

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"**

UNIDAD LAGUNA

DIVISION REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**EVALUACIÓN HISTOPATOLÓGICA DE UNA BACTERINA Y DE UN
INÓCULO DE *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* EN
CABRITOS A PARTIR DE MACERADO DE MUCOSA INTESTINAL
DE BOVINOS CON PARATUBERCULOSIS CLÍNICA.**

PRESENTADO POR:

PABLO HERNÁNDEZ CALOCH

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISISTO PARCIAL PARA
OBTENER EL TÍTULO DE:**

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAH. NOVIEMBRE. 2001.

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"**

UNIDAD LAGUNA

DIVISION REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

ASESOR:

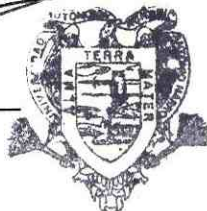
Ramón A. Delgado G.

MVZ MC. RAMÓN A. DELGADO GONZÁLEZ

COORDINADOR REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

Jorge Iturbide Ramirez

MVZ JORGE ITURBIDE RAMIREZ



Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal
UAAAN - UL

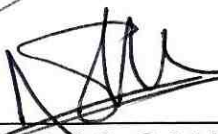
TORREÓN, COAH., NOV. 2001.

TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL TITULO DE :

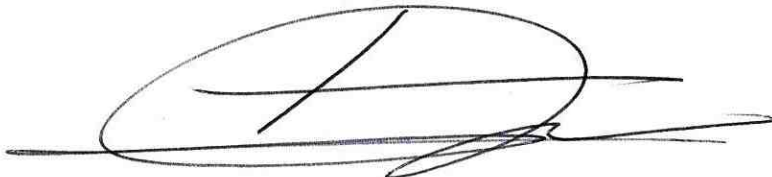
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA



MVZ MC. RAMÓN DELGADO GONZÁLEZ
PRESIDENTE



MVZ FRANCISCO SANDOVAL ELIAS
VOCAL



MVZ HECTOR VILLANUEVA HERNANDEZ
VOCAL



MVZ EP Ma. HORTENSIA CEPEDA ELIZALDE
VOCAL SUPLENTE

TORREÓN, COAH., NOV. 2001.

AGRADECIMIENTOS

A TI SENOR QUE AUN
ESTANDO LEJOS DE TI,
SE QUE NUNCA ESTUVE
SOLO.

A MIS PADRES POR
TODO EL ESFUERZO
REALIZADO DURANTE
ESTOS AÑOS DE
ESTUDIO, POR SU AMOR,
POR SU APOYO, POR SUS
ESPUERZOS; GRACIAS.

A MIS HERMANOS QUE
DE ALGUNA MANERA
CONTRIBUYERON A MI
FORMACIÓN.

A MI ESPOSA POR SU
AYUDA, PACIENCIA Y
COMPRENSIÓN

A MI AMIGO Y ASESOR
POR COMPARTIR SUS
CONOCIMIENTOS ASI
COMO POR SU VALIOSA
AYUDA, GRACIAS.

A MI ESCUELA QUE ME
ALBERGO DURANTE
ESTOS AÑOS
PROPORCINANDOME
LAS HERRAMIENTAS
PARA ENFRENTAR LA
VIDA

AL SR. PEDRO ALBERTO
ZERMEÑO PEREZ POR SU
VALIOSA APORTACIÓN
PARA LA
CONSTRUCCIÓN DE LOS
CORRALES UTILIZADOS
EN ESTE TRABAJO.

A MIS MAESTROS,
DESDE QUIENES ME
ENSEÑARON A ESCRIBIR
HASTA LOS QUE ME
ENSEÑASÓN LOS
CONOCIMIENTOS
TECNICOS DE LA
CARRERA.

A LAS FAMILIAS QUE
DESINTERESADAMENTE
ME AYUDARON DURANTE
MI ESTANCIA EN LA
LAGUNA.

A LOS COMPAÑEROS
QUE ME APOYARON
DURANTE EL TRABAJO
DE CAMPO.

GRACIAS A TODOS Y
CADA UNO QUE DE
ALGUN MODO
CONTRIBUYENRON A MI
FORMACIÓN.

CONTENIDO

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. HISTORIA	3
4. DEFINICIÓN	4
5. AGENTE ETIOLÓGICO	4
6. PATOGENIA	5
7. LESIONES MACROSCÓPICAS	6
8. LESIONES MICROSCÓPICAS	8
9. INMUNOLOGÍA	9
9.1. Placas de Peyer.....	10
9.2. Macrófago	11
9.3. Linfocitos	12
10. EPIDEMIOLOGÍA	13
11. HALLAZGOS CLÍNICOS	14
12. DIAGNÓSTICO	16
12.1. Pruebas Rápidas.....	17
12.2. Pruebas Serológicas	18
12.3. Inmunodifusión en gel agarosa (AGID)	19
12.4. Prueba del interferón γ	19
12.5. Cultivo Bacteriológico.....	20
12.6. Prueba Genética	21
13. CONTROL	21

14. VACUNACIÓN.....	23
15. TRATAMIENTO	25
16. RELACIÓN CON LA ENFERMEDAD DE CROHN	26
17. JUSTIFICACIÓN	27
18. OBJETIVO.....	28
19. MATERIAL Y MÉTODOS	29
20. RESULTADOS	31
21. DISCUSIÓN	35
22. CONCLUSIONES	36
23. LITERATURA CITADA	35

1. RESUMEN

Las lesiones histológicas de paratuberculosis inducidas por el bacilo de *Mycobacterium avium* subesp. *Paratuberculosis* en bovinos son muy constantes y evidentes, sin embargo en cabras difieren de las lesiones clásicas en bovinos, en el presente trabajo se evalúan diferentes grupos (vacunados e inoculados, vacunado no inoculados, no vacunados e inoculados, no vacunados no inoculados), para determinar el grado de lesión en base a infiltrado celulares principalmente en yeyuno, ileon, válvula ileocecal, y linfonodos mesentéricos.

También se evalúa la eficacia de la vacuna, desafiándola con el inoculo realizado a partir de macerado intestinal de bovinos con paratuberculosis.

Los resultados indican que el inoculo puede inducir respuestas variables, desde una infiltración leve, hasta una infiltración severa en algunos animales, estas infiltraciones tiende a incrementar como pasa el tiempo, pero este incremento no se aprecia en los animales que fueron vacunados, en los que la infiltración fue constante en todos los animales; con lo que se concluye que la vacuna si protege ya que esta induce una respuesta celular constante.

2. INTRODUCCIÓN

La paratuberculosis o enfermedad de Johne es una enfermedad crónica causada por *Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis* la cual es caracterizada clínicamente por una enteritis granulomatosa en bovinos asociada a una pérdida progresiva de peso. Esta enfermedad afecta a una gran mayoría de animales domésticos, así como a animales silvestres de todas las edades.

El agente causal es un bacilo Gram +, alcohol acidorresistente, capaz de sobrevivir en ambientes extremos por largos periodos de tiempo, teniendo mayor importancia económica en el ganado bovino, ya que es la causa de grandes pérdidas considerables debido a que todos los animales tienen las mismas posibilidades de enfermarse cuando existe en el hato un animal enfermo (Collins, 1996). Otro de los puntos importantes económicamente es que el animal infectado no presenta signos clínicos en el inicio de la infección sino varios meses o años posteriores a la infección. La vía de infección de este bacilo es necesariamente oral.

Las investigaciones en México son relativamente pocas con relación a esta enfermedad y en comparación con otras enfermedades, probablemente se debe a que se han realizado en grandes especies lo cual es muy costoso aunado al valor económico de los paquetes de diagnóstico.

La finalidad de la presente tesis es conocer la reacción patológica de la paratuberculosis en cabritos inoculados con *Map* a partir de intestinos de bovinos clínicamente enfermos de paratuberculosis evaluando el comportamiento histopatológico.

3. HISTORIA

El bacilo de *M. paratuberculosis* fue inicialmente descrito por Johne y Fronthingham en 1895 como la causa de una enfermedad inflamatoria en el intestino de una vaca en Alemania (Hermor *et al.*, 1998) hasta ese tiempo se creía que estos gérmenes eran bacilos tuberculosos aviarios o bovino que se habían modificado de algún modo y producían infección intestinal (Merchant y Pocker 1965), pero aun sin identificarlo como *M. paratuberculosis*. Sin embargo no fue sino hasta 1906 que Bang admitió que la infección era diferente de la tuberculosis, proponiendo el nombre de paratuberculosis; fue entonces que se le denominó enfermedad de Johne o paratuberculosis y aunque el término paratuberculosis sugiere una relación íntima con la tuberculosis en realidad son muy diferentes (Hermor *et al.*, 1998). Esta especie fue inicialmente denominada *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis*, literalmente "bastoncillo fungoide de la enteritis crónica pseudo tuberculosa de los bovinos" y aunque su nombre era extraordinariamente ilustrativo de las propiedades hasta entonces reconocidas, su complejidad y la observación de que también afectaba a otras especies condujeron a que muy pronto se propusieran otros nombres más simples, tales como, *M. Paratuberculosis* y *M. Johnei* estos nombres subsistieron hasta hace muy poco pese a que había más tendencia mundial a utilizar el primero, que se fue consolidando en la década de los 80^s. La revisión del complejo *M. Avium-paratuberculosis*, en 1990, consagró oficialmente el carácter de subespecie actualmente aceptado como *Mycobacterium avium subsp paratuberculosis* que en forma abreviada se conoce como *Map* (Juste *et al.*, 2000). Se ha postulado que la

bacteria localizada dentro de los fagocitos bovinos puede tener un incremento en la resistencia al calor, muchos estudios han encontrado que la pasteurización es menos efectiva contra patógenos intracelulares (Hope *et al.*, 1997).

4. DEFINICIÓN

La paratuberculosis es una enfermedad causada por *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (*Map*), la cual se caracteriza por una enteritis granulomatosa y se produce una diarrea crónica y una emaciación progresiva (Momotani *et al.*, 1988; Gay and Sherman 1992; Williams, 1983), que afecta principalmente a los rumiantes domésticos, así como a una gran variedad de mamíferos incluyendo primates salvajes, roedores y es considerada una zoonosis potencial; ya que estudios actuales con la PCR han identificado al bacilo de *Map* como la causa de la enteritis crónica en humanos o “Enfermedad de Crohn” (Blood, 1992; Hermor *et al.*, 1998; Sung and Collins 1997; Millar *et al.*, 1996).

5. AGENTE ETIOLÓGICO

La paratuberculosis es causada por *Mycobacterium avium subsp paratuberculosis* el cual es un bacilo Gram.+ pero debido a la elevada cantidad de lípidos que contiene difícilmente se tiñe con el método de Gram. , es alcohol acidorresistente, aeróbio obligado, patógeno intracelular facultativo (Hirsh, 1990), con características de crecimiento especiales las cuales son: que a diferencia de los demás representantes del genero *Mycobacterium*, la micobacteria de paratuberculosis necesita de un factor de crecimiento, un sideróforo, la micobactina (Hirsh, 1990).

Su crecimiento es lento y requiere de 8 a 12 semanas de incubación a 37 °C la baja velocidad de crecimiento de las micobacterias, aunque sin ser extrema en el mundo bacteriológico, supone un desafío que no se ha podido explicar satisfactoriamente. En realidad el dinamismo de crecimiento de las micobacterias es similar a la de otras bacterias, sólo que a escala más prolongada, mientras el tiempo para la *E. coli* es de 20 min. los mejores registros de *Map* no pasan de 8 horas. Esto implica que las micobacterias, y *Map* sería el caso extremo de ellos, viven a un ritmo mucho más lento que cualquier otra especie bacteriana (Juste *et al.*, 2000).

La gruesa capa cérica les permite soportar las condiciones físico químicas más allá de las que soportaría cualquier otra especie, además de proporcionarle un estado de letargo y la posibilidad de reiniciar su metabolismo cuando las condiciones se hacen más favorables (Juste *et al.*, 2000)

6. PATOGENIA

La vía natural de entrada es la oral y la localización primaria es el tejido linfoide. Tras su ingestión, el microorganismo se encuentra en el interior de los macrófagos por fagocitosis en la submucosa de la porción ileocecal y en los ganglios linfáticos próximos (íleocecales) (Hirsh, 1990; Momotani *et al.*, 1988; Clarke, 1997). Los macrófagos son claramente importantes en el transporte de bacterias de la superficie del epitelio al interior de las placas de Peyer. Los bacilos se encuentran en las células epiteliales en las 20 horas postinoculación experimental y en 5 – 20 horas en los macrófagos subepiteliales después de la inoculación (Momotani *et al.*, 1988). La colonización fuera del intestino indica la

existencia de una fase de diseminación hematogena, no obstante se desconoce si la diseminación es inmediatamente después de la infección o más tarde (Hirsh, 1990; Williams, 1983). También se ha llevado a cabo la infección experimental en cabritos y corderos empleando varias vías de inoculación en los cuales se comprobó que la vía oral como la endovenosa desarrollan las lesiones características de la paratuberculosis, no obstante esta misma vía, lleva consigo la presencia de *Map* en numerosos órganos y tejidos principalmente en aquellos con abundante riego sanguíneo como el bazo, hígado, pulmón, riñón, en cuyos órganos el bacilo actúa a modo de cuerpo extraño (García *et al.*, 2000). La infección con *Map* puede ser eliminada en las primeras semanas después de la exposición o el animal puede albergar al organismo y seguir infectadas subclínicamente por años. La atrofia muscular típica de *Map* resulta de la mala absorción y pérdida de proteína que ocurre de manera consecuente como las lesiones intestinales progresan (Hietala, 1992)

7. LESIONES MACROSCOPICAS

Se han descrito una serie de lesiones en las diferentes especies animales afectadas por *Map*, siendo los hallazgos más importantes en bovinos la enteritis crónica, linfangitis intestinal crónica y linfadenopatía mesentérica (Clarke, 1996).

En cabras domésticas la paratuberculosis usualmente es caracterizada por ligeros cambios macroscópicos; los intestinos raramente están marcadamente inflamados y los linfonódulos usualmente están agrandados de una forma ligera a moderada y frecuentemente contienen focos necróticos, sin embargo la característica de la paratuberculosis bovina es el desarrollo de granulomas con

Los alcohol ácido resistentes (BAAR) en la mucosa intestinal y linfonódulos mesentéricos (Hamilton *et al.*, 1991) la necrosis focal y mineralización, son raras en bovinos y generalmente están asociadas a la paratuberculosis ovina y caprina.

Los microgranulomas ocurren en un número significativo de todas las especies clínicamente afectadas (Williams *et al.*, 1983). En los casos más graves de la enfermedad llega a apreciarse una marcada atrofia serosa de la grasa situada en los surcos coronarios y en la pelvis renal donde se ha sustituido por un tejido de aspecto gelatinoso (Pérez *et al.*, 2000). Diferentes autores han clasificado las lesiones en cabras Navarro *et al.* (1998), las clasificaron en tres tipos, el tipo I: macroscópicamente no se observan lesiones en intestino delgado y los linfonódulos están ligeramente inflamados, En las lesiones del tipo II macroscópicamente la mucosa intestinal de las cabras esta inflamada desde la mitad del yeyuno hasta la válvula ileocecal, y los linfonódulos mesentéricos están inflamados y edematosos (Navarro *et al.* 1998),.

En las lesiones del tipo III se agrupan las siguientes: clínicamente las cabras están emaciadas y muestran atrofia de los depósitos grasos, principalmente del surco coronario, mesenterio y pelvis renal. La serosa intestinal se observa edematosa con inflamación prominente de los vasos linfáticos, la mucosa intestinal está inflamada, con prominentes pliegues o arrugas a partir de la mitad del yeyuno hasta el íleon, los linfonódulos mesentéricos e íleocecales están inflamados y edematizados y al incidirlos estos muestran un exudado claro (Navarro *et al.*, 1998; Clarke, 1997, Williams *et al.*, 1983). Se ha observado una alta incidencia de arteriosclerosis en casos avanzados de la enfermedad de

Johne, con evidente correlación entre las lesiones vasculares y los cambios macroscópicos en el intestino (Blood, 1992). Otras lesiones observadas en un número de animales se incluyen la alopecia y calcificación endocardial y aortica (Clarke, 1996; Enríquez *et al.*, 2000).

8. LESIONES MICROSCÓPICAS

La necrosis focal y mineralización, es rara en bovinos y esta generalmente asociado a la inflamación granulomatosa en la paratuberculosis ovina y caprina (Williams, 1983). La característica microscópica de la paratuberculosis en bovinos es el desarrollo de granulomas con BAAR en la mucosa intestinal y linfonodos (Hamilton *et al.*, 1991).

Las lesiones microscópicas del tipo I descrito por Navarro *et al.* (1998) también llamado forma tuberculoide o paucibacilar se caracterizan por la presencia de un pequeño granuloma con macrófagos que contienen pocos bacilos, sin cambios significativos en el número y distribución de los diferentes subgrupos de linfocitos T, pero los linfocitos TCD4 representan el subgrupo predominante asociado con el granuloma (Navarro *et al.*, 1998), los granulomas están compuestos de macrófagos modificados, células epitelioides, y células gigantes, muchas de las cuales contienen numerosos BAAR (Hamilton *et al.*, 1991) otro hallazgo histopatológico es que en la lamina propia del ileón se encuentran macrófagos dispersos que contienen una pequeña cantidad de BAAR, además los macrófagos se encuentra envueltos por un exudado linfocítico (Navarro *et al.*, 1998; Carrigan y Seaman 1990).

En las lesiones del tipo II microscópicamente se observa un infiltrado celular epitelioides difuso que contiene muchos BAAR , aunado a esto en las vellosidades del íleon y la válvula ileocecal, las células epitelioides forman una placa con un patrón de mosaico que distiende la lamina propia y después se distribuye en la submucosa (Navarro *et al.*, 1998). Los linfonodos presentan células epitelioides dispersas o formando un pequeño granuloma en el área ínter folicular y paracortical; estos contienen una cantidad baja de BAAR (Navarro *et al.*, 1998). Los microgranulomas ocurren en un número significativo de animales clínicamente afectados de todas las especies (Williams, 1983).

Los Hallazgos microscópicos del tipo III incluyen los siguientes: la lamina propia de la parte media del yeyuno y ciego esta distendida por placas de células epitelioides que contienen grandes cantidades de BAAR. La submucosa muestra pequeños agregados de células epitelioides y macrófagos dispersos conteniendo un moderado número de BAAR rodeados por un gran número de linfocitos. Este infiltrado celular invade las placas de Peyer y vasos apareciendo dilatados y conteniendo macrófagos con BAAR. En los linfonódulos mesentéricos se observan numerosas células epitelioides tanto en corteza como en la médula con un gran numero de BAAR (Navarro *et al.*, 1998).

9. INMUNOLOGIA

La respuesta inmune de los animales infectados con *Map* pueden comportarse de manera paradójica dependiendo del estado de enfermedad. Las infecciones de paratuberculosis pueden ser caracterizados por una respuesta mediada por células, una respuesta humoral, ambas o ninguna (anergia). En las

primeras fases de la infección, predomina una respuesta mediada por células con proliferación y diferenciación de células T. De este modo conforme la enfermedad avanza hasta un estado mayor, primero hay una respuesta mediada por células, y esta declina hasta un momento en que es mayor la respuesta humoral (Sweeney *et al.*, 1998).

En el estado final de la enfermedad no se detecta una respuesta humoral o celular y se desarrolla un estado de anergia (Stabel, 1996). De acuerdo con lo anterior la micobacteria puede estimular la producción de citocinas pero esta es refractaria a muchos mecanismos intracelulares de destrucción. La persistencia de altas cantidades de *Map* puede estimular la producción continua de citocinas pro-inflamatorias, dando lugar a un estado de enteritis crónica y la enfermedad clínica (Alzuherri *et al.*, 1996).

Para entender los procesos de la respuesta inmune contra la paratuberculosis se realizara una breve descripción de las células y tejidos implicados.

La respuesta inmune gastrointestinal es controlada por tejido linfoide asociado al intestino GALT, el cual incluye a los agregados linfoides especializados llamados placas de Peyer (PP) y folículos linfoides localizados fuera del intestino llamados linfonodos (LN) (Chiodini, 1996).

8.1. Placas de Peyer

Las placas de Peyer consisten en tejidos linfoides relativamente organizados, y poseen todos los componentes que se requieren para crear una respuesta inmunitaria (células T, células cooperadoras, células B, macrófagos)

(Tizard, 1995). Una de las funciones de las PP es modular la respuesta inmune contra una gran cantidad de antígenos que se encuentran en la superficie digestiva, esto incluye el desarrollo de tolerancia inmunológica de algunos de estos, se puede asumir de esta manera que las PP son un medio ambiente especial en el cual existe un delicado balance entre señales estimuladoras e inhibitorias (Juste *et al.*, 1994; Chiodini 1996).

Las placas de Peyer están cubiertas por un epitelio rico en linfocitos y por un tipo de células epiteliales especializadas que se conocen como células M (Momotani *et al.*, 1988; Tizard 1995). La superficie epitelial del ileon bovino está caracterizado por una marcada población uniforme de células M y se encuentra en contraste con el yeyuno anterior y la superficie epitelial en otras especies animales, incluyendo roedores y el hombre (Momotani *et al.*, 1988), Un ternero neonato tiene normalmente aproximadamente 100 placas de Peyer, y ellas recubren hasta el 50% de la superficie del ileon. Las placas de Peyer son funcionalmente heterógenas. En los corderos algunas aumentan de tamaño desde el momento de su nacimiento hasta los seis meses y después sufren una regresión dejando solo una pequeña cicatriz (Tizard, 1995)

8.2. Macrófago

El macrófago es una célula multifuncional esencial para la inmunidad contra patógenos y liberación de niveles fisiológicos de citocinas, estas son de varios subtipos y formas indiferenciadas a) monocitos circulantes que pueden entrar en los sitios de inflamación, b) macrófagos fijos como los macrófagos alveolares, macrófagos intravasculares, células de Kupffer, etc. c) macrófagos

epitelioides y multinucleados hallados en las inflamaciones crónicas (Ackerman *et al.*, 1994). Los macrófagos son el objetivo celular de la infección, de este modo tiene un papel principal en la entrada de microorganismos, y la presentación de antígenos al sistema inmune (Alzuherri *et al.*, 1997). En base a lo anterior los macrófagos tienen un papel principal en la destrucción de micobacterias, procesamiento y presentación de antígenos, y dirigiendo procesos inflamatorios e inmunes (Alzuherri *et al.*, 1996), estos mecanismos están fuertemente influenciados por citocinas de macrófagos tales como factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interleucina - 1B (IL-1B), IL-6, Factor estimulador de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF), factor de transformación de crecimiento- β (TGF- β) (Alzuherri *et al.*, 1997)

8.3. Linfocitos

Otro tipo de células importante en el desarrollo de la inmunidad frente a *Map* es el de los linfocitos T o B; ya que la inmunidad contra todas las micobacteriosis es dependiente de respuestas mediadas por células (Tizard, 1995; Alzuherri *et al.*, 1997). Los factores de inmunidad humoral tienen poco o nulo valor de protección, por lo tanto desarrollo de inmunidad contra microorganismos intracelulares facultativos en general involucra a la acción cooperadora de linfocitos T como inductores específicos y macrófagos como efectores inespecíficos (Tizard, 1995; Chiodini, 1996).

Los linfocitos T agrupan y ensamblan a los fagocitos mononucleares para la formación de un granuloma y activan a los macrófagos para incrementar la actividad bactericida. Estas interacciones celulares son controladas por

mediadores solubles o señales comúnmente conocidas como interleucinas, linfocinas, y/o citocinas (Chiodini, 1996).

El éxito de la respuesta inmune contra agentes infecciosos es principalmente determinada por citocinas producidas localmente por células inmunes, las diferentes subpoblaciones de linfocitos T y fagocitos mononucleares están interconectados para formar un circuito regulatorio que determina la calidad, tamaño, y duración de la respuesta inmune. Las células T cooperadoras pueden ser divididas en al menos 2 poblaciones basadas en su papel funcional y perfil de linfocinas (Chiodini, 1996). En cabras con lesiones II o III un descenso en el número de linfocitos T CD4 y un incremento de linfocitos TCD4 son observadas en mucosa intestinal y área cortical de linfonódulos mesentéricos (Tizard, 1995)

10.EPIDEMIOLOGÍA

La enfermedad ocurre en todo el mundo y la prevalencia parece ir en aumento en algunos países. Es más frecuente y en menor grado en ovinos y caprinos. La incidencia es mayor en aquellos animales criados de forma intensiva bajo condiciones climáticas y de manejo que conduzcan a la propagación de la enfermedad. En Dinamarca Nielsen y Agger (2000) reportan un promedio de prevalencia real del 4.6 - 12.6 este trabajo es apoyado por otro trabajo realizado en Dinamarca en el cual Jakobsen *et al.* (2000) reportan un 8.8 en vacas lactando, lo que indica una prevalencia casi exacta de la paratuberculosis en Dinamarca. Sin embargo en EU justamente en el estado de Michigan se reporta un 41.8%, que además al ajustarlo es de 59.9% (Johnson *et al.*, 2000). En un estudio de animales sacrificados se ha reportado prevalencia de 1.6 % nacional en EU, otras

prevalencias estatales son: 7.2% en Pensilvania, 18% en Nueva Inglaterra, 9% en California y 10.8% en Wisconsin (Hutchinson, 1996). Así mismo en Nueva Zelanda se reporta un rango que va de 5 a 20% en la prevalencia en bovinos (Fouad *et al.*, 1997). Además de EU y Nueva Zelanda en Inglaterra se registra el 1% de prevalencia con aproximadamente 2% de prevalencia de los hatos afectados. En México se carece de información epidemiológica a cerca de esta enfermedad, sin embargo en la laguna se estima aproximadamente un 8% en cabras criollas^Ω

11. HALLAZGOS CLÍNICOS

Los signos clínicos de la PTB difieren en las distintas especies de animales domésticos, así como en el estado de la enfermedad en una misma especie. Sin embargo se consideran signos cardinales la diarrea crónica progresiva en bovinos y la pérdida progresiva de peso en la mayoría de las especies domésticas. La enfermedad se puede acelerar por el parto, lactación u otro estrés (Clarke, 1997)

En bovinos no se observan signos clínicos antes de los 2 años de edad y son más frecuentes en los animales de entre 2 y 6 años (Blood, 1992; Pérez *et al.*, 2000). Esta edad es paralela a la segunda lactación en ganado lechero, uno de los primeros signos es el descenso de la producción Láctea. Las manifestaciones clínicas en esta edad incluyen: la diarrea, en los inicios esta puede ser intermitente pero con el tiempo llega a ser más prolongada causando la muerte después de un curso de semanas o meses (Benazzi *et al.*, 1995; Scalan, 1988; Gay and Sherman 1992). Las heces diarreicas son típicamente homogéneas, sin moco o sangre, sin embargo la diarrea no es un hallazgo común en la paratuberculosis ovina y

^Ω Centro De Análisis E Investigaciones Pecuarias De La Laguna (CAIPEL)

caprina (Clarke, 1997; Dercksen *et al.*, 1998). La posible explicación de que no haya diarrea en los pequeños rumiantes es que tienen diferentes vías por las cuales el agua se absorbe del colon (Dercksen *et al.*, 1998). Puede ser que la diarrea se deba a una respuesta inmune de hipersensibilidad no muy conocida y que se inicia por factores estresantes como el parto (Dercksen *et al.*, 1998; Gay and Sherman, 1992). La diarrea tiene tendencia marcada a mejorar al final de la gestación pero reaparece agravada después del parto (Blood *et al.*, 1992). La pérdida de peso en rumiantes es una consecuencia de mal absorción proteica debida a una gran infiltración celular o edema en el intestino. Una causa que contribuye a la pérdida de peso puede deberse a la elevada concentración de factor de necrosis tumoral alfa, el cual incrementa el catabolismo celular (Clarke, 1997). Debido a la enteropatía y al balance energético negativo y sin ser un signo muy persistente puede haber un incremento de los días abiertos en infecciones subclínicas de *Map* lo que da como resultado en explotaciones intensivas una eliminación temprana de vacas por problemas reproductivos (Johnson *et al.*, 2000). Un cuadro clínico sugestivo es presentado como sugestivo de paratuberculosis en un hato

Tabla 1. Signos que lleva a una explotación a ser considerada como sospechosa de padecer paratuberculosis

- Animales adultos con pérdida de producción Láctea, sin causa aparente, y de condición corporal
- Diarreas, siempre posteriores a la pérdida de condición corporal
- Agravamiento o inicio de estos signos durante la lactación, a partir de las primeras semanas de la misma
- Presentación de animales afectados en forma de goteo, a lo largo de todo el año

- Concentración de casos de vacas de 1ª. Y 2ª. Lactación.
- Incremento del numero de animales con signos clínicos en cambios de estación (invierno – primavera y otoño - invierno), de alimentación (cambios de ración o de pastos), así como cuando se intensifica o se presiona la ración alimenticia para incrementar la producción.

(Pérez *et al.*, 2000)

Los individuos infectados de forma subclínica no suelen presentar las manifestaciones clínicas ya señaladas. En ellos la paratuberculosis se puede sospechar por las alteraciones no relacionadas directamente con los órganos lesionados en esta infección, sino reflejadas en diferentes índices productivos, como serian los trastornos de carácter reproductivo con una notable disminución de la fertilidad sin otras causas aparentes, un incremento en la mastitis y un descenso en la producción lechera (Pérez *et al.*, 2000). La producción lechera desciende hasta en un 4% en el periodo de la fase subclínica (Nordlund *et al.*, 1996). De esta manera se asume que el incremento en los días abiertos es un indicador de que quizás la expresión del estro se ha reducido o un incremento en el periodo de anestro posparto ocurre en un animal positivo (por ELISA), ambos debidos en gran parte a un balance energético negativo secundario por la infección con *Map* de manera subclínica (Jhonson *et al.*, 2000).

12. DIAGNÓSTICO

Para el diagnostico de la paratuberculosis se han creado una variedad de pruebas tanto serológicas como genéticas, sin olvidar las pruebas inmunológicas en el animal infectado.

Un concepto equivocado es que no existe una prueba diagnostica precisa para la detección de la paratuberculosis. Sin embargo existen 8 pruebas de uso

común para la detección de *Map*, tres métodos para la detección del microorganismo, cuatro técnicas para la detección de anticuerpos en suero y una prueba para la reacción de la respuesta inmune mediada por células contra *Map*. De este modo 5 de estas pruebas generalmente están disponibles como pruebas completas o componentes de una prueba (Collins, 1996).

Virtualmente todas las pruebas disponibles tienen un rango de falsos positivos menor de al menos 1.0% (Collins, 1996). En general la selección y valor diagnóstico de la prueba de laboratorio está determinada por la sensibilidad y especificidad. La sensibilidad es una medida de la habilidad de una prueba para identificar animales infectados con un resultado positivo, y la especificidad es la medida de una prueba para identificar animales no infectados con un resultado negativo. Como regla general hay un balance entre sensibilidad y especificidad, y este es un punto en el cual cuando un parámetro se incrementa el otro disminuye (Hietala, 1992). Sin embargo la sensibilidad y especificidad varían considerablemente de acuerdo al estado de la infección con *Map* en animales individuales y la prevalencia de la infección en los hatos (Collins, 1996).

11.1. Pruebas Rápidas

Existen pruebas rápidas para diagnosticar la paratuberculosis, cuando se sospecha de esta en los cuales se incluyen el examen de frotis directo de heces, raspados de linfonodos o mucosa rectal. El examen directo de heces se realiza con la tinción previa por el método de Ziehl – Neelsen, en los cuales se puede observar los bacilos alcohol-ácido resistentes. También son de utilidad las improntas de ganglios linfáticos, los frotis de raspados rectales o intestinales (Blood, 1992; Hirsh, 1990). Sin embargo el examen de raspado de linfonodos

puede ser un factor de confusión al observar los bacilos ya que los bacilos de *M. tuberculosis*, también pueden estar presentes, pero la confirmación de la presencia de bacilos en los frotis de mucosa intestinal y la historia clínica se confirma el diagnóstico de paratuberculosis. La biopsia de mucosa rectal no brinda grandes ventajas si se compara con los frotis fecales ya que probablemente sólo en etapas clínicas tardías es invadida la mucosa rectal (Blood, 1992).

11.2. Pruebas Serológicas

La patobiología de la PTB a veces limita la habilidad de las pruebas serológicas para la detección de anticuerpos en los primeros estadios de la infección con *Map* (Collins, 1996). En animales infectados con *Map*, el nivel de respuesta humoral (producción de anticuerpos específicos) correlacionada con la eliminación fecal del organismo, con un gran número de bacterias en las heces correspondiendo con una incidencia alta de resultados serológicos positivos (Hietala, 1992; Collins, 1996). Las pruebas de uso común son la prueba de fijación complemento, ELISA, Inmunodifusión en gel agarosa. La prueba de fijación de complemento mide anticuerpos que se desarrollan durante la enfermedad, de esta manera los anticuerpos pueden solo ser detectados de manera intermitentemente. La prueba de fijación complemento no es considerada de uso común en pequeños rumiantes, principalmente porque los animales son expuestos a una gran variedad de reacciones cruzadas con corinebacterias y micobacterias relacionadas (Hietala, 1992).

La prueba de ELISA se considera que tiene el mejor balance de sensibilidad y especificidad de las pruebas actualmente disponibles para el diagnóstico de PTB. La prueba de ELISA proporciona más confiabilidad que AGID y FC, en

animales con infección subclínica principalmente porque es capaz de detectar anticuerpos específicos de *Map* en los inicios de la enfermedad (Garrido *et al.*, 2000). Hay varias modificaciones de la prueba de ELISA disponibles para detectar anticuerpos de *Map*. Las diferencias básicas a cerca de las pruebas son el antígeno utilizado, y el tratamiento de la muestra antes de la prueba para remover los anticuerpos inespecíficos y así evitar las reacciones cruzadas con otras micobacterias.

11.3. Inmunodifusión en gel agarosa (AGID)

Es una técnica rápida y barata, cuyo uso se ha generalizado en los últimos años. Su principal ventaja es que proporciona valores cercanos al 100%, por lo que un resultado positivo permite confirmar con una elevada probabilidad la infección por *Map* (Garrido *et al.*, 2000; Shulaw *et al.*, 1993). La prueba de AGID detecta anticuerpos entre los tres y nueve meses después de la eliminación de los microorganismos en animales con *Map*. La sensibilidad para animales con la enfermedad subclínica es cercano al 50% pero la sensibilidad desciende a 27-29 % para animales con infección subclínica, con lo que se concluye que tiene valores variables en cuanto a sensibilidad (Garrido *et al.*, 2000; Hietala 1992) pero proporciona especificidad próxima al 100% que la hace muy conveniente para la confirmación rápida de casos sospechosos (Garrido *et al.*, 2000)

11.4. Prueba del interferón γ

Esta técnica se basa en el fundamento de la liberación de una citocina, interferón γ , que se produce tras la estimulación antigénica de los linfocitos T fundamentalmente linfocitos del tipo CD4+, además de los CD8+, las células

asesinas naturales (Garrido *et al.*, 2000; Stabel, 1996). El interferón γ es responsable de la liberación de intermediarios de nitrógeno y oxígeno, la expresión de los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad clase II y secreción de metabolitos del ácido araquidónico. De este modo esta es una distintiva entre IFN- γ y la activación de macrófagos y su subsecuente habilidad para destruir patógenos intracelulares (Stabel, 1996). La cuantificación del IFN- γ se realiza mediante un ensayo biológico o mediante ELISA. La producción del IFN- γ por parte de los linfocitos varía dependiendo del estado en que se encuentre el animal. Así en las fases preclínicas se alcanzan tasas mucho mayores que las que se observaron en animales con sintomatología clínica, lo cual indicaría una utilidad potencial de esta técnica en la detección precoz de animales infectados (Garrido *et al.*, 2000)

11.5. Cultivo Bacteriológico

El cultivo bacteriológico en medios selectivos es una de las pruebas de laboratorio más común para confirmar los casos sospechosos de PTB, pero el procedimiento requiere cuando menos de 4 a 16 semanas para que el microorganismo se desarrolle (Hietala, 1992; Whittington *et al.*, 1999). El cultivo de *Map* ofrece muchas ventajas sobre otras pruebas para la confirmación de PTB.

Esta es una prueba definitiva. Recientemente se ha encontrado que es posible el cultivo a partir de heces o tejido (Whittington *et al.*, 1999). El cultivo de tejidos intestinales es más sensible que el cultivo de heces, porque las heces de algunos ovinos con infección con *Map* de tipo paucibacilar dan resultado negativo. Sin embargo para algunos ovinos en los que están ausentes las evidencias de

PTB en tejidos, pero en heces también dan resultado positivo al cultivo (Whittington *et al.*, 1999).

11.6. Prueba Genética

El descubrimiento de la secuencia de inserción IS900, y su caracterización como específica de *Map*, ha proporcionado una excelente herramienta de identificación de esta especie mediante una simple reacción llamada reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Garrido *et al.*, 2000, Collins, 1996), la gran ventaja de esta prueba es su velocidad ya que el procedimiento de principio a fin solo dura 3 días, siendo significativamente más rápida que las 4- 7 semanas requeridas para el cultivo bacteriológico radiométrico BACTEC o las 12 a 16 semanas requeridas para un cultivo convencional (Collins, 1996). El descubrimiento y la caracterización de la secuencia de inserción IS900 se realizó en el Reino Unido en el año de 1985, además de la observación de 18 copias en el genoma de la micobacteria (Millar *et al.*, 1996).

Mediante la PCR es posible detectar cantidades mínimas de microorganismos a pesar de la limitación que supone la concentración de las micobacterias a partir de las muestras clínicas y de visualización del producto amplificado (Garrido *et al.*, 2000).

13. CONTROL

El control y erradicación de la paratuberculosis en un hato es un proceso muy largo y frustrante por la naturaleza insidiosa de la infección, el largo periodo de latencia, y le costoso y limitado desarrollo de pruebas fidedignas de diagnóstico. Por la falta de pruebas confiables para el diagnóstico de *Map* se hace difícil el control de paratuberculosis a menos que se realice sacrificio radical e

incorporar ganado de hatos libres. Otro factor que dificulta notablemente el control y erradicación de la paratuberculosis es el bajo nivel de casos clínicos por razones del largo periodo de incubación (Blood, 1992). Para el inicio de un programa de control Gay y Sherman (1992) sugieren 3 componentes importantes:

- Hacer un muestreo al hato completo y eliminar los animales positivos
- Realizar practicas de manejo que disminuyan la susceptibilidad de los animales que pueden ser infectados
- Vacunar a neonatos para incrementar la resistencia a la infección.

Es importante recordar que el control de la paratuberculosis o solo se limita a aislar al neonato de su madre para ello se en listan las siguientes medidas en la siguiente tabla.

Tabla 2. Cambios en el manejo de la explotación para el control de la paratuberculosis

Manejo de los partos (ganado de leche)

Sala de partos limpia y separada del resto de los animales

Separación de los terneros en el momento del nacimiento

Limpieza de las ubres antes del ordeño del calostro

Pasteurización del calostro (incremento de tiempo y temperatura)

No emplear el calostro de las vacas sospechosas de estar infectadas

Manejo de los terneros (ganado de leche)

Aislamiento de los animales de reposición hasta los dos años de edad

No permitir el contacto con las heces u orina de los animales adultos

Vacunar los animales de reposición (ganado de leche y carne)

Manejo diario de los terneros previo al manejo de las vacas

Higiene cuidadosa de botas y material en común

Emplear leche artificial

Manejo del animal enfermo (ganado de leche y carne)

No utilizar la sala de partos para acoger animales enfermos

Aislar cualquier animal con síntomas compatibles en un área de fácil desinfección

Enviar al laboratorio muestras de animales con signología compatible

Sacrificar cualquier animal con diarrea que no responda al tratamiento

Eliminar la descendencia de animales con paratuberculosis

Desinfección con compuestos eficaces y a presión

No permitir el contacto de las vacas con los desechos del área de aislamiento de animales enfermos

Manejo de los animales adultos

No permitir el acceso a aguas estancadas

Prevenir la contaminación fecal de agua y alimentos. Instalar barreras si es necesario

No utilizar equipo contaminado con material fecal para manejar el alimento

Establecer un plan de seguimiento

(Gay and Sherman, 1992)

En cuanto al muestreo de animales, la frecuencia y el número de diferentes pruebas usadas son determinadas por varios factores tales como:

- El tipo de negocio para el cual son usados los animales
- La prevalencia estimada de la paratuberculosis
- La percepción del dueño, de la importancia de la paratuberculosis para la productividad del hato
- La capacidad del dueño para pagar pruebas de diagnóstico
- La velocidad con la que el dueño espera lograr el control de la erradicación de la paratuberculosis
- Si la meta es el control o la erradicación de la enfermedad (Collins, 1996).

14. VACUNACIÓN

Durante las ultimas décadas el éxito de la erradicación de muchas enfermedades de debe en gran parte al desarrollo de vacunas para la inmunización artificial. Sin embargo para las micobacterias aun no se cuenta con una vacuna eficaz y disponible económicamente.

La vacunación contra *Map* fue inicialmente descrita en 1926 por Vallee y Ringjard después de sus observaciones cuando inocularon *Map* subcutáneamente y esta no resulto en infección (Chiodini, 1996). En cuanto al mecanismo de acción de la vacuna, distintas experiencias han demostrado que la inmunización no previene la infección en animales, pero si que modifica su respuesta inflamatoria provocando una regresión de las lesiones y la disminución tanto del numero de individuos con sintomatología clínica, como de la eliminación de bacterias (García y Pérez, 1999; Scalan, 1988; Sherman, 1992). Aunque la presencia de anticuerpos no tendría un efecto protector, si sería un indicador del grado de activación del sistema inmune (Corpa *et al.*, 1999).

La vacuna de uso común en los EEUU es preparada a partir de la cepa 18 destruida por calor suspendida den aceite mineral, sin embargo en Europa es usada una vacuna viva. No obstante ambas son capaces de inducir respuestas humorales y celulares que proveen un apreciable nivel de inmunidad (Chiodini, 1996). El uso de vacuna en EU esta restringida a bovino neonatos de edad entre 1-35 días para la vacunación inicial. No hay productos para la vacunación en rumiantes diferentes a los bovinos pero la vacunación en ovinos y caprinos parece

ser más efectiva. Generalmente en el ara de la inyección se forma un granuloma y puede convertirse en un absceso (Corpa *et al.*, 1999).

La vacunación también sensibiliza de algún modo a los animales con tuberculosis aviares y mamíferas por varios años, lo que probablemente se debe a la duración de la vacuna. Pero este efecto de sensibilización interfiere con el control de tuberculosis. El uso de la vacuna esta bajo estricto control del gobierno y en algunos estados esta prohibido su uso. En cuanto a la edad de vacunación en ovinos y caprinos, Corpa y colaboradores realizaron un estudio de la edad optima de la vacunación encontrando que los animales a los 4-5 meses tienen un mayor efecto protector que en animales inmunizados a los 10 – 15 días de nacidos, sugiriendo que en animales vacunados tardíamente, puede deberse posiblemente a que estos animales hayan tenido una mayor de conato previo con micobacteria y responden con mayor intensidad a la vacuna, o probablemente a que su sistema inmune haya alcanzado un mayor grado de desarrollo que los animales de 10 a 15 dias de edad(Corpa *et al.*, 1999).

15. TRATAMIENTO

A pesar de que numerosos antimicrobianos son eficaces frente a *Map* in vitro, ninguno de ellos ha proporcionado un resultado aceptable tras el tratamiento del animal enfermo. Este hecho puede ser debido, al menos en parte, a la localización intestinal de las lesiones y a la multiplicación intracelular de *Map*. De todos los compuestos utilizados, la isoniazida, la clofozimina , la rifampicina, y la gentamicina parecen ser los mas efectivos tanto in vitro como in vivo, aunque ninguno de ellos elimina totalmente la infección (Aduriz *et al.*, 2000).

16. RELACIÓN CON LA ENFERMEDAD DE CROHN

La evidencia que supone a *Map* como la causa de la enfermedad de Crohn es mucha, ya que se ha logrado aislar a *Map* de tejidos de pacientes con la enfermedad clínica (Shafren *et al.*, 2000). La relación entre *Map* y la enfermedad de Crohn se remonta hasta la década de los 80^{as} e inicios de los 90^{as} cuando investigadores reportaron el posible papel etiológico de *Map* en la enfermedad (Sung and Collins, 1997). Los avances técnicos han permitido la identificación y/o aislamiento de *Map* de una proporción significativamente alta de tejidos provenientes de pacientes con la enfermedad de Crohn que de los del grupo control. Estas metodologías incluyen:

- Técnicas de cultivo mejoradas
- Desarrollo de la prueba de PCR
- Desarrollo de un nuevo método de hibridación
- Eficacia de macrólidos y terapias de drogas antimicobacteriales
- Descubrimiento de seroreactividad específica de la enfermedad de Crohn hacia dos antígenos recombinantes de *Map*. (Chamberlin *et al.*, 2001)

La secuencia de inserción IS900 se ha detectado en los tejidos intestinales de pacientes con la enfermedad de Crohn en un 72 %, sin embargo aun existe controversia ya que se ha reportado la secuencia de inserción IS900 en pacientes con sarcoidosis; la sarcoidosis es una enfermedad granulomatosa multisistémica similar a la enfermedad de Crohn pero de causa aun desconocida (Clarke 1997)

17. JUSTIFICACIÓN

En el presente estudio se propone estudiar la interacción poblacional entre bovinos y caprinos, para la posible infección de caprinos al estar en contacto con bovinos clínicamente enfermos y el papel que juega la edad de los cabritos para el desarrollo de la enfermedad. No obstante que se han llevado a cabo trabajos con estas características, se han realizado con cepas aisladas en laboratorio, en este trabajo se utilizan inóculos elaborados directamente a partir de intestinos de bovinos infectados naturalmente para lograr una semejanza más evidente de una infección de campo.

18. OBJETIVO

Conocer la reacción patológica de la paratuberculosis en cabritos inoculados con *Map* a partir de intestinos de bovinos clínicamente enfermos de paratuberculosis evaluando el comportamiento histopatológico.

19. MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de este estudio se formaron dos grupos de cabritos de 6 meses de edad, todos originarios de un hato libre de *Map*. Cada grupo se formó de 10 animales en los cuales se inocularon con 2 ml de *Map* elaborado a partir de macerados de mucosa de ileon y válvula ileocecal de bovinos diagnosticados serológicamente e histopatológicamente positivos a *Map*. La inoculación se realizó por vía oral, simulando la infección de campo además de una reinoculación al tercer día con la misma cantidad de *Map*, posteriormente se vacunaron con la bacterina comercial* de *Map*.

Purificación de micobacterias a partir de mucosa intestinal

1. Abrir el intestino y lavar secuencialmente con agua destilada y PBS, para eliminar su contenido.
2. Raspar la mucosa intestinal empleando una hoja de bisturí estéril.
3. Añadir 2ml. de una solución de ampicilina (200µg/ml de agua destilada estéril) por cada 5g de mucosa obtenidos.
4. Homogenizar mediante un Stomacher (Lab Blender 80) durante 20-25 segundos.
5. Macerar manualmente empleando un Tenbroek (Pobel).
6. El macerado se vierte en una solución de PBS y tripsina al 0.5% (pH 7,8) 90ml durante 30 minutos a 23°C.
7. Centrifugar 2 veces a 800g, 20 minutos cada vez.
8. Comprobar la presencia de micobacterias, realizando un frotis para la observación de micobacterias a través de la técnica de Zeehl-Neelsen.
9. Las micobacterias obtenidas, se mantuvieron a -20°C, hasta la realización de la inoculación, periodo que estuvo comprendido entre una y tres semanas.

* Mycopar - Fort Dodge

Para la cuantificación de la micobacterias del inoculo se realizo el siguiente método:

Cuantificación de las Micobacterias Contenidas en el Inoculo

1. Se homogeniza el inoculo empleando una agitador, unos 10 segundos.
2. Se toma 1µl del inoculo a utilizar y se distribuye homogéneamente en una superficie de 1 cm² en un portaobjetos, secar al aire.
3. Se realiza la técnica de Zeehl-Neelsen.
4. Se obtiene el promedio de bacterias detectadas por conteo de micobacterias a 1000X aumentos en 40 campos seleccionados al azar. En este caso se emplea para su observación un microscopio óptico.
5. Una vez obtenida la cantidad, se multiplica por una constante (360242)* obteniendo de esta manera el numero de bacterias multiplicadas por 10³ contenidas por cada ml del inoculo, como se expresa a continuación:

Promedio de micobacterias / campo. $360242 \times = N^{\circ}$ de micobacterias $\times 10^3$ /ml de inoculo.

* Factor de microscopio, calculado mediante la formula: $FM = 1000/r^2$

Los animales de cada grupo se dividieron en 4 grupos (inoculados vacunados y no vacunados, control vacunados y no vacunados), también fueron criados en condiciones similares. El experimento se dividió en periodos de 0, 2, 4, 6 meses, sacrificando 4 (1inoculado vacunado, 1 inoculado no vacunado, 1 no inoculado no vacunado, 1vacunado no inoculado) al final de cada periodo.

En cada sacrificio se obtuvieron muestras de: yeyuno posterior, ileon anterior, posterior y medio, válvula ileocecal, linfonódulos mesentéricos, LN mediastínicos, LN poplíteos.

Las muestras se colectaron en formol buferado al 10%, posteriormente se procesaron para la inclusión en parafina, se realizaron cortes de aproximadamente 5 µ de grosor y se fijaron en laminillas para después teñirlas bajo las técnicas de

hematoxilina-eosina y Zeehl-Neelsen de acuerdo con lo descrito por Luna (1968) en su manual de métodos de tinción histológicos.

Para la evaluación histológica se diseñó un método basado en el método utilizado por Clarke y Little para evaluar la infiltración celular en intestinos. La evaluación realizó bajo el mismo criterio en lo que se refiere a los grados de infiltración; siendo los valores siguientes: 0 = nulo o ausente, 1 = infiltración ligera, 2 = infiltración de tipo moderado, 3 = infiltración de tipo severo o difuso. La densidad y tipo de infiltrado celular (linfocitos, macrófagos, neutrofilos, y eosinofilos) fueron evaluados en la mucosa hasta la lamina propia, submucosa y la capa muscular.

20. RESULTADOS

A la necropsia los hallazgos macroscópicos fueron variables, en un rango que fueron desde la ausencia de cambios patológicos aparentes hasta la presencia de linfangitis ligera apenas perceptible, así como linfonodos ligeramente edematizados y la mucosa con un ligero aumento de grosor en su porción distal. La presencia de heces formadas en recto confirma la ausencia de diarrea en todos los animales.

Los cambios microscópicos también fueron variables dependiendo del tiempo transcurrido entre la inoculación y el sacrificio; otro factor importante para la aparición de lesiones fue la vacunación. De este modo los animales sacrificados en la primera etapa no mostraron lesiones sugestivas de la paratuberculosis, pero sí una infiltración de linfocitos y macrófagos en la mucosa del yeyuno, siendo más intensa en ileon y válvula ileocecal, además de una infiltración eosinofílica en estos últimos.

Estos cambios celulares se resumen en la siguiente tabla evidenciándose la infiltración eosinofílica.

Tabla 3. Cambios histopatológicos basados en infiltración* de animales sacrificados en la primera etapa del experimento

Mucosa	Grupo vacunado e inoculado [#]			Grupo no vacunado inoculado [#]			
	Yey. Post.	Ileon	Válvula ileocecal	Yey. medio	Yey. Post.	Ileon	Válvula ileocecal
Linfocitos	1	2	3	2	2	3	3
Macrófagos	1	2	3	1	2	1	3
Neutrófilos	2	0	0	1	1	1	1
eosinófilos	2	1	0	1	3	2	1
Células Gig.	0	0	0	0	0	0	0
Submucosa y muscular							
Linfocitos	0	2	1	1	2	0	1
Macrófagos	1	1	0	1	1	1	1
Neutrófilos	2	0	0	1	1	3	1
Eosinófilos	0	0	0	0	1	0	0
Células Gig.	0	0	0	0	0	0	0

* Los valores de la infiltración corresponden de la siguiente manera: 0 = mínimo o ausente 1 = leve 2 = moderada 3 = severa o intensa, este criterio de evaluación es común en todas las tablas subsiguientes

El número de animales por grupo fue de 1

Para los animales sacrificados en las fases intermedias las infiltraciones se hicieron más intensas en animales no vacunados, pero estas no progresaron en animales vacunados, sin embargo los animales sacrificados en estas fases se observó la hiperplasia de las placas de Peyer en ambos grupos (vacunados y no vacunados). Los resultados de los hallazgos se resumen en la tabla siguiente:

Tabla 4. Cambios histopatológicos basados en infiltración de animales sacrificados en la etapa intermedia del experimento

Mucosa	Grupo vacunado e inoculado [#]						Grupo no vacunado inoculado [#]							
	Yey. Post.	Ileon	Válvula ileocecal	Yey. medio	Yey. Post.	Válvula ileocecal	Yey. medio	Yey. Post.	Ileon	Válvula ileocecal	Yey. medio	Yey. Post.	Ileon	Válvula ileocecal
Mucosa	**1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Linfocitos	2	3	1	3	3	1	3	3	3	3	2	3	3	3
Macrófagos	0	3	1	3	3	2	3	2	3	3	3	2	3	2

Neutrófilos	1	1	0	1	2	1	1	2	1	2	2	0	2	1
eosinófilos	1	2	0	2	1	1	1	0	0	2	0	1	0	0
Células Gig.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Submucosa y muscular														
Linfocitos	2	2	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2
Macrófagos	1	2	2	1	1	1	2	1	1	1	1	2	2	2
Neutrófilos	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	2	1	1
Eosinófilos	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Células Gig.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

El número de animales por grupo fue de 2.

** Número de animales sacrificados.

En los animales sacrificados en la última fase se hallaron lesiones sugestivas a paratuberculosis en el área interfolicular de la corteza de linfonodos, además de la presencia de granulomas en folículos de las placas de Peyer, formados por macrófagos rodeados por linfocitos pero sin la presencia de células gigantes. Los resultados de las infiltraciones se resumen en la siguiente tabla, nótese la infiltración de eosinófilos en los no vacunados.

Tabla 5. Cambios histopatológicos basados en infiltración de animales sacrificados en la última etapa del experimento

	<u>Grupo vacunado e inoculado[#]</u>			<u>Grupo no vacunado inoculado[#]</u>							
	Yey. Post.	Ileon	Válvula ileocecal	Yey. medio		Yey. Post.		Ileon		Válvula ileocecal	
	**único	único	único	1	2	1	2	1	2	1	2
Mucosa											
Linfocitos	2	2	3	3	2	2	2	3	3	2	3
Macrófagos	2	2	3	2	3	3	2	3	3	2	3
Neutrófilos	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	3
eosinófilos	3	1	2	2	0	1	1	2	2	2	2
Células Gig.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Submucosa y muscular											
Linfocitos	2	0	1	2	1	1	1	2	2	2	2
Macrófagos	1	1	1	3	2	1	1	3	2	2	2
Neutrófilos	1	1	1	0	1	1	1	0	0	2	0
Eosinófilos	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Células Gig.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

El número de animales por grupo fue de 1 para los vacunados inoculados y 2 para los no vacunados inoculados.

** Número de animales esvaluados

En la siguiente tabla se resumen los cambios de los animales control en la primera etapa del experimento encontrándose que los cambios son ligeros para el grupo vacunado no inoculado, con respecto al grupo no vacunado no inoculado.

Tabla 6. Cambios histopatológicos basados en infiltración* de animales sacrificados en la primera etapa del experimento de animales control

Mucosa	<u>Grupo vacunado no inoculado[#]</u>			<u>Grupo no vacunado no inoculado[#]</u>			
	Yey. Post.	Ileon	Válvula ileocecal	Yey. medio	Yey. Post.	Ileon	Válvula ileocecal
Linfocitos	0	1	2	0	0	1	2
Macrófagos	0	2	2	1	1	2	2
Neutrófilos	1	1	1	1	0	1	1
eosinófilos	3	1	1	0	0	0	1
Células Gig.	0	0	0	0	0	0	0
Submucosa y muscular							
Linfocitos	0	0	1	0	0	1	1
Macrófagos	1	1	1	1	1	1	1
Neutrófilos	0	0	0	1	0	0	1
Eosinófilos	1	0	0	0	1	0	0
Células Gig.	0	0	0	0	0	0	0

El numero de animales por grupo fue de 1 para los vacunados inoculados y 2 para los no vacunados inoculados.

Para el final del experimento se observaron los siguientes cambios resumidos en la siguiente tabla resaltando los cambios en el grupo vacunado con respecto al grupo control, evidenciado la reacción de la vacuna.

Tabla 7. Cambios histopatológicos basados en infiltración* de animales sacrificados en la ultima etapa del experimento de animales control

Mucosa	<u>Grupo vacunado no inoculado</u>			<u>Grupo no vacunado no inoculado[#]</u>			
	Yey. Post.	Ileon	Válvula ileocecal	Yey. medio	Yey. Post.	Ileon	Válvula ileocecal
Linfocitos	2	2	3	0	1	2	2

Macrófagos	2	3	2	1	1	1	2
Neutrofilos	1	1	1	1	0	1	1
eosinofilos	2	1	1	0	0	0	1
Células Gig.	0	0	0	0	0	0	0
Submucosa y muscular							
Linfocitos	1	2	2	0	0	1	1
Macrófagos	1	1	1	1	1	1	1
Neutrofilos	0	1	2	1	0	0	1
Eosinofilos	1	0	1	0	1	0	0
Células Gig.	0	0	0	0	0	0	0

El numero de animales por grupo fue de 1 para los vacunados inoculados y 2 para los no vacunados inoculados.

En relación a los resultados obtenidos en las tablas anteriores, se puede observar que las infiltraciones celulares en los animales vacunados no inoculados son en forma creciente en comparación con los animales control (no vacunados no inoculados), ya que en estos últimos es constante el infiltrado ligero.

A pesar de los hallazgos no se logro observar a las micobacterias en los tejidos fijados y teñidos bajo la técnica de Zeehl Neelsen. Aun con estos se puede decir que la infección pudo haber ocurrido en los animales no vacunado ya que en ellos se logró observar los pequeños granulomas en linfonódulos, sugiriéndonos dos cosas; que la infección se halla eliminado en las fases tempranas y estos granulomas son vestigios de ello o que la infección estaba progresando aun. pero sin mostrar mucha evidencia.

21. DISCUSIÓN

La evolución de las lesiones producidas por el bacilo de *Map* progresan conforme avanza el tiempo, pero de una forma lenta, sin embargo para este estudio, la edad de los animales pudo haber influido en la aparición de los signos y lesiones características de *Map* ya que los animales de mayor edad son más resistentes a la infección ya sea por la madurez inmunológica, en este sentido, se

ha señalado que en la especie ovina el sistema inmune no alcanza su completa madurez anatómica fisiológica y funcional hasta varios meses tras el nacimiento (Corpa *et al.*, 1999) o por contacto previo con otras micobacterias atípicas que sensibilizan de algún modo a los animales confiriéndoles una reacción inmunológica más eficiente y así poder resistir a la infección (Juste *et al.*, 2000).

En cuanto a la evolución de la vacuna se puede asumir que esta funciona de manera prolongada y eficaz manteniendo el grado de infiltración linfocítica y de macrófagos los cuales son importantes ya que la respuesta de tipo celular es la que confiere protección y no la humoral como ocurre en otras enfermedades (Chiodini, 1996). En base a lo anterior se puede confirmar que la vacuna es más eficaz en animales mayores de 4 meses como lo reportaron Corpa *et al.* (1999) puesto que no desarrollaron las lesiones halladas en los animales no vacunados sacrificados en la etapa final.

Técnicamente se observó la formación del granuloma en el área de la vacunación referido por varios autores y que es considerado de importancia ya que su formación indica de alguna manera una buena respuesta inmunológica.

22. CONCLUSIONES

En primer lugar se concluye que la bacterina a nivel histopatológico induce una buena respuesta de tipo celular.

El inóculo estimula una respuesta de tipo celular a nivel digestivo sin embargo, no produce lesiones en este mismo si se vacuna simultáneamente con una bacterina.

La cepa de *Map* de campo puede infectar a caprinos menores a 5 meses.

23. LITERATURA CITADA

1. Ackerman M. R. Debey M. B, stabel T. J, Gold J. H, Register K. B, 1994, Distribution Of Anti CD64 (FBMII) Immunoreactivity In Formaline Fixed, Paraffin – Embedded Bovine Tissues, *Vet Pathol.* 31: 340-341.
2. Alzuhri H M Little D Clarcke C J, 1997, Altered Intestinal Macrophage Phenotype Ovine Paratuberculosis *Vet. Immunology and immunopathology.* 38-34.
3. Alzuhri H M Woodall Clarcke C J. 1996. Increased TNF- α , IL.1B, And IL-6 Expression In Ovine Paratuberculosis. *Vet. Immunology and Immunopathology.* 49: 331-345
4. Benazzi S. Berada and Swliesser. 1995. Firths Report of Paratuberculosis (Johne's Disease) in Sheep in Morocco. *J. Vet. Med. B.* 42: 339-344.
5. Carrigan M J. Seaman J T. 1990. The pathology of Johne's Disease in sheep. *Aust. Vet. J.* 13: 12-17.
6. Chiodini RJ. 1996. Immunology: Resistance To Paratuberculosis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice,* 12: 313-343.
7. Chamberlin W. Graham DY, Hulten K, El-Zimaity HM, Schwartz MR, Naser S, Shafran I I. El-Zaatari F. A. 2000. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* as one cause of Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 15:000-000.
8. Clarke C J. 1997. The Pathology And Pathogenesis Of Paratuberculosis In Ruminants And Other Species. *Journal of Comparative Pathology,* 116: 217-261.

9. Clarke C. J. and Little D. 1996. The Pathology of Ovine Paratuberculosis: Gross and Histological Changes in the Intestine and Other Tissues, *J. Comp. Path.* 114: 419-437.
10. Collins T. Michael. 1996. Diagnosis of paratuberculosis. *Vet. Clinics of North America* 12: 357-371.
11. Corpa J. M; García Marín J. F; Pérez V. 1999. evolución de la respuesta inmune frente a paratuberculosis en ganado ovino y caprino según la edad de la vacunación. *Med. Vet.* 16: 162-166.
12. Dercksen D P, Muskens J, Vos J, Bakker D. 1998. Current paratuberculosis and parasitism in a five-month, old lamb in the Netherlands, *Vet. Rec.* 142: 433-434.
13. Enríquez V. A., Arias I. J, Flores P. F. G. 2000. Informe de un Caso de Mineralización Endocárdica Y de Grandes Vasos Asociada a Paratuberculosis. *IX Congreso nacional de patología veterinaria.* Pg. 57-58.
14. Fouad A. K, E. L. Zaatori, Saleh A. Naser, David Y. Graham, 1997, Characterization of a *Map* Recombinant Clone Expressing 35000 Molecular – Weight Antigen and Reactivity With Sera From Animal with Clinical And Subclinical Johne's Disease, *J. Clin. Microb.* 37: 1794-1799.
15. García J. F; Pérez V; González J. M. 2000. La interacción Bovino-Bacteria y los Mecanismos de Enfermedad, *Aula Veterinaria Bovis.* 93: 29-38
16. Garrido J. M; Aduriz G; Juste R. A; Geijo M. V. 2000. Los Métodos de Diagnostico de la Paratuberculosis en el Ganado Vacuno. *Aula Veterinaria Bovis.* 93: 49-61.

17. Gay M. John and Sherman M. David. 1992. Factors in the Epidemiology and Control of Ruminant Paratuberculosis. *Vet. Met. Pp 1133-1139*
18. Hamilton H L, Cooley A J, Adams J L and Czuprynsky C J. 1991. *Mycobacterium paratuberculosis* Monoassociated Nude Mice as a Paratuberculosis Model, *Vet. Pathol.* 28: 146-155.
19. Hermon – Taylor J, N. Banes, C. J. Clarke and C. Findlayson, 1998, *Mycobacterium paratuberculosis* in Cervical Lymphadenitis Followed Five Years Late by Terminal Ileitis Similar to Cron's Disease, *British Medical Journal*, 315: 449-453.
20. Hietala K. Sharon.1992. The options in diagnosing ruminant paratuberculosis, *Vet. Med. pp. 1122-1132*.
21. Hirsh D C. 1990. *Mycobacterium paratuberculosis*, Pág. 16 en: Ernest L, Biberstein, Yuon Chung Zee. Tratado de microbiología veterinaria, editorial Acribia, España
22. Hope AF, Tulk PA, Condrón RJ. 1997. Commercial pasteurization of *Mycobacterium paratuberculosis* in whole milk. *Proc. 5th Intl. Coll. Paratuberculosis: Chiodini RJ, Hines II ME, Collins MT (eds)*.
23. Hutchinson J. Lawrence. 1996. Economic impact of paratuberculosis, *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice.* 12: 373-38.
24. Jakobsen M.B, Alban L, Nielsen S. S. 2000 A cross-sectional study of paratuberculosis in 1155 Danish dairy cows, *Preventive Veterinary Medicine* 46: 15-27

25. Juste R A, Garcia Marin, Perez B, Sáez de Ocáriz and Badiola J J. 1994 experimental infection of vaccinated and Non-vaccinated lambs with *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Comp. Path.* 110: 185-194
26. Juste R A, Garrido M J, Aduriz G. 2000. El agente causal de la paratuberculosis y su situación taxonómica. *Aula veterinaria, Bovis.* 93: 13-28.
27. Johnson-Ifeorulundu Y. J; Kaneene J. B; Sprecher D. J; Gardiner J. C; Lloyd J. W. 2000. The effect of subclinical *Mycobacterium paratuberculosis* infection on days open in Michigan, USA, dairy cows. *Prev. Vet. Med.* 46: 171-181.
28. Luna L. G. 1968: Manual of histologic staining. Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. Third edition. Mc graw Hill. Book Co. New York. USA.
29. Merchant I A and Pocker R A. 1965. Bacteriología y virología veterinaria. Editorial acribia, España. Pg:518-519.
30. Millar D; Ford J; Sunderson J; Withey S; Tizard M; Doron T; Hermon – Taylor J. 1997, IS900 PCR to Detect *Mycobacterium Paratuberculosis* In Retail Supplies of Whole Pasteurized Cows Milk In England and Wales. *Applied. and Envirometal Microbiology.* pp 3446-3452.
31. Momotani E, Whiple D L, Thierman A B y Cheville N. F, 1988. Role of M Cells and Macrophages in the Entrance of *Mycobacterium Paratuberculosis* Into Domes of Ileal Peyer`s Patches in Calves. *Veterinary Pathology,* 25: 131-137.
32. Navarro J A, Ramis J S, Pallarés F J, Sánchez J. 1998. Changes In Lymphocyte Subsets In The Intestine And Mesenteric Lymph Nodes In Caprine Paratuberculosis. *Journal of Comparative Pathology,* 118: 109-121.

33. Nielsen S. S, Agger J. F, 2000, Prevalence Of Paratuberculosis In Danish Dairy Herds, *Proc. 9th ISSVE Symposium, Colorado USA* .
34. Nordlund Kenneth V, Gooder William J, Pelletier Joseph and Collins Michael T. 1996. Associations between subclinical paratuberculosis and milk production, milk componets, and somatics cell counts in dairy herds. *JAVMA* 208: 1872-1876
35. Pérez V; Corpa J. M; García Marín. 2000. El cuadro clínico y lesional de la paratuberculosis. *Aula veterinaria, Bovis* 93: 13- 28.
36. Pérez V, García Marín and Badiola J J. 1996. Description And Classification Of Different Types Of Lesson Associated With Natural Paratuberculosis Infection In Sheep. *J. Comp. Path.* 114: 107-122
37. Scalan M. Charles. 1988. Introducción a la Bacteriología Veterinaria. Editorial Acribia, España. Pg: 349-355
38. Shafran I, C. Piromalli, C.Romero, D.Schwartz and S.Naser. 2000. Identification Of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* In Crohn's Tissue. *Gastroenterology* 118(4): A1767.
39. Shulaw P. W, Bech-Nielsen S, Rings D. M, Getzy D. M, Woodruff T. S, 1993 Serodiagnosis Of Paratuberculosis In Sheep By Use Of Agar Gel Immunodifusion, *Am. J. Vet. Res.* 54: 13-19
40. Stabel R. Judith. 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

41. Sung Nackmoon and Collins T. Michael, 1997, Thermal Tolerance Of *Mycobacteriu paratuberculosis*, *Applied And Environmental Microbiology* 64: 999-1005.
42. Sweeney W. Raymod, Jones E. Douglas, Habecker Perry, Scott Phillip, 1998, Interferon γ And Interleukin 4 Gene Expression In Cows Infected With *Mycobacterium paratuberculosis*, *Am. Vet. Res.* 7: 842-846.
43. Tizard Ian, 1995, *Inmunología Veterinaria*, 4ª. Edición, Mc Graw Hill-Interamericana, 3:31-37.
44. Williams E. S; Snyder S. P, and Martin K. L. 1983. Pathology Of Spontaneous And Experimental Infection Of North American Wild Ruminants With *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet. Pathol.* 20: 274-291.
45. Whittington R. J, Marsh I, McAllister S, Turner M. J, Marshall D. J, and Fraser C. A, 1999, evaluation of modified BACTEC 12B radiometric medium and solid media for culture of *Mycobacterium avium subsp paratuberculosis* from sheep, *J. Clin. Microb.* 37: 1077-1083.