detection of *M. paratuberculosis* in formalin-fixed paraffin-embedded tissues by the polymerase chain reaction. Can J Vet Res 60: 115-120.

87. Saxegaard, F. and Fodstad, F. H., 1985. Control of paratuberculosis (Johne's disease) in goats by vaccination. Vet Record 116: 439-441.

88. Spears, H. N., 1959. Vaccination against Johne's disease: The results of a field trial experiment. Vet Record 71: 1154-1156.

89. Chávez, G., 1996. Avances en la tecnología para el diagnóstico e inmunización de la paratuberculosis. Memorias de la V Reunión Anual del Consejo Consultivo Nacional de Sanidad Animal. México, D. F.

90. Spangler, E.; Heider, L.; Bech-Nielsen, S. and Dorn, R., 1991. Serologic enzyme-linked immunoabsorbent assay responses of calves vaccinated with a killed *Mycobacterium paratuberculosis* vaccine. Am J Vet Res 52: 1197-1200.

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

91. Larsen, A. B., 1973. Johne's disease-Immunization and diagnosis. JAVMA 163: 902-904.

92. Hilbink, F., 1990. The antibody response of sheep to vaccination against Johne's disease. New Zealand Vet J 38: 168-169.

93. Huitema, H., 1967. Johne's disease in cattle and vaccination. Office Internat Epizoot 68: 743-748.

94. Wilesmith, J. W., 1981. Johne's disease: A retrospective study of vaccinated herds in Great Britain. British Bull J 138: 322-330.

95. Thorel, M. F. et Gaumont, R., 1977. Contribution a l'etude des reactions serologuiques et allergiques chez la chevre sensibilisee par des antigenes tuberculeux. Bull. Acad. Vet. France 50:549-568.

96. Larsen, A. B.; Moyle, A. I. and Himes, E. M., 1978. Experimental vaccination of cattle against paratuberculosis (Johne's disease) with killed bacterial vaccines: A controlled field study. Am J Vet Res 39: 65-69.

97. García Marín, J. F.; Tellechea, J.; Gutiérrez, M.; Pérez, V. and Juste, R., 1997. Paratuberculosis vaccination in sheep modifies and limits the development of lesions. Proceedings of the 5th Int Coll Paratuberculosis. Madison, WS, USA: 223.

98. García-Marín, J.; Tellechea, J.; Gutiérrez, M. and Pérez, V., 1999. Evaluation of two vaccines (killed and attenuated) against small ruminant paratuberculosis. Proccedings of the 6th Intl Colloq Paratuberculosis. Melbourne, Australia: 234-241.

99. López, C. A.; Perales, F. A.; Sánchez-Prieto, B. M.; Franco C. F. and Puentes C. E., 1999. Vaccination of cattle against paratuberculosis with an inactivated vaccine. A controlled field study in an infected herd. Proccedings of the 6th Intl Colloq Paratuberculosis. Melbourne, Australia: 219-224.

100. Corpa, J. M.; Pérez, V. and García Marín, J. F., 1999. Differences in the immune response in lambs and kids vaccinated against Paratuberculosis according to the age at vaccination. Proccedings of the 6th Intl Colloq Paratuberculosis. Melbourne, Australia: 225-233.

101. Juste, R. A.; García-Marín, J. F.; Peris, B.; Sáez de Ocáriz, C. and Badiola, J. J., 1994. Experimental infection of vaccinated and non-vaccinated lambs with *Mycobactrium paratuberculosis*. J. Comp. 110: 185-194.

102. Kalis, C. H.; Weels, S. J. and Ott, S. L., 1999. Herd certification for paratuberculosis in unsuspected diary herds using cultures of strategically pooled faecal samples. Proccedings of the 6th Intl Colloq Paratuberculosis. Melbourne, Australia: 27-29.

103. Körmendy, B.; Szilágyi, M.; Tuboly, S. And Nagy, G., 1990. Some diagnostic featrues of the pathogenesis of bovine paratuberculosis (Johne's disease) and serum biochemical changes after oral reinfection. J Vet Med 37: 229.235.

104. Shulaw, W. P.; Bech-Nielsen, S.; Rings, D. M.; Getzy, D. M. and Woodruff, T. S., 1993. Serodiagnosis of paratuberculosis in sheep by use of gel agar immunodifussion. Am J Vet Res 54: 13-19.

105. Cervantes, R., 1983. Studies on antigens of *Aspergillus*: their use in Veterinary Mycology. Doctoral Thesis. University of Glasgow, UK.

ANEXO 1

REACTIVOS NECESARIOS PARA LA TECNICA DE ELISA (Chávez, 1993).

Tampón carbonato

Bicarbonato sódico (Na_2CO_3)	5.3 g
Agua destilada	1000 ml

Ajustar el pH a 9.6 con ácido clorhídrico (HCl)

Suspensión de *M. phlei*

M. phlei	5 g
Solución salina (NaCl al 8.5%)	1000 ml

Tampón citrato 0.05 M con pH 4

solución A:	
Acido cítrico monohidratado ($C_6H_8O_7$)	22.97 g
Agua destilada	1000 ml
solución B:	
Citrato sódico tribásico ($Na_3C_6H_5O_72H_2O$)	29.41 g
Agua destilada	1000 ml

Mezclar 600 ml de la solución A + 479 de la solución B agregando agua destilada cbp 2 litros. Ajustar el pH a 4 al momento de utilizarlo.

Antígeno

Antígeno PPA-3	0.04 mg
Tampón carbonato	1 ml

Solución salina de lavado

NaCl	8.5 g
Tween 80	0.5 ml

Disolver en 1 litro de agua destilada.

PBS (Phosphate Buffered Saline)

NaCl	8 g
KCl	0.2 g

Fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4)	1.44 g
Fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4)	0.24 g
Agua destilada	800 ml

Ajustar el pH a 7.4 con Hcl. Posteriormente agregar 200 ml de agua destilada y esterilizar a 15 lb/pulg^2 por 20 minutos.

PBS-TG (Phosphate Buffered Saline-Tween Gelatine)

fosfato monosódico monohidratado	1.8 g
fosfato disódico anhídro	12.36 g
NaCl	8.5 g
agua destilada	993 ml
Ajustar el pH a 7.6 empleando NaOH	
Tween 80	0.5 ml

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
Una vez fuera del autoclave agregar la gelatina. Para que la gelatina se incorpore bien al buffer, es necesario agregarla con agitación constante.

Gelatina	1 g

Sustrato ABTS (2,2'-Azinobis (3-ethil-benzthiazoline-sulfonic-acid)

ABTS	5.48 mg
tampón citrato	50 ml

Añadir 19 µl de solución madre 1:25 de H_2O_2 (10 µl de H_2O_2 al 30% de 20 volúmenes en 120 µl de agua destilada).

Solución de frenado

Acido fluorhídrico al 45%	890 µl
Agua destilada	20 ml

ANEXO 2

REACTIVOS NECESARIOS PARA LA TECNICA DE CONTRAINMUNO ELECTROFORESIS (Cervantes, 1983)

Solución salina amortiguada (PBS).

NaCl	8.0 g
K_2HPO_4	1.21 g
KH_2PO_4	0.34 g
Agua destilada	1000 ml

Suspender los ingredientes en el agua y agitar hasta disolver. El pH debe ser entre 7.2 y 7.4.

Tampón de Veronal.

Acido dietil barbitúrico (Barbitone) $(C_2H_5)_2C.CO.NH.CO.NH.CO$	3.32 g
Barbitone dietil sódico (Barbitone sódico) $(C_2H_5)_2C.CO.NH.C.\ CONa$	25.52 g
Azida de sodio NaN_3	2.0 g
Agua destilada	2000 ml

Solución desteñidora

Metanol	500 ml
Acido acético glacial	100 ml
Agua destilada	400 ml

Mezclar los ingredientes y guardar en botella ámbar.

Solución para teñir el gel

Azul de Coomassie	1 g
Solución desteñidora	1000 ml

ANEXO 3
REACTIVOS Y MATERIAL NECESARIO PARA PREPARAR EL MEDIO DE CULTIVO LÖWENSTEIN-JENSEN CON MICOBACTINA.

Material:
Tubos de cristal con tapón de rosca de 15 ml de capacidad
1 matraz de cristal de 2 litros con un tapón de algodón y gasa
1 probeta de cristal de 500 ml con un tapón de algodón y gasa
Vaso de licuadora
Embudo de cristal con gasa
5 pipetas de cristal de 10 ml
2 jeringas de 5 ml
Envolver todo el material en papel y meter al autoclave para esterilizar (120°C/121 libras/15 min).

Reactivos (para 1 litro de medio de cultivo):

Medio de Löwenstein-Jensen	23 g
Agua destilada	372.2 ml
Huevos	620.34 ml (15 huevos)
Micobactina J	2 mg (disolverla en 4 ml de alcohol etílico)
Glicerina	7.44 ml
Ciclohexamida	0.75 g
Penicilina	200,000 UI
Cloramfenicol	0.1 g

Para desinfectar los huevos: Alcohol isopropílico al 75: aproximadamente 2 litros.

Instrucciones:
1. Poner el agua bidestilada en el matraz, colocarlo sobre una platina caliente y en agitación. Agregar el medio Löwenstein-Jensen y la glicerina. Mezclar hasta que hierva.
2. Tapar el matraz con el tapón de algodón y gasa y poner en el autoclave a 120°C/121 libras/ 15 min.
3. Lavar los huevos con agua y jabón, enjuagarlos muy bien y secarlos.
4. Desinfectar los huevos. Colocarlos en un recipiente y agregar el alcohol isopropílico al 75% hasta que los cubra. Desinfectar por 30 min. Posteriormente, colocarlos sobre una gasa limpia hasta que se sequen.

Nota: Todos los siguientes pasos requieren de atmósfera estéril.

5. Batir los huevos. Dejar reposar.

6. Una vez que el medio de cultivo ha sido esterilizado, dejar que enfríe a 55°C. Colocarlo de nuevo en una platina con agitación.
7. Agregar los antibióticos.
8. Agregar la micobactina.
9. Vaciar el huevo batido en la probeta utilizando el embudo con gasa.
10. Agregar la mezcla de huevo batido al medio de cultivo.
11. Mezclar bien.
12. Depositar de 10-13 ml del medio de cultivo en los tubos.
13. Coagular el medio de cultivo en autoclave a 85°C/45 min. Poner los tubos inclinados con el tapón sin cerrar herméticamente.
14. Secar a 37°C toda la noche.
15. Ajustar los tapones hasta que cierren herméticamente.
16. Conservar los tubos a 2-8°C.

ANEXO 4

Resultados pruebas serológicas. Grupo A.

núm. cabra	Muestra basal	15 días	30 días	60 días	150 días	240 días	330 días
23		E C	I I E C	I E C	----------	----------	----------
54							
100		C	I E C	E C			
101		E	E C	E C	----------	----------	----------
105		I	I I E C	I C	E		
110		I C	I I E C	I C	E	E	E
112		I E C	E	I C	E	E	E
115		E	E				
116		I E				E	
117			E			E	
120		I E C	E				
121			E C	C	E		
122			E C				
128	E	I C	E C	E			
130		I C	E C	C		E	E
131	E	I E C	E C	E	E	E	E
132	E	I E C	I E C	I	E	E	E
134	E	I E C	I E	I E	E		E
136			E	E	E		I
137		I C	I E C	I E C	E C		
141			I E C	I E C	E C	E	E
142		I C	I E C	I C			
145	E	I E C	I E C	I C			
153		I E C	I E	E	E	C	
154	E	I E C	I E C	I E C	I E C	I E C	----------
160	I C	I E C	I E C	I I C	I E C	I C	C
161		C	I I E	I I C	E	E	
168		E	E				
172	C	I I C	I I E C	I I E C	I I E C	I I C	E C
176		C	E C	I E			
179		I E C	I I E C	E	E	E	E
181			E				----------
183			I E				
187			I C	I E C		E	
196		E	I E C	I	E	E	E
198			E	E			
200	E C	C	I I E C	I I E C	I I E C	I I E C	----------
201			I E	I E C			
214			E				
229		I	E				
230		I E C	I E C	E C	C	C	
234		I	I C	I C		C	
238		E	E	E	E	E	E
240		E C		E	----------		

núm. cabra	Muestra basal	15 días	30 días	60 días	150 días	240 días	330 días
241		E		C			
259		E	IIEC	C	E	E	E
267	IIEC	IIEC	IIC	IIEC	----------	----------	----------
272		E		EC			
283			I	IEC	E		
302		E	E		E		
303		IEC	IIEC	IIEC	E		
304		E	EC	C			
305		IC	IEC	IC			C
306			IEC	IC			
311	E		C	IC			
314			EC				
315		IEC	IEC	EC			
316			----------		E		
318		IC			I	----------	----------
319		IEC	IEC	IC		E	
320		E	EC		E	C	
325		IEC	IIEC	IC			
328							
329			IEC	IC		C	
330			E	C	E		
332		IEC	IIC	IEC	E		E
334		E	----------	C	E		
335		IEC	IIEC	IEC	E	EC	E
340			E	C	E		
341		IEC	IIEC	IIC	E	E	E
344		IC	IIC	EC	E	E	E
S-02	C	C	IEC	EC	E	E	
S-05		EC	E	E		EC	
S-10		E	IC	C			
S-13	IC	IEC	IEC	IIEC	IIEC	IIEC	----------
S-14			E	E			----------
S-15			EC			----------	----------
S-19		E			E		
S-21		IEC	IC	EC			
S-29		IEC	EC				
S-30	C	IIEC	IIEC	IIEC	----------	----------	----------
A.claro		C	EC	EC		C	C
A. negro		IEC	EC	E			
Chori		E		E	C	IEC	IEC
Monje		IC	IEC	IEC	C	C	E
Sannen			II C	E	E	EC	E
Tito		C	EC	E		C	
Dodó				IEC	E	EC	E

positivos por:
I - IDGA E- ELISA C- CIE

ANEXO 5

Resultados pruebas serológicas. grupo B.

núm. cabra	Muestra basal	15 días	30 días	60 días	150 días	240 días	330 días
3		E					
72						I	----------
92		E					----------
96					I		
129			I I E C		E	----------	----------
133			E	E	I E C	I E C	I E C
148			E	E			
149	E				E		
150			E		E		E
151							
170							
171	E	E	E		E	C	I I E
194	----------	I E C	I E C	I E C	I E C	I E C	----------
199		E	C	C			C
203	I I						
205							
222			E			C	
225							I C
228						----------	
232	E		E				
235	C	I	I C	I E C	I E C	I E C	I I E C
239							
248							
288							I
295							
310							
317			E			C	
326		I E C	I C	I E C	I I		C
337							
342	----------	E	E				
343		E	E	C			
S-03		E	E			C	

positivos por:
I - IDGA E- ELISA C- CIE

ANEXO 6. Grupo A. Resultados estudios *post mortem* y bacteriológico.

Arete	Meses *	Hallazgos macroscópicos	Hallazgos histológicos más relevantes	BAAR	Tiempo aislamiento	Órgs. con aislamiento
101	4 meses se recibió muerto	Buen estado de carnes. Nódulo post inmunización en la región del encuentro. Glándula mamaria aumentada de tamaño. Nódulo post inmunización.	Hepatitis granulomatosa severa difusa, por migración parasitaria. Mastitis linfocitaria grave difusa, sugestiva a AEC.	negativo	negativo	negativo
105	3 meses eutanasia	Buen estado de carnes. Ovario izquierdo con absceso de 10 cm de diámetro. Aumento de tamaño de linfonodos mesentéricos.	Lesión paratuberculosis: III c Enteritis granulomatosa grave difusa con células gigantes multinucleadas y serositis grave. Linfadenitis granulomatosa grave.	negativo	negativo	negativo
110	8 meses se recibió muerto	Buen estado de carnes. Peritonitis y septicemia secundarias a cesárea	Serositis necrótica grave.	negativo	negativo	negativo
131	13 meses eutanasia	Regular estado de carnes.	Enteritis no supurativa, asociada a coccidias.	negativo	negativo	negativo
154	11 meses eutanasia	Pésimo estado de carnes. Engrosamiento difuso de la mucosa intestinal.. Aumento de tamaño de linfonodos mesentéricos. Pulmones consolidados, aumentados de tamaño.	Lesión paratuberculosis: III b Enteritis granulomatosa grave difusa. Linfadenitis granulomatosa grave. Hepatitis granulomatosa grave multifocal. Bronconeumonía supurativa grave. Probable Actinomyces spp.	abundantes	6 semanas	IL, LN ½, LNIC
172	1 meses eutanasia	Pésimo estado de carnes. Atrofia serosa de la grasa abdominal y cardiaca. Engrosamiento moderado difuso de la mucosa del ID. Aumento de tamaño de LN con calcificaciones.	Lesión paratuberculosis: III b Enteritis granulomatosa grave difusa y serositis granulomatosa grave multifocal con endolinfangitis granulomatosa. Linfadenitis granulomatosa grave. Hepatitis granulomatosa moderada multifocal.	escasas	14 semanas	VIC, LNIC, LN ant., LN ½, heces.
200	10 meses eutanasia	Mal estado de carnes. Nódulo post inmunización en la región del encuentro.	Lesión paratuberculosis: III b Enteritis granulomatosa grave difusa.	abundantes	8 semanas	VIC, YEY, LN ant.,

		Engrosamiento de la mucosa intestinal con formación de pliegues transversales y dilatación de vasos linfáticos mesentéricos. Aumento de tamaño de linfonodos mesentéricos.	Linfadenitis granulomatosa grave. Hepatitis granulomatosa moderada multifocal.		14 semanas	LN ½, heces. LNIC
267	4 meses se recibió muerto	Mal estado de carnes. Edema subcutáneo e hidroperitoneo. Serosa intestinal de apariencia granular. Mucosa intestinal congestionada. Hígado con focos de color blanco tanto en su superficie como en el parénquima, no mayores a 0.5 cm. Aumento de tamaño de linfonodos mesentéricos.	Lesión paratuberculosis: III b Enteritis granulomatosa grave difusa con serositis granulomatosa. Linfadenitis granulomatosa grave. Hepatitis supurativa focal moderada y esteatosis de gota gruesa.	abundantes	8 semanas	VIC, IL, YEY, LNIC, LN ant.
303	13 meses eutanasia	Regular estado de carnes.	Enteritis no supurativa, asociada a coccidias.	negativo	negativo	negativo
334	13 meses eutanasia	Regular estado de carnes.	Enteritis no supurativa, asociada a coccidias.	negativo	negativo	negativo
S-05	13 meses euta-nasia	Regular estado de carnes. Focos de engrosamiento de la mucosa del intestino delgado. Aumento de tamaño de linfonodos mesentéricos.	Lesión paratuberculosis: III c Enteritis granulomatosa grave difusa con presencia de células gigantes multinucleadas. Linfadenitis granulomatosa grave. Mastitis granulomatosa grave difusa con áreas de necrosis.	negativo	negativo	negativo
S-13	9 meses eutanasia	Mal estado de carnes. Hígado con focos de color blanco tanto en su superficie como en el parénquima, no mayores a 0.5 cm. Aumento de tamaño de linfonodos mesentéricos	Lesión paratuberculosis: II Enteritis granulomatosa moderada multifocal. Linfadenitis granulomatosa moderada multifocal. Hepatitis granulomatosa moderada multifocal.	moderadas	8 semanas	VIC, YEY
S-14	10 meses eutanasia	Regular estado de carnes. Engrosamiento difuso de la mucosa intestinal con dilatación de vasos linfáticos de la serosa y formación de pliegues transversales en la mucosa.	Lesión paratuberculosis: III b Enteritis granulomatosa grave difusa. Linfadenitis granulomatosa grave difusa. Hepatitis granulomatosa grave multifocal.	moderadas	8 semanas	VIC, LNIC,YEY

		Aumento de tamaño de linfonodos mesentéricos. Marcado aumento en articulaciones de los carpos, probable Mycoplasmosis.				
S-15	8 meses se recibió muerto	Buen estado de carnes. Nódulo post inmunización en la región del encuentro.	Pleurobronconeumonía fibrinopurulenta, probable Pasteurelosis.	negativo	negativo	negativo
S-21	10 meses se recibió muerto	Regular estado de carnes. Nódulo post inmunización en la región del encuentro Traumatismo (perihepatitis hemorrágica). Glándula mamaria aumentada de tamaño.	Mastitis necrótica grave difusa con aislamiento de Mycoplasma spp.	negativo	negativo	negativo
S-29	10 meses eutanasia	Regular estado de carnes. Marcado aumento en articulaciones de los carpos, probable Mycoplasmosis. Glándula mamaria aumentada de tamaño. Hígado con discretos focos de color blanco tanto en su superficie como en el parénquima.	Lesión paratuberculosis: I Enteritis granulomatosa discreta multifocal. Hepatitis granulomatosa leve multifocal. Mastitis necrótica grave difusa con aislamiento de Mycoplasma spp.	negativo	negativo	negativo
S-30	4 meses se recibió muerto	Mal estado de carnes. Peritonitis secundaria a ruptura de herida quirúrgica en rumen. Linfonodos mesentéricos aumentados de tamaño.	Lesión paratuberculosis III b Enteritis granulomatosa grave difusa y serositis mixta grave difusa con endolinfangitis granulomatosa. Linfadenitis granulomatosa grave difusa. Hepatitis granulomatosa moderada multifocal. Glomerulonefritis membrano proliferativa moderada global.	abundantes	14 semanas	VIC

* Meses = Número de meses posteriores a la aplicación de la bacterina. También se especifica si el animal se recibió muerto o se autanasió.

BAAR- cantidad de bacilos ácido alcohol resistentes observados en los cortes histológicos

AEC- artritis encefalitis caprina. IL- íleon LN ½- linfonodo mesentérico medio

VIC- válvula ileo cecal LNIC- linfonodo ileo cecal LN post- linfonodo mesentérico posterior

YEY- yeyuno LN ant- linfonodo mesentérico anterior

ANEXO 7. Grupo B. Resultados estudios *post mortem* y bacteriológico.

Núm.	Meses *	Hallazgos macroscópicos	Hallazgos histológicos más relevantes	BAAR	Tiempo aislamiento	Órganos con aislamiento
72	11 meses eutanasia	Pésimo estado de carnes. Ascitis. Engrosamiento segmentario de la mucosa intestinal. Hígado con focos de color blanco tanto en su superficie como en el parénquima, no mayores a 0.5 cm. Linfonodos mesentéricos aumentados de tamaño. Quistes de inclusión en la serosa del útero.	Lesión paratuberculosis: IIIb Enteritis granulomatosa grave difusa. Linfadenitis granulomatosa grave. Hepatitis granulomatosa moderada multifocal. Glomerulonefritis membranosa moderada global y nefritis intersticial no supurativa moderada difusa.	abundantes	9 semanas	VIC, LNIC, LN ant., heces.
92	10 meses se recibió muerto	Buen estado de carnes. Peritonitis secundaria a colangiocarcinoma. Mucosa intestinal congestionada. Glándula mamaria aumentada de tamaño.	Tipo lesión paratuberculosis: II Enteritis granulomatosa grave difusa. Linfadenitis granulomatosa moderada. Mastitis linfoplasmocitaria grave difusa, sugestiva a AEC. Glomerulonefritis membranosa moderada global y nefritis intersticial crónica.	escasas	12 semanas	VIC, YEY
96	13 meses eutanasia	Buen estado de carnes.	Enteritis no supurativa asociada a coccidias.	negativo	negativo	negativo
133	13 meses eutanasia	Pésimo estado de carnes. Atrofia serosa de la grasa abdominal y cardiaca. Engrosamiento grave de la serosa intestinal con dilatación de vasos linfáticos. Engrosamiento grave de la mucosa intestinal con obliteración parcial de su luz. Linfonodos mesentéricos aumentados de tamaño. Glándula mamaria aumentada de tamaño.	Lesión paratuberculosis: IIIb Enteritis y serositis granulomatosa grave difusa. Linfadenitis granulomatosa grave. Hepatitis granulomatosa moderada multifocal. Mastitis linfoplasmocitaria grave difusa, con fibrosis, sugestiva a AEC.	moderadas	14 semanas	VIC, IL, LNIC, LN post.
160	12 meses se recibió muerto	Mal estado de carnes.	Avanzados cambios autolíticos.	negativo	negativo	negativo
170	13 meses eutanasia	Regular estado de carnes. Atrofia serosa de la grasa abdominal y cardiaca.	Enteritis no supurativa asociada a coccidias.	negativo	negativo	negativo

194	10 meses eutanasia	Pésimo estado de carnes. Engrosamiento difuso de la mucosa y serosa intestinales, con dilatación de vasos linfáticos. Linfonodos mesentéricos aumentados de tamaño.	Lesión paratuberculosis: IIIb Enteritis granulomatosa grave difusa y serositis granulomatosa grave multifocal. Linfadenitis granulomatosa grave. Hepatitis granulomatosa moderada multifocal.	moderadas	8 semanas 14 semanas	IL, YEY VIC, LNIC, LN ant., heces.
203	12 meses se recibió muerto	Buen estado de carnes.	Choque neurogénico por traumatismo.	negativo	negativo	negativo
232	13 meses eutanasia	Buen estado de carnes.	Enteritis no supurativa asociada a coccidias.	negativo	negativo	negativo
235	10 meses eutanasia	Regular estado de carnes. Engrosamiento de la mucosa intestinal con formación de pliegues. Linfonodos mesentéricos aumentados de tamaño y con calcificaciones.	Lesión paratuberculosis: IIIb Enteritis granulomatosa grave difusa. Serositis y endolinfangitis granulomatosa grave. Linfadenitis granulomatosa grave. Hepatitis granulomatosa moderada multifocal.	escasas	14 semanas	IL, LN ant., LN post.

* Meses = Número de meses posteriores a la aplicación de la bacterina. También se especifica si el animal se recibió muerto o se autanasió.

BAAR- cantidad de bacilos ácido alcohol resistentes observados en los cortes histológicos

AEC- artritis encefalitis caprina.
VIC- válvula íleo cecal
YEY- yeyuno
IL- íleon
LNIC- linfonodo ileo cecal
LN ant- linfonodo mesentérico anterior
LN ½- linfonodo mesentérico medio
LN post- linfonodo mesentérico posterior