

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA

UNAN – LEÓN

ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA



Tema: Estudio anatomopatológico sobre la presencia de Paratuberculosis bovina en los rastros de los Departamentos de León y Chinandega, Agosto 2004 - Enero 2005

Autor: Br. Darwin Javier Palma Fuentes
Br. Sergio Roboam Castillo Guerrero

Tutor: William Jiron Toruño MDV
Asesor: Ignacio De Blas

León, Julio del 2005

AGRADECIMIENTO

En nuestra presente investigación agradecemos:

A dios por habernos guiados en nuestro camino e iluminados con su sabiduría, por permitirnos un día mas de vida.

A nuestros padres que con esfuerzo, dedicación y sacrificio hicieron en nosotros hombres útiles a la sociedad y habernos dejado esta herencia que los llena de orgullo.

A nuestros profesores William Jirón e Ignacio de Blas que con esfuerzo y sabiduría fueron instrumentos de aprendizaje para lograr nuestras metas.

A un amigo especial que nos dejó un regalo en nuestra vida que es el optimismo y la alegría.

INDICE

	Páginas
Presentación	I
Agradecimiento	II
Contenido (Índice)	III
1-Resumen	1
2.-Introducción	2
3.-Justificación	4
-Objetivos	5
3.1-Objetivo General	
3.2-Objetivo Especifico	
4.-Material y Método	6
4.1-Tipo de estudio	
4.2-Utilización de Método Estadístico.	
4.3-Recolección, traslado y procesamiento de muestra.	
4.4.-Tinción del Tejido.	9
4.5-Hematoxilina-eosina.	
4.6-Ziehl-Neelsen.	
4.7.-Materiales.	11
5.-Revisión Bibliográfica.	12
5.1-Etiología.	
5.5.1-Características Generales.	
5.5.2-Medios de cultivo.	14
5.5.3-Persistencia en el Medio.	14
5.5.4-Estructura del MAP.	16
5.5.5-Cepas de MAP y relación con otras micobacterias.	17
6.-Patogenia.	19
6.1-Vía de contagio.	19
6.2-Entrada de MAP en el organismo y desarrollo lesional.	20
6.3-Respuesta inmune del hospedador y relación con el espectro patológico.	22
7.-Epidemiología e importancia económica.	25
7.1-Hospedadores susceptibles.	

7.2-Distribución y prevalencia de la paratuberculosis en ganado bovino.	26
8.-Manifestaciones Clínicas.	28
8.1-Cuadro Lesional.	30
8.2-Lesiones macroscópicas.	
8.3-Lesiones microscópicas.	31
8.4-Clasificación lesional.	32
9.-Métodos de Diagnósticos.	34
10.-Tratamiento y Control de la Paratuberculosis bovina.	37
10.1.-Tratamiento de la Paratuberculosis bovina.	
10.2.-Programa de control de la Paratuberculosis bovina.	37
10.3.-Diagnostico y control.	
10.4.-Medidas de Manejo.	39
11.-Resultados.	40
12.-Discusión.	42
13.-Conclusión.	43
14.-Recomendaciones.	44
15.-Bibliografía.	45
16.-Anexos.	52

RESUMEN.

En el presente estudio se utilizó la técnica de diagnóstico histopatológico para detectar paratuberculosis bovina utilizando la tinción de hematoxilina – eosina a una población muestral y la tinción de Ziehl Neelsen, a los animales sospechosos encontrándose en base a la localización y extensión de las lesiones, tipos celulares predominantes y cantidad de bacilos presentes en la misma.

Para ello, se han estudiado anatomopatológicamente un total de 292 vacas adultas procedentes de 2 diferentes Rastros Municipales de los Departamentos León y Chinandega.

En todos los casos se tomaron para el estudio histopatológico la válvula ileocecal y los linfonodos yeyunales caudales o ileales.

El estudio histopatológico permitió establecer criterios diferenciales de lesiones granulomatosas causadas por parásitos y aquellas asociadas a la paratuberculosis.

Si bien cabe mencionar que se detectaron quistes parasitarios que provocaban lesiones macroscópicas compatibles con una enteritis crónica con formación de pliegues en algunos casos o solo presentaban engrosamiento de la mucosa intestinal del último tramo del intestino delgado que corresponde al íleo así como aumento de tamaño de la pared intestinal y coloración blanquecina. en el cuál confirma la presencia de parásitos.

Sin embargo en el presente estudio no se detecto presencia lesional microscópica asociada a paratuberculosis.

INTRODUCCION.

En Nicaragua uno de los rubros más importantes es la ganadería y la predisposición de las enfermedades es uno de los factores que produce pérdidas de importancia económica, y problemas sanitarios.

La paratuberculosis o Enfermedad de Johnes se encuentra en la lista B de la OIE, es un proceso infeccioso crónico que afecta a los rumiantes domésticos y silvestres. La lesión se localiza principalmente en el intestino delgado, en la parte distal del íleon, produciendo una enteritis granulomatosa y como consecuencia los animales afectados presentan diarrea crónica incurable, emaciación, reducción en la producción de leche (Chiodini, 1992; Thoen y Haagsma, 1996).

La enfermedad tiene gran impacto económico debido al descenso de la productividad, susceptibilidad incrementada a otras infecciones como la mastitis y eliminación temprana de los animales afectados. (Van Shaik *et al.*, 1996; Hutchinson, 1996).

El agente causal es el *Mycobacterium. paratuberculosis*, un pequeño bacilo aerobio, Gram positivo, ácido alcohol resistente y un parásito intracelular obligado, especialmente en macrófagos (Collins, 1996; Jark *et al.*, 1997). El *M. paratuberculosis* es genéticamente similar pero fenotípicamente diferente al *M. avium* siendo una de estas diferencias su mayor virulencia para los mamíferos. Recientemente el *M. paratuberculosis* ha sido propuesto ser denominado *M. avium* subespecie *paratuberculosis* (Collins, 1997).

El *M. paratuberculosis* es eliminado a través de las heces y la leche del animal infectado, sobre todo en la etapa avanzada de la enfermedad (Thoen y Haagsma, 1996); por lo que el agua y alimentos, que son contaminados con heces de los animales infectados constituyen medios de transmisión de esta enfermedad (OIE Manual, 1996). Luego de la ingestión, la bacteria se localiza en el intestino delgado (placas de Peyer), nódulos linfáticos y tonsilas en donde es fagocitada por los macrófagos pero no es destruida persistiendo dentro del

macrófago y evadiendo, de este modo, la respuesta inmune por daño en la función de este importante mecanismo de defensa del animal (Kreeger, 1991).

La enfermedad de Johnes está siendo considerada como una enfermedad emergente. [El objetivo de presente estudio es analizar la presencia de paratuberculosis bovina en los los animeles sacrificados en los rastros de León – Chinandega, Agosto 04 – Enero 05](#)

A pesar de su reconocimiento desde hace más de un siglo, debido al frecuente aislamiento de *M. paratuberculosis* de pacientes humanos con la enfermedad de Crohn, un proceso clínico y anatomopatológicamente similar a la enfermedad de Johnes; aunque los estudios realizados a la fecha no son concluyentes para afirmar que la enfermedad de Johnes o paratuberculosis es una zoonosis (Collins, 1997).

JUSTIFICACION

El presente estudio es el primero que se realiza para identificar al *Mycobacterium Avium Paratuberculosis*; se realizo por los problemas económicos y sanitarios que provoca la paratuberculosis en la ganadería, sin obviar que hay ciertas enfermedades que ocasionan diarrea crónica y caquexia en animales adultos en donde los síntomas son muy frecuentes en Nicaragua.

En el año 2000 el MAGFOR reportó un caso de paratuberculosis en Nicaragua apareciendo en el reporte anual de la OIE. No se han hecho otros estudios para detectar incidencia y prevalencia de esta enfermedad en nuestros hatos.

OBJETIVOS

General:

Analizar la presencia de paratuberculosis bovina en los animales sacrificados en los rastros de León – Chinandega, Agosto 04 – Enero 05

Identificar y determinar la presencia de la Paratuberculosis en bovinos sacrificados en los mataderos de León y Chinandega durante el periodo de Agosto 2004- Enero 2005.

Específicos:

Comprobar la presencia de la enfermedad de Johns o paratuberculosis bovina

Verificar mediante la tinción de Zeil Nelssen si las enteritis crónicas detectadas en animales adultos sacrificados en estos rastros se deben a PTBC

Determinar el estatus sanitario de los animales sacrificados en los rastros mencionados

- Identificar la lesión característica de la paratuberculosis en el íleon y ganglio ileocecal.
- Determinar el agente de la paratuberculosis en los mataderos de León y Chinandega.
- Realizar la clasificación lesional de la paratuberculosis en la especie bovina, basándose en los criterios histológicos.
- Determinar el estatus zoonosológico de los animales sacrificados.

MATERIAL Y METODO

Tipo de estudio:

En el presente trabajo se realizó un estudio exploratorio de corte transversal para diagnosticar lesiones de Paratuberculosis bovina. Esta investigación no se ha hecho con anterioridad; lo cual ayuda a abrir nuevos espacios para estudios, investigaciones y futuros proyectos relacionados con esta enfermedad. El presente estudio realizo a una población de 8162 animales de los cuales se muestrearon 292 animales en un periodo de 5 meses y realizando las pruebas de laboratorio pertinentes. **no se obtuvo ningún caso positivo, esto significa que para detectar la enfermedad con una probabilidad de 95% se considera que la prevalencia permisible es de 1% y si hay algunos enfermos son menos del 1%.**

Universo y área de estudio:

La población total es 8162 de los cuales se recogieron 292 muestras al azar de bovinos sacrificados en el matadero de León y Chinandega. En un periodo de 5 meses comprendido entre agosto del 2004 y enero del 2005.

Utilización de método estadístico:

Se utilizó el método Win Episcopo 2.0, es la primera versión de una aplicación que tiene como principal objetivo la realización del estudio epidemiológico de una enfermedad en poblaciones animales.

El programa ha sido diseñado en entorno Microsoft Windows, el diseño del programa se enmarca dentro de las actividades de la European Network on Veterinary Epidemiology and Animals Health Economics (EPEDICON) y de la Red Iberoamericana de Epidemiología (RATIO). Este ha sido desarrollado por la unidad de enfermedades infecciosas y epidemiología de la Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza.

Tamaño de la muestra

El tamaño de la población se determinó por el promedio de animales sacrificados por día. Para determinar el tamaño de la muestra se utilizó el método estadístico Win Episcope 2.0. En el matadero de Chinandega se muestrearon un total de 112 bovinos y en el matadero de León se muestrearon 180 bovinos sacrificados, obteniéndose un porcentaje poblacional de 3.6% del total de la población sacrificada en el periodo de estudio.

Para esta investigación se realizó la tinción de Hematoxilina-eosina al total de muestra seleccionada 292 y la técnica de Ziehl Neelsen a 22 muestras sospechosas de lesiones de paratuberculosis; por la confiabilidad de esta prueba para detectar animales positivos a la paratuberculosis y por los costos económicos que ella infiere.

Recolección de muestras en los bovinos sacrificados en los mataderos.

Para este trabajo investigativo se contó con la autorización de los responsables de los mataderos. Se realizaron cuatro visitas durante cada mes, en el periodo comprendido de agosto 2004 a enero 2005. En este periodo se recogió tejidos de la válvula ileocecal y ganglio mesentérico del intestino y se colocaron en envases con formalina al 10%.

Traslado de las muestra en formol al 10% (fijador de tejidos).

El fijador químico utilizado en los tejidos histológicos es el formaldehído al 10% con el fin principal de detener la autólisis post-mortem por inactivación de enzimas hidrolíticas, facilitar la obtención de cortes mediante el endurecimiento de tejidos, intensificar la tinción, estabilizar los componentes para que se acerque a su condición in vivo y proteger al histólogo mediante propiedades antisépticas. La inmersión de la muestra en el fijador debe realizarse tan pronto como sea posible. El tiempo ideal para la fijación del tejido con formaldehído requiere 24hrs.

Recepción de tejidos sumergidos en formol al 10% en laboratorio.

Estos deben de ser recepcionados por un tecnólogo capacitado para manejar dichas muestras, las que se inscriben en el cuaderno de control.

Realización de la ficha de biopsia

Se debe llenar una ficha de entrada en el laboratorio para conocer los datos generales del animal al que se le tomo muestra y el lugar de procedencia. En esta hoja se debe anotar el lugar de donde se extrajo el tejido y si es de origen tumoral o no.

Corte de muestra

Se retiraron las muestras de los frascos para proceder a realizar los cortes transversales con un grosor de 1-1.5mm posteriormente se colocan en cassette para tejidos.

Introducción de la muestra al autotecnicon.

Se realiza la deshidratación de la muestras en el autotecnicon con doce pases que son los siguientes: primer pase : alcohol al 70%;segundo pase : alcohol al 70%; tercer pase : alcohol al 80%; cuarto pase : alcohol al 96%; quinto pase :alcohol al 100%; sexto pase : alcohol al 100%; septo pase : metanol; octavo pase : alcohol y xilol al 50%; noveno pase : alcohol y xilol 50; décimo pase : xilol al 100%; décimo primero pase : parafina; décimo segundo pase : parafina; con una duración de este proceso de 18hrs.

Inclusión del tejido en parafina;

La técnica de inclusión en parafina para preparar muestra es confiable. Aunque modifica células y tejidos, las muestras procesadas brindan confianza y precisión. La técnica de inclusión en parafina constituye el método de mas uso para la preparación de tejidos para diagnostico histopatológico con el microscopio óptico. El aparato que se utiliza está compuesto de recipiente de parafina derretida a 63 °C, después se ponen en un lugar tibio para guardar los moldes a incluir y una área fría para enfriar los bloques incluidos, todas estas áreas necesitan estar a una temperatura especifica.

Corte del tejido (3micras) con ayuda del microtomo;

Una vez que la parafina se ha endurecido y que ya se han retirados los moldes, los cubos se montan en le microtomo y se hacen cortes muy finos (3 μ) sobre la superficie. Estas secciones así obtenidas tienden a formar cintas lo que facilita

la recolección de secciones de la muestra. Las cintas pueden hacerse flotar en agua tibia, estirarse después de recogerse con portaobjetos.

Inclusión en el baño Maria.

Su función es montar la cinta para luego colocarla en la lámina o porta objeto, este aparato se debe utilizar a 55-60° para garantizar la calidad de las láminas.

Inclusión del tejido al horno a 60 °C

Se utiliza para desparafinar las láminas que contienen tejidos para luego ser teñido con la técnica Hematoxilina-eosina.

Tinción del tejido.

La técnica hematoxilina-eosina tiene como propósito teñir el núcleo y citoplasma en secciones de tejido para luego ser teñido con los siguientes pasos:

- Xilol, tres cambios, de 10-5-3 minutos cada cambio
- Alcohol absoluto 80%, de 10-5-3 minutos cada cambio y por ultimo una inmersión con alcohol de 70% por 3 minutos cada cambio.
- Teñir con Hematoxilina de 6-8 segundos.
- Lavar en agua corriente unos segundos.
- Sumergir en hidróxido de amonio por 4 segundos.
- Teñir citoplasma en Eosina de 3-4 minutos dependiendo del contraste deseado.
- Sumergir en alcohol al 80%.
- Secar en el horno por 3 minutos a 60 °C.
- Sumergir en Xilol al 100% por 2 minutos
- Montar en resina sintética.

Resultados de la técnica de Hematoxilina -eosina.

Núcleos.....azul

Citoplasma.....de rosado a rojo

Mayoría de los otros tejidos.....de rosado a rojo

Tinción de Ziehl Neelsen

Reactivos:

1. cristales de fenol derretidos.....	2.5ml
2. Alcohol etílico absoluto.....	5.0ml
3. fucsina básica	0.5gr
4. Agua destilada.....	50.0ml

Procedimiento

- Desparafinar e hidratar hasta llegar al agua destilada.
- Colorear las láminas con una solución fresca y filtrada de carbol _ fucsina durante 30 minutos.
- Lavar bien con agua corriente.
- Decolorar con solución alcohólica ácida al 1% hasta que las secciones aparezcan de color rosa pálido.
- Lavar bien con agua corriente, durante 8 minutos.
- Contrastar, sumergiendo una lámina por vez en la solución diaria de azul de metileno. Las secciones deben de ser de color azul pálido. El exceso de contraste puede enmascarar los bacilos.
- Lavar con agua y luego con agua destilada.
- Deshidratar rápidamente con alcohol etílico al 95% y alcohol etílico absoluto, 2 cambios cada uno, aclarar con 2 cambios de xileno, 2 minutos cada uno.
- Montar en medio resinoso.

Resultado técnica de ZIEHL-NEELSEN.

Bacilos ácido; alcohol resistente.....	Rojo brillante
Eritrocitos.....	Amarillo _ anaranjado
Otros elementos tisulares.....	Azul

MATERIALES

- Formalina al 10%.
- Envases plásticos y de vidrio.
- Cubre objeto y portaobjeto.
- Cuchillas para cortes histológicos.
- Alcohol puro al 95%.
- Xilol.
- Parafina.
- Pinzas.
- Mechero.
- Gazas.
- Baño María.
- Guantes.
- Tijeras.
- Microtomo.

REVISION BIBLIOGRAFICA

ETIOLOGÍA.

Características generales.

El agente causal de la paratuberculosis, *Mycobacterium avium* subespecies *Paratuberculosis* (*MAP*) es un microorganismo de crecimiento lento perteneciente al género *Mycobacterium*, el único dentro de la familia *Mycobacteriaceae* que a su vez se encuadra en el orden de los Actinomicetales, donde también se incluyen géneros como *Nocardia* y *Corynebacterium*, los cuales comparten algunas características semejantes con las micobacterias (Wayne y Kubica 1986). Todas las especies del género *Mycobacterium* deben cumplir al menos las siguientes condiciones (Levy-Frebault y Portaels, 1992; Shinnick y Good, 1994):

- Resistencia a la decoloración con ácido-alcohol.
- Presencia de ácidos micólicos de 60-90 carbonos que por pirolisis se degradan a metil-ésteres de ácidos grasos de 22 o 26 carbonos
- Contenido de G+C en su ADN cromosomal de entre un 61 y un 71%.

Además de estas condiciones, el género *Mycobacterium* presenta un grupo de Genes denominados ESAT-6 que no han sido mantenidos en otros géneros y que codifican diferentes proteínas, algunas relacionadas con la inducción de respuesta inmune (Gey Van Pittius, 2001).

MAP fue estudiada desde el punto de vista bacteriológico por primera vez por Johnne y Frothinghan en 1895, aunque su crecimiento en medio de cultivo no se consiguió hasta 1913 por Twort e Ingram, que denominaron al microorganismo *Mycobacterium johnei*. El nombre de *Mycobacterium paratuberculosis* fue propuesto por Bergey en 1923, y ha sido el más aceptado durante largo tiempo. Actualmente se considera al agente causante de la paratuberculosis como una subespecie dentro del complejo *Mycobacterium avium* (Thorel y cols., 1990).

Morfológicamente es un cocobacilo de 1 ó 2 x 0,5 micras de tamaño, Gram+, aunque se tiñe débilmente por esta técnica, inmóvil, aerobio o microaerobio (Chiodini y cols., 1984a) con tendencia a formar grumos, y que crece sin formar cordones (Thorel y cols., 1990). Al igual que otras especies del género, *MAP* tiene la capacidad de resistir la decoloración al ser tratado con ácido o con alcohol ácido, por lo que el método de Ziehl-Neelsen es considerado aún como el más útil para teñir estos microorganismos.

Las principales características para su identificación han sido tradicionalmente su lenta velocidad de crecimiento en medios de cultivo y la necesidad de micobactina (Chiodini y cols., 1984a; Thorel y cols., 1990).

Al igual que otros géneros y otras especies de micobacterias, *MAP* puede alterar su estructura, perdiendo total o parcialmente su pared celular, lo cual modifica sus características morfológicas, tintoriales y fisiológicas. Se distinguen tres tipos: los esferoplastos que han perdido parte de esta pared celular pero conservan restos de la misma, los protoplastos, formas bacterianas sin ningún resto de pared, ambas formas pueden revertir a bacterias completas pero no se pueden multiplicar de forma seriada.

Por último, las células L, que aún carentes de pared celular, son capaces de multiplicarse de forma seriada, produciendo colonias con morfología característica. Esta característica se cree que es debida a un reforzamiento de la membrana celular y desarrollo de mecanismos compensadores que las permite resistir cambios osmóticos (McGee, 1971). Estas células bacterianas de pared defectiva, parece que podrían desempeñar un papel importante en las fases iniciales de la infección, permaneciendo en células presentadoras de antígeno del epitelio intestinal (García Marín y cols., 1992a).

Dentro del género *Mycobacterium* las diferentes especies pueden clasificarse según su velocidad de crecimiento. Así se denominan micobacterias de crecimiento rápido si tardan menos de 7 días en crecer en medios de cultivo, o de crecimiento lento si tardan más tiempo en aparecer las primeras colonias visibles. Dentro estas últimas se encuadra *MAP* (Granje 1990). Esta característica se debe a su bajo ritmo metabólico con un tiempo de generación muy superior a la mayoría de otras bacterias. Sin embargo este hecho le confiere la ventaja de resistir en medios con escasos nutrientes o condiciones adversas, ayudada por la gruesa pared celular que le confiere una notable resistencia frente a agresiones fisico-químicas (Juste y cols, 2000).

Medios de cultivo.

El aislamiento primario de *MAP* es complicado debido al gran número de microorganismos contaminantes generalmente presentes en las muestras, al requerimiento de factores accesorios (Merkal y Larsen, 1962) y a su lenta

velocidad de crecimiento, precisando más de seis semanas hasta que se observan las primeras colonias (Chiodini y cols., 1984a),

Debido al largo tiempo de incubación que precisa, los medios para el cultivo de *MAP* deben de ser capaces de aportar los nutrientes necesarios sin que estos se degraden durante un prolongado periodo, por lo que es muy importante evitar las contaminaciones de los medios utilizando tubos de vidrio herméticos así como antibióticos (Penicilina y Cloranfenicol) y antifúngicos (Anfotericina B). Además los medios de cultivo deben de contener fuentes de carbono y nitrógeno, macroelementos como el Ca, oligoelementos como el Fe, S y P, agentes solidificantes y colorantes (Marco y Adúriz, 1990; Juste y cols, 2000). Otras sustancias como el piruvato sódico parece tener un efecto estimulador del crecimiento en las cepas bovinas e inhibidor en las ovinas (Juste y cols., 1991b).

Según la clasificación de Marco y Adúriz (1990) los medios de cultivo pueden dividirse en:

- Medios a base de huevo, como el de Herrold y el Löwenstein-Jensen, que han sido tradicionalmente los más utilizados.
- Medios a base de suero, los cuales precisan decontaminación de la muestra y presentan una mayor limitación de tiempo.

Persistencia en el medio.

MAP es un parásito intracelular facultativo, que se aísla a partir de mucosa intestinal, linfonodos y heces de animales enfermos de paratuberculosis (Chiodini y Van Kruiningen, 1986; Merkal y cols., 1987) y es capaz de resistir elevados periodos de tiempo en diferentes condiciones en la naturaleza (Larsen y cols., 1956), principalmente en suelos neutros ó ácidos (Kopecky, 1977). Es muy resistente en heces, sobre todo si estas se desecan, pudiendo permanecer viable en este medio hasta 47 meses. Del mismo modo y aunque la orina parece tener un ligero poder inhibitorio, es capaz de resistir en agua hasta 9 meses (Larsen y cols., 1956, Merkal y Whipple, 1982; Chiodini y cols, 1984), incluso resistiendo concentraciones de clorina de 2 g./ml durante 30 minutos (Whan y cols., 2001). El agente causal de la paratuberculosis resiste la

congelación a -20°C durante al menos un año, sin que parezcan existir problemas para su posterior cultivo en los medios habituales (Chiodini y cols, 1984; Juste y cols, 2000). De igual forma entre un 3 y un 5% de las micobacterias podrían sobrevivir a la pasteurización (Chiodini y Hermon-Taylor, 1993; Rowan y cols., 2001), aunque parecen ser susceptibles a la combinación de temperatura y aplicación de campos eléctricos pulsátiles (Rowan y cols, 2001).

En sentido contrario, *MAP* es un microorganismo muy sensible a la luz solar y a un gran número de desinfectantes, sobre todo si se usan conjuntamente con detergentes y a una dilución adecuada (Merkal y Whipple, 1982). De esta forma el hipoclorito sódico, el formol al 5%, la cianamida cálcica, cresoles y fenoles al 3 y 2,5%, bicloruro de mercurio al 0,1% o el hipoclorito cálcico (2%) son eficaces si actúan durante tiempo suficiente y sobre superficies sin restos de materia orgánica seca (Chiodini y cols, 1984; Juste y cols, 2000).

Estructura de *MAP*.

Las principales propiedades estructurales y antigénicas de *MAP* proceden de su compleja pared celular (Merkal y cols., 1965; Stanford, 1983; Grange, 1990), común al resto de las micobacterias y que está formada internamente por una capa de peptidoglicanos llamada mureina que le confiere rigidez y forma, siendo también responsable del poder adyuvante de la micobacteria; más externamente se sitúa la capa de arabinogalactano, a la que se unen los ácidos micólicos hacia el exterior, principales responsables de la ácido-alcohol resistencia y entre los que existen sulfolípidos y dimicolatos de trealosa ("Cord factors"). Por último, la capa más externa está formada por micósidos, un complejo grupo de glucolípidos de superficie, característicos de cada especie y que permite a las micobacterias patógenas resistir la acción de las enzimas lisosomales (Grange, 1990). Una molécula que parece tener bastante importancia es el Lipoarabinomanano (LAM), un lipopolisacárido que, anclado a la membrana plasmática, sale hasta el exterior de la bacteria y que se cree que juega un papel destacado en la patogenicidad de las diferentes cepas de micobacterias, siendo diferente su estructura entre las cepas ovinas y bovinas. Además parece que presenta cierta utilidad como antígeno en diferentes test diagnósticos (Reichel y cols., 1999; Valentin- Weigand y Goethe, 1999).

Los antígenos micobacterianos han sido clasificados en cuatro grandes grupos (Stanford, 1983):

- Antígenos de grupo comunes a todas las especies de micobacterias e incluso de géneros como *Nocardia* y *Corynebacterium*, que podrían ser los causantes de las reacciones cruzadas que existen con diferentes especies de *Corynebacterium* (Larsen y Johnson, 1947; Pepin y cols., 1987).
- Antígenos propios de micobacterias de crecimiento rápido.
- Antígenos propios de especies de crecimiento lento.
- Antígenos específicos de cada especie concreta e incluso de cada subespecie.

La estructura y composición de *MAP* resulta importante a fin de identificar y obtener las sustancias con mayor poder antigénico para su utilización en pruebas de diagnóstico inmunológico. En 1944 Johnson obtuvo un extracto proteico purificado semejante al obtenido para diagnóstico de tuberculosis, llamado Johnina y utilizado en pruebas de inmunidad celular (Baisden, 1950).

El antígeno protoplasmático crudo (PPA-3) parece haber sido uno de los antígenos más ampliamente utilizado en los últimos años en técnicas serológicas (Yokomizo y cols., 1983; Bech-Nielsen y cols., 1985; Adúriz, 1993; García Marín y cols., 1994; Pérez y cols., 1997). Sin embargo se han detectado hasta 20 proteínas serologicamente reactivas, después de la rotura del microorganismo por sonicación (Bech-Nielsen y cols., 1985). Otro grupo de componentes que inducen respuesta inmunológica son las denominadas “heat shock proteins”, obtenidas tras someter al microorganismo a un stress térmico (Young y cols., 1990). Asimismo se han identificado secuencias en el genoma de *MAP* que codifican diversas proteínas causantes de una fuerte respuesta humoral y celular en los individuos infectados con esta micobacteria, entre las que destacan una proteína de 40 KD (Stevenson y cols., 1992) y una superóxidodismutasa (Sod) secretada por diferentes micobacterias, que podría estar relacionada con la capacidad patogénica de las mismas (Liu y cols., 2001) y a su vez capaz de provocar una marcada respuesta inmune celular en el hospedador.

Otras proteínas descubiertas recientemente que podrían tener utilidad como antígenos específicos en pruebas de diagnóstico serológico son las Alkyl hidroperoxido-reductasas C y D, específicas de *MAP*, y una proteína de secreción de 14 kDa producida por micobacterias del complejo avium (Olsen y cols., 2001a). Otro tipo de proteínas, la Pks7 y la Csp1, son reconocidas por suero de conejos infectados de forma experimental con *MAP* vivas, pero no por suero de conejos infectados con las mismas micobacterias inactivadas (Bannatine y Stabel, 2001), sin embargo estas proteínas son similares a otras existentes en el género *Corynebacterium* o en otras especies de micobacterias.

Cepas de *MAP* y relación con otras micobacterias.

La existencia de varias cepas de *MAP* fue señalada por Taylor en 1951 al identificar, según requerimientos y características de cultivo, tres variedades: una cepa bovina que también afectaba a otras especies, una cepa ovina pigmentada, y otra cepa ovina no pigmentada aislada en ovejas procedentes de Islandia, resultando las dos últimas las más difíciles de cultivar. Se ha señalado además, que la cepa pigmentada podría presentar una mayor virulencia (Stamp y Watt, 1954). Estas diferencias, en cuanto a los

requerimientos para el cultivo han sido comprobadas posteriormente por varios autores (Juste y cols., 1991b; Muskaens y cols., 2000; Whittington y cols., 2001c) quienes comprobaron que las cepas de pequeños rumiantes son más difíciles de cultivar que las cepas bovinas y al contrario que éstas, ven inhibido su crecimiento por el piruvato sódico (Juste y cols., 1991b). En este sentido y en base a pruebas genéticas se han establecido dos grandes grupos de *MAP*, uno de los cuales englobaba las cepas ovinas y caprinas y el otro las cepas bovinas y de otros animales (Collins y cols., 1990; Whittington y cols., 2001c). Además y desde el punto de vista de la capacidad infectiva, se ha demostrado que algunas cepas de origen caprino tienen poca patogenicidad para el ganado bovino (Saxegaard, 1990). Esta distinción desde el punto de vista genético no parece estar reflejada de una forma tan clara en el campo, ya que en Australia e Islandia se encuentran cepas ovinas que causan la enfermedad en ganado bovino (Whittington y cols., 2001c) mientras que en Bélgica, el ganado ovino puede adquirir la infección y desarrollar la enfermedad a partir de cepas bovinas (Muskaens y cols., 2000). En este mismo sentido, Pillai y cols., 2001 en EEUU encuentran similitudes genéticas entre cepas aisladas en caprino y en ovino con otras aisladas a partir de bovino. Estos mismos autores encuentran hasta 6 genotipos diferentes de micobacterias en 201 muestras de vacas afectadas de paratuberculosis.

La estrecha relación de *MAP* con otras especies o subespecies del género *Mycobacterium* se puso de manifiesto desde el comienzo de su investigación, ya que Johne y Frothingham consideraban al agente causante de la enfermedad un bacilo tuberculígeno aviar, relación que se ha comprobado posteriormente al observarse la existencia de reacciones inmunológicas cruzadas (Smythe, 1951; Stanford, 1983; Burrells y cols., 1995; Nielsen y cols., 2001) y al comprobarse experimentalmente que dicho agente puede llegar a producir lesiones tuberculosas en pollos (Van Kruiningen y cols., 1991). También se ha descrito la relación existente entre *MAP* y micobacterias aisladas a partir de palomas torcaces dependientes de micobactina, capaces de producir en terneros lesiones semejantes a las observadas en la paratuberculosis clínica (Matthews y McDiarmid, 1979).

Teniendo en cuenta estos datos y basándose en criterios microbiológicos y genéticos, Thorel y cols en 1990 propusieron un cambio de nomenclatura,

clasificando las distintas cepas del complejo *Mycobacterium avium* en cuatro grupos:

- Grupo 1, engloba cepas de *Mycobacterium paratuberculosis* y cepas obtenidas de pacientes con enfermedad de Crohn, que pasan a denominarse *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.
- Grupo 2, engloba cepas de *M. intracellulare* y *M. avium* que pasan a denominarse *Mycobacterium avium* subsp. *avium*.
- Grupo 3, engloba cepas de micobacterias aisladas de palomas torcaces que pasan a denominarse *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum*
- Grupo 4, engloba una única cepa vacunal de *M. paratuberculosis* aislada en Weybridge en 1940.

Actualmente las técnicas de identificación genéticas son las más ampliamente utilizadas para diferenciar las tres principales subespecies del complejo *Mycobacterium avium*. Estas técnicas están basadas en la detección de secuencias de inserción específicas de cada subespecie; así para *MAP* son la IS900 (Green y cols., 1989; Collins y cols., 1990), la IS1311 (Whittington y cols., 2001b) y la IS *Mav2* (Strommenger y cols., 2001), si bien la primera de ellas no parece ser tan específica como se creía (Cousins y cols., 1999; Bölske y cols., 2002). Para *M. a. avium* la secuencia de inserción específica es la IS901 (Kunze y cols., 1992) que permite expresar una proteína, la p40 con capacidad antigénica (Inglis y cols., 2001).

La relativa difusión y éxito de estos métodos de identificación se deben a una relativa mejora y simplicidad de las técnicas genéticas, donde destaca la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y la mayor homogeneidad y universalidad de los caracteres genéticos frente a los fenotípicos (Juste y cols., 2000).

PATOGENIA.

Vía de contagio.

Parece bastante claro que la vía de contagio principal es la digestiva, al ingerir los animales jóvenes de material contaminado con restos fecales procedentes de individuos que excretan micobacterias en heces, principalmente cuando estos animales jóvenes maman de ubres manchadas (Chiodini y cols., 1984a; Blood y cols., 1989; Juste y Adúriz, 1990b; García Marín y cols., 2000). Se han

demostrado otras vías aunque de escasa importancia, a partir de las que los animales que pueden ingerir la bacteria, como por ejemplo la leche o el calostro, donde vacas con paratuberculosis clínica (Taylor, 1951) o subclínica (Streeter y cols., 1995; Millar y cols., 1996) pueden llegar a excretar *MAP*, aunque en pequeñas cantidades y solamente por parte de animales que excretan micobacterias en heces. También se ha propuesto la vía uterina como mecanismo de contagio, pero de forma muy ocasional y no presentando en la práctica ninguna importancia (Reddy y cols., 1984; Rebhun, 1995) si bien diversos autores han aislado *MAP* en vacas infectadas, tanto con síntomas clínicos como sin ellos, a partir de cotiledones, mucosa uterina e incluso tejidos fetales (Doyle y Spears, 1951; Kopecky y cols., 1967); también se ha aislado del tracto genital y semen de toros que padecían la enfermedad, aunque esta vía de infección no se ha llegado a demostrar (Larsen y cols., 1981). Igualmente se ha constatado en animales excretores, la presencia del agente causal de la paratuberculosis en huevos de tricoestróngilos que puede permanecer viable en los mismos hasta el desarrollo de la larva 3 (Whittinton y cols., 2001a) y en diversas especies de moscas (Fischer y cols., 2001), si bien no ha sido confirmada la participación de ninguno de estos vectores en la transmisión de la enfermedad.

Entrada de *MAP* en el organismo y desarrollo lesional.

Una vez ingerida la micobacteria, se ha considerado la posibilidad de que el agente de la paratuberculosis tuviera como asiento primario en el organismo las tonsilas y linfonodos retrofaríngeos, desde donde se diseminaría a intestino y linfonodos mesentéricos (Payne y Rankin, 1961). Sin embargo, otros estudios experimentales realizados en ganado ovino y caprino, encuentran, en los estados iniciales de la infección, que la mayoría de las lesiones se localizan en placa de Peyer intestinal y linfonodos mesentéricos (Brotherson y cols., 1961; Nisbet y cols., 1962; Van Kruiningen y cols., 1986; Juste y cols., 1994; Sigurdardottir y cols. 1999). Por ello, se considera que la infección paratuberculosa está estrechamente ligada, en sus fases iniciales, al tejido linfoide intestinal. En este sentido, algunos autores han propuesto que las primeras lesiones se localizarían, en este tejido, a nivel de la válvula ileocecal, extendiéndose por la lámina propia adyacente y progresando en sentido

craneal, por contigüidad, en relación con los espacios interfoliculares (Juste y cols., 1994).

Se cree que la forma de entrada de *MAP* en el tejido linfoide intestinal es a través de las células M situadas en el epitelio de revestimiento de las cúpulas de la placa de Peyer, las cuales actuarían degradando y presentando los antígenos a otras células del sistema inmune (Momotami y cols., 1988; García Marín y cols., 1992a; Snider y cols., 1992; Sigurdardottir y cols., 1999).

Una vez que las micobacterias penetran en las células M, son transportadas en vacuolas, en algunos casos previamente degradadas, a macrófagos subepiteliales e intraepiteliales de la lámina propia adyacente a la placa de Peyer, donde se localizan en el interior de fagosomas (Chiodini, 1984; Valentin-Weigand y Goethe, 1999). Estos macrófagos son las células blanco de la infección paratuberculosa (Kaufmman, 1995) pudiendo el microorganismo resistir en el interior de estas células a los diversos mecanismos antimicrobianos, tales como la fusión fagosoma-lisosoma, mecanismos oxidativos, enzimas lisosómicas y producción de óxido nítrico. Sin embargo, aunque no se conocen con exactitud los mecanismos últimos responsables de esta resistencia, se cree que la pared celular de la micobacteria sería un factor primordial, así como la inhibición de la acidificación del medio, producción de sulfatos, glicolípidos y actividad de la enzima superóxido-dismutasa los cuales inhibirían el sistema oxidativo y producción de óxido nítrico de los macrófagos (Clarke, 1997; Valentin-Weigand y Goethe, 1999; Cheville y cols., 2001; Harris y Barletta, 2001; Liu y cols., 2001). Sin embargo, en la mayoría de los casos, el sistema antimicrobiano de los macrófagos es capaz de destruir a la micobacteria. Para ello previamente debe de ser estimulado por diversos mediadores celulares producidos principalmente por linfocitos T. Esta estimulación inmunológica proviene de los diferentes antígenos de *MAP*, entre los que parecen destacar el Lipoarabinomamano (LAM) y las proteínas de choque térmico, que son presentadas por el complejo mayor de histocompatibilidad tipo II a los linfocitos T (Stabel, 2000). Se produce entonces una compleja interacción entre los diferentes procesos inmunológicos (apartado II-2.3), en ocasiones contrapuestos, que van a tener como resultado que los macrófagos destruyan la micobacteria y por lo tanto el animal supere la infección, o que la micobacteria logre sobrevivir, lo que conducirá a que el

animal desarrolle la enfermedad clínica o permanezca durante largos periodos de vida como portador asintomático de la enfermedad excretando *MAP* (Rankin, 1961; Gilmour y cols., 1978; Blood y cols., 1989; Snider y cols., 1992; Storset y cols., 2001). Se considera que la evolución hacia uno u otro estado depende de diversos factores, como por ejemplo la distinta patogenicidad de las cepas de *MAP*, tanto intraespecífica como interespecífica (Stamp y Watt, 1954; Saxegaard, 1990), el tiempo de exposición a la bacteria y la dosis recibida (Whithlock y Buergelt, 1996) y fundamentalmente la respuesta del hospedador (García Marín y cols., 1994; Clarke, 1997). Dicha respuesta se reconoce que está influida por factores como la edad (Doyle y Spears, 1951; Larsen y cols., 1975; Withlock y Buergelt, 1996), la dieta (Doyle y Spears, 1951; Snider y cols., 1992), condiciones de stress, cambios hormonales como los que ocurren durante el parto (Reddy y cols., 1984; Kreeger, 1991; García Marín y cols., 1994; Rebhun, 1995).

Estudios realizados "in vitro" en este sentido indican que la hormona del crecimiento y la prolactina afectan negativamente a la capacidad de los monocitos sanguíneos bovinos para fagocitar y destruir al agente causal de la enfermedad (Feola y cols., 1999). En último término, el estado inmunológico general del animal también determina la capacidad del mismo para evitar que la infección progrese (Gilmour y cols., 1978; Clarke y cols., 1996).

Finalmente una vez que se desarrolla la enfermedad, la causa principal de degradación de la condición corporal que sufren los animales enfermos podría ser la pérdida constante de proteínas por vía gastrointestinal, que en ganado bovino llega a ser de 39 gr. diarios más que en los animales sanos (Patterson y cols., 1967).

Respuesta inmune del hospedador y relación con el espectro patológico.

Una vez que la micobacteria ha penetrado en el organismo y las células M la han transportado hasta los macrófagos subyacentes, se desencadenan una serie de procesos inmunológicos regulados por las células del sistema inmune mediante la producción de diferentes linfoquinas. Así en un primer momento, los macrófagos reciben la micobacteria y presentan los antígenos a los linfocitos T, los cuales liberan IL-2. Esta linfoquina provoca una expansión de los clones de linfocitos T CD8+ citolíticos y de los T CD4+ helper. En un primer

momento, la respuesta inmunológica parece estar mediada por linfocitos CD4+ Th1, los cuales producen entre otros interleuquina 2(IL-2), γ -Interferón (γ -IFN), Factor de Necrosis Tumoral (TNF) y GM-CSF (Kaufmann, 1995; Clarke, 1997; Begara-McGorum y cols., 1998; Valentin Weigand y Goethe, 1999).

Estas sustancias son capaces de atraer y activar a los macrófagos, logrando una mayor capacidad de los mismos para destruir a los microorganismos fagocitados y por lo tanto una regresión y resolución de la infección (Flesch y Kaufmann, 1990; Huygen y cols, 1994). En esta primera fase, la respuesta inmune se limita al tejido linfoide intestinal y linfonodos asociados, aunque en ocasiones no se refleja en sangre periférica hasta al menos los 270 dpi (Begara-McGorum y cols., 1998; Sigudardorttir y cols, 1999).

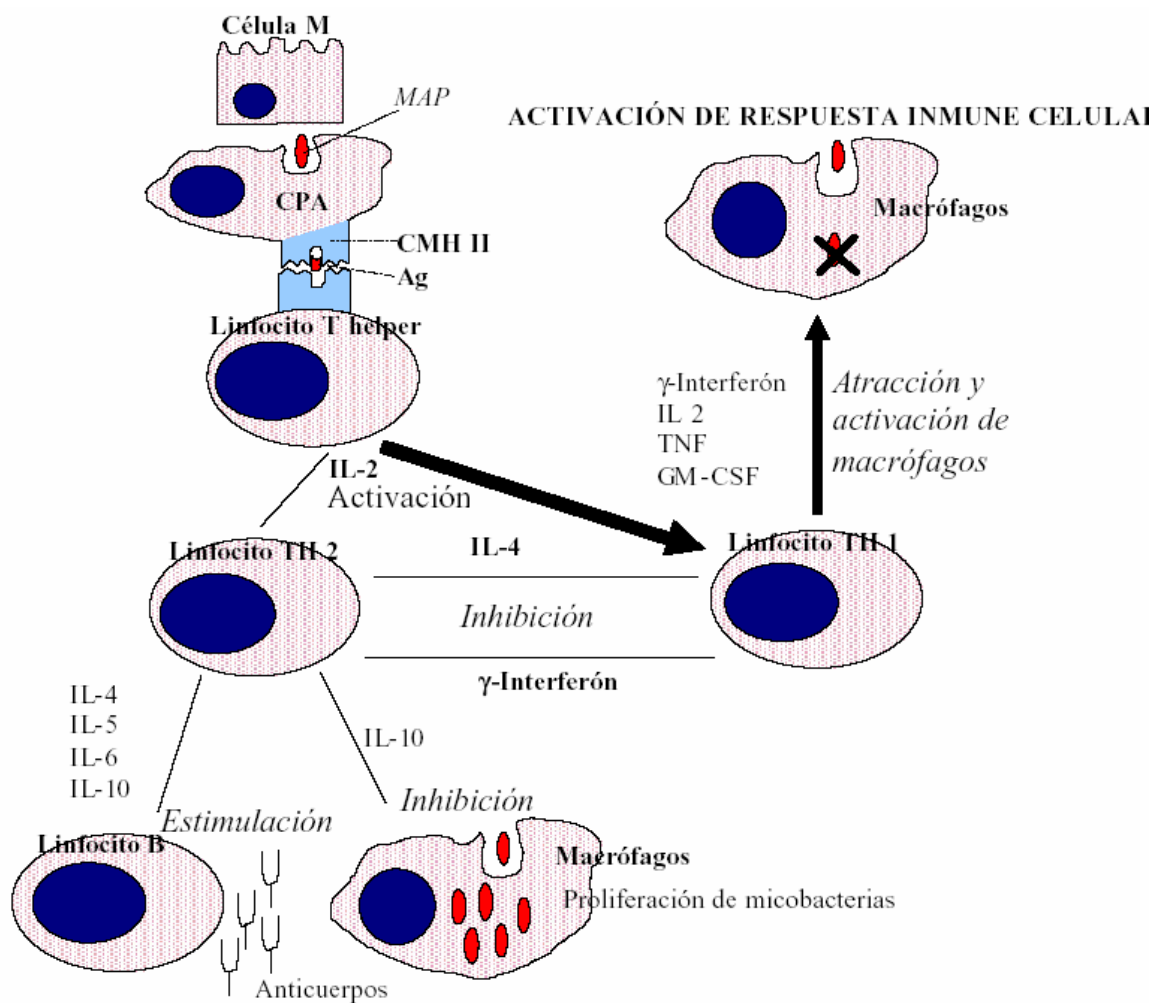
Sin embargo, el mecanismo descrito no siempre es eficaz y cuando no es destruida, la bacteria permanece latente en los linfonodos yeyunales, escapando a los mecanismos de inmunidad citados (Begara-McGorum y cols., 1998; Sigudardorttir cols, 1999). La evolución del proceso puede entonces variar entre una depresión de la respuesta inmune celular con proliferación y diseminación de las micobacterias (Stabel, 2000) y una respuesta inmune celular desmedida (Buergelt y cols., 1978; Clarke, 1997), en ambos casos con extensión de las lesiones a amplios tramos intestinales y desarrollo de la enfermedad clínica.

Si bien no se conocen las causas exactas que originan el fallo en la respuesta inmunológica, se sabe que en el primer caso, el fracaso de la respuesta inmune celular, podría estar relacionadas con una deficiente presentación del antígeno por parte de los macrófagos, debido a una reducción en el número de moléculas de MHC II y del factor de adherencia, (Alzuherri y cols, 1997; Cheville y cols., 2001). Esta reducción podría estar causada a su vez por elementos de *MAP*, posiblemente localizados en la pared celular (Weiss y cols., 2001). Otro factor que conduciría al fracaso de la respuesta inmune celular, sería la proliferación de linfocitos T, los cuales inhiben la actividad de los CD4+ Th1, y por lo tanto disminuyen la liberación de las citoquinas activadoras de los macrófagos (Chiodini y Davis, 1993). Por otra parte, a partir de estudios realizados sobre la tuberculosis humana, se sabe que algunos componentes de las micobacterias tienen por sí mismas propiedades inmunosupresoras (Ellner y Wallis, 1989).

Una vez que ha fallado el mecanismo inmune celular y las micobacterias proliferan, se produce un cambio progresivo en el tipo de respuesta, pasando éste de ser de tipo Th1 a Th2. Los linfocitos CD4+ Th2 producen entre otras IL4 e IL10, las cuales suprimen la respuesta Th1 promoviendo la proliferación de linfocitos B y la producción de anticuerpos. En este momento, la inmunidad celular, más efectiva en la contención de la micobacteriosis, cesa y prevalece la inmunidad humoral, escasamente eficaz frente a parásitos intracelulares como es el caso de *MAP*, que en estas condiciones prolifera sin obstáculos (Boros, 1992; Kaufmann, 1995; Alzuherri y cols, 1997; Begara-McGorum y cols, 1998). Estos animales presentarían entonces una forma lesional grave de tipo lepromatoso, con elevado nivel de anticuerpos séricos y escasa reactividad a las pruebas de inmunidad celular. Sin embargo, en la patogenia de la paratuberculosis en rumiantes, también se observan formas lesionales graves que ocasionan la muerte de los animales, pero con escasa cantidad de micobacterias en las mismas. Estas formas se corresponderían con lesiones cercanas al extremo tuberculoide del espectro, siendo desde el punto de vista patogénico una respuesta inmune celular desproporcionada, mediada por linfocitos CD4+ Th1, que incluso algunos autores consideran como un fenómeno de hipersensibilidad retardado tipo IV (Buergelt y

cols., 1978; Little y cols., 1996; Clarke, 1997). En estos casos, a nivel periférico las citoquinas liberadas en este tipo de respuesta inmune como el γ -IFN se encuentran en niveles elevados, mientras que la respuesta inmune humoral y la presencia de micobacterias sería muy escasa (Clarke, 1997; Pérez y cols., 1999).

En cualquier caso, las lesiones multifocales existentes en la paratuberculosis y las diferencias histológicas entre los distintos focos que se observan en algunos casos (Corpa y cols., 2000a) podrían indicar que, al igual que en la tuberculosis, cada nuevo foco de infección podría ser tratado desde el punto de vista inmunológico del hospedador de forma independiente (Dannenbergh, 1968; Chiodini, 1989).



EPIDEMIOLOGÍA E IMPORTANCIA ECONÓMICA.

Hospedadores susceptibles.

La paratuberculosis es una enfermedad que afecta a todos los rumiantes domésticos y salvajes (Chiodini y cols., 1984a; Blood y cols., 1989; Maning y Collins, 1999), si bien es en los primeros donde mejor se ha descrito y mayor importancia tiene. Sin embargo, el agente causal de esta enfermedad también se ha aislado, aunque de forma esporádica, en animales domésticos monogástricos como el cerdo, el caballo e incluso en las aves (Larsen y cols., 1971, 1972; Van Kruiningen y cols., 1991; Beard y cols., 2001). Mayor importancia desde el punto de vista epidemiológico podría tener el aislamiento de *MAP* a partir de heces y tracto intestinal de diversas especies silvestres, como el tejón, zorro, comadreja, liebre, ratas o ratones, (Beard y cols., 2001), y sobre de conejos silvestres en Gran Bretaña (Angus, 1990; Greig y cols., 1997,

Beard y cols., 2001), o de bisontes en EEUU (Burgelt y cols., 2000). En el caso de los conejos, la importancia está determinada por la elevada prevalencia que puede llegar a tener la enfermedad en algunas regiones, por el contacto que se establece entre las heces de éstos y los bovinos en el pasto (Daniels y cols., 2001) y sobre todo por la capacidad de la micobacteria aislada en los conejos de reproducir experimentalmente la enfermedad en ganado vacuno (Beard y cols., 2001). En el caso de los bisontes en EEUU, y aunque en un principio se consideró la posibilidad de contagio a la especie bovina, se ha demostrado mediante técnicas genéticas que las cepas de *MAP* que infectan a una y a otra especie son diferentes, aunque por el momento no se ha comprobado si la transmisión de la infección entre ambas es posible (Whittington y cols., 2001b).

Distribución y prevalencia de la paratuberculosis en ganado bovino.

La paratuberculosis es una enfermedad de distribución mundial (Kátic, 1977; Blood y cols., 1989), aunque se ha aceptado la diferencia de prevalencias según regiones.

El método más utilizado para estimar la prevalencia de la enfermedad en ganado bovino ha sido el cultivo a partir de heces, mucosa intestinal ó linfonodos (Chiodini y Van Kruiningen, 1986; Merkal y cols., 1987; De Lisle y Milestone, 1989). Siguiendo este método, Chiodini y Van Kruiningen en 1986 obtuvieron sobre muestras elegidas al azar de ganado vacuno sacrificado en mataderos de Nueva Inglaterra, un 18% de animales positivos al cultivo estudiando íleon, ciego, hígado y tonsilas junto con válvula ileocecal y linfonodos cecales, siendo estas últimas localizaciones las que ofrecieron el mayor número de resultados positivos. Sin embargo, Merkal y cols., en 1987 realizaron el cultivo a partir exclusivamente de linfonodos ileocecales procedentes de ganado bovino sacrificado en distintos mataderos de EEUU, obteniendo un 1,6% de resultados positivos. Aunque el propio autor reconoce que el cultivo de íleon y heces permitiría obtener un mayor número de animales positivos, el linfonodo ileocecal es la mejor muestra de tejido simple para aislar *MAP*. Utilizando métodos similares se obtuvieron tasas de infección de un 2,3% y un 9,8% en Dinamarca entre los años 1965 y 1972 (Jorgensen, 1965; Jorgensen, 1972), un 2,6% en Gran Bretaña, que se elevaba hasta un 3,5%

cuando la técnica de diagnóstico empleada era la PCR (Cetinkaya y cols., 1996). Sin embargo en otros países, como Irlanda, la prevalencia de la enfermedad parece ser bastante baja, ya que únicamente se registraron 92 casos de animales enfermos entre 1932 y 1982 en animales remitidos a centros de diagnóstico (Egan y cols., 1999). El otro grupo de técnicas habitualmente empleadas para conocer la tasa de prevalencia de la infección en el conjunto de la cabaña bovina de una región o país, han sido las serológicas principalmente el ELISA en sus diferentes variantes.

Otros trabajos han estado orientados a conocer la tasa de rebaños infectados en determinadas regiones. En este sentido según un estudio realizado sobre 1219 rebaños de 20 estados de EEUU, mediante encuesta, el 26% de los propietarios reconocían la existencia de animales con signos clínicos compatibles con la enfermedad, mientras que cuando se utilizaba la técnica de ELISA el 22,2% de los rebaños presentaban algún animal positivo (Ott y cols., 1999), valor que disminuye hasta un 7,9% en otro estudio similar realizado sobre 380 rebaños de aptitud cárnica (Dagazt y cols., 2001a). uno de los factores que podrían influir en las diferentes prevalencia de la enfermedad es el tipo de suelo, ya que cuando estos son ácidos, la tasa de rebaños afectados parece ser mayor (Kopecky, 1977; Michel y Bastianello, 2000), según algunos autores debido a una mayor disponibilidad de hierro (Johnson-Ifearewundu y cols., 1999a; Michel y Bastianello, 2000), o bien a que estos suelos son más pobres, produciendo un mayor estrés nutritivo en los animales que favorecería el establecimiento de la enfermedad (Adúriz y cols., 2000). Otros autores sin embargo no encuentran relación entre el tipo de suelo y la prevalencia de la enfermedad (Turnquist y cols., 1991).

Cuando se ha estudiado la prevalencia de la paratuberculosis dentro de los rebaños, se ha encontrado que ésta ha sido variable incluso al contemplar rebaños de una misma región. Así De Lisle y Milestone en 1989, estudiando 6 explotaciones de ganado bovino de leche, encuentran que el número de animales positivos al cultivo fecal variaba entre el 2 y el 16 %. En otro estudio realizado por Hardin y Thorne, en 1996 y utilizando técnicas de ELISA sobre 12 rebaños de leche afectados por la enfermedad, la seroprevalencia variaba entre un 1,7 y un 42%. En otros países como Canadá esta tasa variaba entre un 7 y un 10% (VanLeeuwen y cols., 2001), mientras que en Nueva Zelanda,

en un estudio realizado en 3 rebaños y empleando el cultivo fecal, entre el 20,6 y el 26,3% de los animales eran excretores (Reichel y cols., 1999). Se ha descrito que el manejo es un factor que puede determinar el nivel de enfermedad dentro de un rebaño, ya que algunos autores han observado una mayor prevalencia en rebaños de ganado vacuno de leche que en rebaños de carne (Merkal y cols., 1987; Braun y cols., 1990; Gastenier y cols., 1999) que se cree que es debido principalmente a un mayor confinamiento, más que a una predisposición de las razas (Merkal y cols., 1987; Scott- Orr y cols., 1988; Braun y cols., 1990). Otros investigadores, por el contrario han encontrado mayor prevalencia dentro de rebaños de carne y aptitud mixta que en rebaños de leche (Boelaert y cols., 2000). Además, se ha señalado que la prevalencia dentro de un rebaño es mayor cuanto mayor sea el tamaño del mismo (Braun y cols., 1990).

En los últimos años se ha realizado un estudio de prevalencia de la infección sobre 200 animales sacrificados en mataderos de España en el País Vasco y utilizando el cultivo sobre muestras de linfonodo yeyunal caudal, válvula ileocecal y heces, encontrándose una tasa de infección del 0,5% (Adúriz y cols., 2000). Sin embargo, el porcentaje de esos mismos animales positivos a las técnicas de ELISA, PCR e histopatología fue del 19,4%, 15,4% y 4,7% respectivamente (Garrido, 2001). Mediante las 4 técnicas en conjunto se estimó una prevalencia del 31,3%.

MANIFESTACIONES CLÍNICAS.

La paratuberculosis es una enfermedad caquetizante que tiene como signo característico común para todas las especies el adelgazamiento crónico (Stamp y Watt, 1954; Aller y cols., 1973; Blood y cols., 1989; Barker y cols., 1993; García Marín y cols., 1994; Pavlik y cols., 2000), si bien parece haber algunas diferencias en otras manifestaciones según la especie afectada.

En el ganado bovino se ha descrito como habitual la existencia de periodos intermitentes de diarrea que no responden eficazmente a tratamiento. Cuando esto ocurre y el animal no es sacrificado, la pérdida de peso progresiva conduce a un debilitamiento acompañado de atrofia muscular, edemas en partes declives y mal estado del pelo, aunque el apetito y el nivel de ingesta no parecen verse disminuidos. En la fase final el debilitamiento extremo concluye

con la postración y muerte de los individuos afectados (Sherman, 1985; Barker y cols., 1993; Corpa y cols., 1998; Pérez y cols., 2000). El curso de la enfermedad puede durar varias semanas e incluso meses, con periodos de recuperación transitoria (Juste y cols., 1983; Pérez y cols., 2000). Sin embargo, en ganado vacuno lechero de alta producción, los primeros síntomas, muy inespecíficos, pueden observarse previamente al desarrollo de diarrea y caquexia, al producirse una disminución en la producción láctea y en ocasiones alteraciones de la fertilidad. Este hecho conduce a una eliminación del animal antes de que llegue a manifestar la fase clínica de la enfermedad o cuando está en fase incipiente (Sherman, 1985; Pérez y cols., 2000). Existen asimismo animales infectados de forma subclínica, que nunca llegan a desarrollar la enfermedad clínica como tal (Sherman, 1985; Rebhun, 1995; Pérez y cols., 2000), pero en los que también se ha señalado la presencia de estos signos clínicos inespecíficos además de un posible incremento de susceptibilidad a padecer mamitis (Merkal y cols., 1975; Corpa y cols., 1998; Valentin-Weigand y Goethe 1999). Sin embargo, sólo un porcentaje de estos animales llegará a desarrollar la enfermedad clínica como tal.

Un hecho bastante característico de esta enfermedad es su aparición en animales adultos, aunque relativamente jóvenes, de entre 2 y 5 años de edad, generalmente durante la primera y segunda lactación, si bien también pueden padecerla animales mayores. Por contra, la paratuberculosis no se suele presentar en animales menores de 1,5 años (Sherman, 1985; Barker y cols., 1993; García Marín y cols., 1994; Pavlik y cols., 2000), aunque sí pueden ser excretores a partir de los 11 meses de edad (Kalis y cols., 1999b). En muchos casos los síntomas clínicos comienzan a manifestarse en las primeras semanas post-parto, coincidiendo con las mayores exigencias productivas y cambios hormonales, si bien factores como el stress, deficiencias en la nutrición o cambios en la alimentación pueden también favorecer el desarrollo de la fase clínica de la enfermedad (Doyle y Spears, 1951; Blood y cols., 1989; Barker y cols., 1993; Rebhun, 1995; Feola y cols., 1999).

Una vez que se ha iniciado el proceso, la mortalidad es del 100% aunque en ocasiones, la disminución de producción láctea, pérdida de condición corporal y diarrea, pueden conducir a un secado prematuro del animal que le permite recuperarse parcialmente hasta la siguiente lactación (Pérez y cols., 2000).

Cuando la paratuberculosis se encuentra instaurada en un rebaño, el número de animales que causan baja, como consecuencia del desarrollo de la enfermedad, puede oscilar entre un 1 y un 10% anual (Kopecky, 1977; Sherman, 1985; Blood y cols., 1989; Juste y cols., 1992a), si bien el número de animales infectados de forma subclínica que no llegan a manifestar síntomas específicos de la enfermedad puede llegar a ser más del 50% (Sherman, 1985; Whitlock, 1998; Van Kruiningen, 1995). Por lo tanto, se puede sospechar la presencia de la enfermedad en una granja de alta producción lechera cuando, además de animales de entre 2 y 5 años con síntomas clínicos característicos, existe una productividad por debajo de lo esperado en las primeras lactaciones de un alto porcentaje de vacas (Hansen y Rossiter, 1999).

CUADRO LESIONAL.

Lesiones macroscópicas.

Aunque cuando se realiza la necropsia de un animal afectado clínicamente de paratuberculosis, la caquexia, ascitis y presencia de edemas en zonas declives son las alteraciones más evidentes en muchos casos, las lesiones características y específicas se localizan en el intestino delgado y linfonodos relacionados con el mismo.

Macroscópicamente, se ha descrito como hallazgo principal el marcado engrosamiento y aspecto edematoso de la pared del intestino delgado, principalmente de tramos de íleon y yeyuno, provocando que externamente tengan la apariencia de un “tubo de goma”. En ocasiones también aparecen afectados el ciego y el colon. Al abrir los tramos alterados, la mucosa presenta un aspecto tumefacto y edematoso, con formación de gruesos pliegues que recuerdan a las circunvoluciones cerebrales y que no desaparecen al traccionar. El ápice de los pliegues en ocasiones aparece congestivo e incluso con pequeñas úlceras, en contraste con el resto de la pared intestinal, que muchas veces presenta un aspecto blanquecino (Hutyra y Marek, 1930; Buergelt y cols., 1978; Badiola y cols., 1979; Juste y cols., 1983; Barker y cols., 1993). El engrosamiento es muy característico en ganado bovino, aunque en

las especies ovinas y caprina no siempre aparece o puede hacerlo de forma muy tenue (Barker y cols., 1993; García Marín y cols., 1994; Corpa, 1995).

La linfangiectasia y en casos graves linfangitis, es otra lesión característica, que se observa en la serosa intestinal y mesenterio, principalmente en pequeños rumiantes, pero también aparece con relativa frecuencia en ganado bovino (Buergelt y cols., 1978; Barker y cols., 1993; Pérez y cols., 2000). En la misma, los vasos linfáticos aparecen como cordones blanquecinos o transparentes, de recorrido sinuoso y haciendo prominencia sobre la superficie de la pared intestinal, y en animales en los que la caquexia es extrema, también pueden verse en su recorrido a través del mesenterio hasta los linfonodos. Sin embargo, esta lesión no siempre es evidente en la especie bovina, siendo en algunos casos focal y poco aparente (Buergelt, y cols., 1978; Juste y cols., 1983; Pérez y cols., 2000).

Por su parte, los linfonodos yeyunales, así como los ileocecales aparecen tumefactos y edematosos, sin distinción clara entre cortical y medular en algunos casos o con presencia de una medular incrementada de tamaño y de color verduzco en otros.

En ganado caprino no es infrecuente encontrar fenómenos de necrosis por caseificación y calcificación (Clarke, 1997; Corpa y cols., 2000a) más raros en ganado ovino (Reaman y cols., 1981) e inexistentes en ganado bovino (Buergelt y cols., 1978; Chiodini y cols., 1984a).

En casos graves de paratuberculosis en la especie bovina se ha citado la presencia de fibrosis y calcificaciones distróficas en las paredes arteriales, principalmente en aorta, arteria mesentérica, así como en endocardio (Buergelt y cols., 1978; Chiodini y cols., 1984a; Corpa y cols., 1998).

Lesiones microscópicas.

Microscópicamente, la paratuberculosis se considera como una enteritis granulomatosa caracterizada por el acúmulo de macrófagos y ocasionalmente células gigantes formando granulomas que en los casos graves llegan a producir la atrofia por fusión de vellosidades y la oclusión de criptas de la mucosa intestinal (Stamp y Watt, 1954; Rayja y Singh, 1961; Buergelt y cols., 1978; Badiola y cols., 1979; Reddy y cols., 1984; Huchzermeyer y Bastianello, 1992; Pérez y cols., 1996; Corpa y cols., 2000a) aunque también pueden

aparecer otros tipos celulares como linfocitos, células plasmáticas, y neutrófilos (Reddy y cols., 1984; Carrigan y Seaman, 1990; Peris, 1992; García Marín y cols., 1992c; Pérez y cols., 1996; Corpa y cols., 2000a). El infiltrado inflamatorio puede extenderse por toda la mucosa y submucosa. Asimismo los vasos linfáticos de la serosa intestinal pueden sufrir fenómenos de perilinfangitis, presentando un infiltrado inflamatorio mononuclear a su alrededor (Barker y cols., 1993; Pérez y cols., 1996; Corpa y cols., 2000a). Las lesiones histológicas se localizan en todos los casos en intestino delgado, íleon y yeyuno, pudiendo extenderse en ocasiones a diferentes tramos de intestino grueso, sobre todo ciego y colon, y siendo más esporádica la presencia de alteraciones en duodeno y recto (Burgelt y cols., 1978; Carrigan y Seaman, 1990; García Marín y cols., 1994).

Los linfonodos adyacentes presentan una linfadenitis granulomatosa, principalmente el yeyunal caudal y el ileocecal, formada por acúmulos de macrófagos e incluso células gigantes de tipo Langhans en la cortical y paracortical, llegando a infiltrar los senos subcapsulares y peritrabeculares (Stamp y Watt, 1954; Burgelt y cols., 1978; Pérez y cols., 1996). En cuanto a lesiones extraintestinales asociadas a paratuberculosis, además de la degeneración y calcificación de arterias y endocardio descritas en bovino, (Burgelt y cols., 1978; Van Kruiningen, 1995; Corpa y cols., 1998) se ha constatado, en las principales especies domésticas, la presencia de granulomas distribuidos de forma multifocal en hígado de algunos de los animales enfermos clínicamente y con graves lesiones intestinales. Dichos granulomas se localizan en el intersticio hepático y aunque en ocasiones puede detectarse bacilos ácido-alcohol resistente, en ningún caso provocan alteraciones graves de la estructura que se reflejen a nivel macroscópico (Harding, 1957; Burgelt y cols., 1978; Carrigan y Seaman, 1990).

Clasificación lesional.

Las lesiones paratuberculosas pueden variar según la gravedad, extensión y predominio de diferentes tipos celulares, por lo que se han propuesto diversas clasificaciones. Las mismas se verían justificadas por la relación que parece existir entre los diferentes tipos lesionales con la patogenia, la fase de la infección y la respuesta inmune del animal frente a la misma, así como por la

valoración que permite realizar de diferentes técnicas de diagnóstico y posible tratamiento de la enfermedad (Buergelt y cols., 1978; Pérez y cols., 1996; Coetsier y cols., 1998; Brumbaugh y cols., 2000). Sin embargo, hasta el momento no existe una clasificación común para las distintas especies, si bien ya se han empezado a establecer comparaciones entre formas lesionales en ovinos y en caprinos (Clarke y Little, 1996; Pérez y cols., 1996; Corpa y cols., 2000a).

En la especie bovina, aunque fue en la primera en la cual se describió la enfermedad (Johns y Frottingham, 1895) y las lesiones características por McFadyean, en 1918, no existen demasiadas clasificaciones histopatológicas, destacando la realizada por Buergelt y cols., en 1978. En la misma se estudiaron, exclusivamente mediante métodos histopatológicos, 51 animales desechados de dos rebaños, todos ellos infectados con *MAP* como se deduce por la presencia de lesiones en todos ellos. Las lesiones fueron clasificadas como leves, moderadas y graves. En el primer grupo se incluían aquellos casos en los que se observan células gigantes de Langhans en la lámina propia de las vellosidades intestinales o dispersas en la paracortical de los linfonodos, pero pocas células epitelioides y escasa o nula presencia de bacilos ácidoalcohol resistentes. Las lesiones moderadas consistían en pequeños grupos de macrófagos y varias células gigantes en la lámina propia y en la submucosa, aunque en proporción variable según los casos. Lesiones similares se encontraban en senos subcapsulares o paracortical de los linfonodos regionales. La cantidad de bacilos en estos casos era entre nula y moderada, pero siempre mayor cuando predominaban los macrófagos. Las lesiones graves se caracterizaban por un infiltrado de numerosos macrófagos y células gigantes en mucosa, submucosa, muscular y serosa de diferentes tramos intestinales. Dicho infiltrado provocaba un acortamiento y ensanchamiento de las vellosidades, dilatación de criptas con presencia de material purulento en su interior, así como una dilatación y rotura de los capilares linfáticos de las vellosidades. La submucosa también aparecía invadida por estos tipos celulares, si bien la placas de Peyer, aunque rodeadas, no se veían invadidas por el infiltrado de macrófagos. Los ganglios nerviosos mientéricos de Meissner se vieron afectados en ocasiones por células inflamatorias y leucocitos globulares. También los linfonodos regionales se encontraban gravemente

alterados por un acúmulo de macrófagos y células gigantes en senos subcapsulares y paracortical, donde llegan a remplazar a los folículos linfoides. No obstante, en la anterior clasificación no se incluyen las lesiones de tipo focal formadas por pequeños acúmulos de macrófagos o células gigantes, descritas por varios autores (Payne y Rankin, 1961; Gilmour y cols., 1965; Larsen y cols., 1975), tras infecciones experimentales de bovinos.

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO.

Uno de los principales problemas que plantea la paratuberculosis es su diagnóstico (Abbas y cols., 1983; Chiodini y cols., 1984a; Kreeger, 1991; Clarke y cols., 1996), principalmente el de los animales con infección subclínica o portadores latentes, para los cuales no existe ninguna prueba que tenga buena sensibilidad y especificidad (Fernández y cols., 1980; Chiodini y cols., 1984a; Kreeger, 1991; Hietala, 1992; Whitlock, 1998; Garrido y cols., 2000). El diagnóstico individualizado de cada animal es el que ofrece mayores dificultades, por lo que una única prueba no sería suficiente, debiéndose complementar con otros tests (Thoen y Muscoplat, 1979; García Marín y cols., 1994). Todos los métodos de diagnóstico existentes en la actualidad pueden clasificarse dentro de 4 grupos, los basados en aspectos clínicos y epidemiológicos, aquellos que reconocen las manifestaciones lesionales de la paratuberculosis, los que identifican el agente etiológico y las pruebas que detectan la respuesta inmune de los animales infectados (Garrido y cols., 2000).

Diagnóstico anatomopatológico convencional.

Las lesiones macroscópicas específicas que suelen presentar la mayoría de los animales afectados clínicamente de paratuberculosis pueden proporcionar un diagnóstico bastante fiable de la presencia de la enfermedad. Sin embargo, estas lesiones no siempre se pueden apreciar, incluso en animales con evidentes signos clínicos (Buergelt y cols., 1978; Corpa, 1999), y en la mayor parte de los que presentan la infección subclínica. En estos casos se puede complementar con el estudio histopatológico, una técnica a la que se reconoce una buena sensibilidad y especificidad (Barker y cols., 1993; Withlock, 1998), y que es, junto al cultivo, la prueba usada como referencia para validar y

comparar otras técnicas (Billman-Jacobe y cols., 1992; Shulaw y cols., 1993; Clarke y cols., 1996; Pérez y cols., 1997; McDonald y cols., 1999).

Además tiene como ventaja la capacidad de identificar animales, no sólo con lesiones graves y enfermedad clínica, sino también con lesiones focales, asociadas a fases subclínicas de la enfermedad (Huchzermeyer y Bastianello, 1992; Pérez y cols., 1996; Corpa y cols., 2000a). Se debe de tener en cuenta, sin embargo, la necesidad de efectuar una correcta toma de muestras, que siempre deben de incluir tejido linfoide intestinal, ya que es donde se localizan las lesiones iniciales y latentes de la paratuberculosis (Capítulo I-2.2) (Nisbet y cols., 1962; García Marín y cols., 1992c; Huzchemeyer y Bastianello, 1992; Peris, 1992; Juste y cols., 1994; Pérez y cols., 1996). Este hecho podría explicar algunos casos en los que no se han detectado lesiones en animales positivos a otras pruebas diagnósticas (Wood y cols., 1989).

Para la observación de las lesiones histológicas características de la enfermedad, se ha utilizado de forma generalizada la técnica convencional de la Hematoxilina-Eosina, la cual debe de complementarse con la del Ziehl-Neelsen para evidenciar resistentes (BAAR) (Johnne y Frottingham, 1895; Stamp y Watt, 1954; Barker y cols., 1993). Esto último no siempre es posible, ya que es frecuente observar lesiones evidentes con escaso o nulo número de BAAR (Stamp y Watt, 1954; Buergelt y cols., 1978; Massone y cols., 1991; Pérez y cols., 1996; Coetsier y cols., 1998). Ante la posibilidad de que estos resultados negativos sean debidos a la existencia de formas bacterianas de pared celular defectiva, (Capítulo I-1), se han empleado técnicas de microscopía electrónica para detectarlas en el interior de macrófagos o células gigantes, si bien su uso es más experimental que encaminado al diagnóstico rutinario (Condron y cols., 1994).

Diversos autores han discutido sobre la sensibilidad de la técnica histopatológica. Mientras algunos la consideran inferior al cultivo, sobre todo en ganado bovino (de Lisle y cols., 1980; Iob y cols., 1996), otros por el contrario han detectado un mayor número de animales que presentan lesiones características de paratuberculosis pero en los que no se consigue aislar al agente, principalmente en las especies ovina y caprina (Pérez y cols., 1996; Corpa y cols., 2000a; Dimarelli-Malli y Sarris., 2001).

Habitualmente la disparidad de resultados entre ambas técnicas se produce en las lesiones de carácter focal y con pocas micobacterias, o formas de pared defectiva (Condrón y cols., 1994). En cualquier caso, la histopatología es una técnica empleada cada vez con más frecuencia como método de referencia en la validación de nuevas técnicas de diagnóstico de paratuberculosis ovina (Gwozdz y cols., 2000b; Hope y cols., 2000; Michel y Bastianello, 2000; Mason y cols., 2001; Rajukumar y cols., 2001).

En cuanto a la especificidad de este método de diagnóstico, es posible la confusión de lesiones granulomatosas de otro tipo, generalmente parasitarias, con lesiones paratuberculosas; sin embargo las diferentes características morfológicas permiten diferenciarlas en la mayoría de los casos (Condrón y cols., 1994; Pérez y cols., 1996; Corpa, 1999).

La principal limitación de esta técnica es que su uso se restringe únicamente a animales muertos (González, 1998; Garrido y cols., 2000), aunque en algunos casos se ha propuesto como prueba diagnóstica sobre el animal vivo, mediante la realización de una biopsia de linfonodo yeyunal caudal (Benedictus y Bosma, 1985) o de íleon (Withlock, 1998, Brumbaugh y cols., 2000). Sin embargo, este método resulta muy costoso y supone una excesiva manipulación del animal (Benedictus y Bosma, 1985; Sherman, 1985), estando limitada su aplicación a individuos de gran valor económico o estudios experimentales (Garrido y cols., 2000; Brumbaugh y cols., 2000).

Diagnóstico clínico y epidemiológico.

Diagnóstico anatomopatológico

Detección de *MAP* sobre preparaciones histológicas.

Técnicas inmunohistoquímicas.

Técnicas de identificación genética.

Pruebas inmunológicas.

Técnicas "in vivo"

Técnicas "in vitro".

Pruebas de inmunidad humoral.

Fijación del complemento.

Inmunodifusión en gel de agar (IDGA).

ELISA

TRATAMIENTO Y CONTROL DE LA PARATUBERCULOSIS.

Tratamiento de la paratuberculosis.

La paratuberculosis es una enfermedad cuyo tratamiento está generalmente desaconsejado ya que exige un coste económico considerable, debe de mantenerse durante bastante tiempo y, en la actualidad, no existe un único fármaco totalmente eficaz (Juste y Saez de Ocariz, 1990; St-Jean y Jernigan, 1991; Adúriz y cols., 2000).

En ganado ovino y caprino el gasto que supondría un tratamiento supera ampliamente el valor de la mayoría de los animales. En la especie bovina, sin embargo, se han probado diferentes agentes antimicrobianos capaces de hacer desaparecer de forma transitoria la sintomatología clínica, pero no así la excreción de microorganismos en heces (Merkal y cols., 1973; Baldwin, 1976). En muchos casos, al cesar el tratamiento los animales acababan sucumbiendo a la enfermedad (Larsen y cols., 1950; Chiodini y cols., 1984a; Brumbaugh y cols., 2000). No obstante, fármacos anti- tuberculosos como la isoniazida y la rifampicina o los aminoglucósidos parecen lograr un restablecimiento más prolongado de algunos casos (Baldwin, 1976; Blood y cols., 1989; Rebhun, 1995). En este sentido Chiodini y cols. 1984a consideran que una combinación de dichas sustancias, junto con agentes anti- inflamatorios e inmunoestimulantes, podría ser útil en la recuperación de animales enfermos, aunque económicamente poco rentable. En cualquier caso siempre se debe de considerar que los animales sometidos a tratamiento pueden ser una fuente de contagio para el resto de la explotación, por lo que únicamente en caso de individuos con un gran valor genético estaría recomendada esta práctica (St Jean y Jernigan, 1991).

Programas de control de la paratuberculosis.

Las diversas medidas empleadas en el control de la paratuberculosis en rebaños bovinos pueden dividirse en dos grupos: vacunación y diagnóstico/eliminación de animales infectados. Sin embargo, en ambos casos se deben acompañar de medidas de manejo de carácter higiénico, sobre todo cuando se aplica el segundo de los métodos.

Aunque ambos métodos no son excluyentes, se debe de tener en cuenta que la vacunación conlleva la imposibilidad de realizar posteriores diagnósticos inmunológicos.

Diagnóstico y eliminación.

El primer tipo de actuación, defendida por autores de diferentes países para la especie bovina, está basado en un diagnóstico eficaz de animales infectados y su sacrificio en el menor tiempo posible (Sherman, 1985). Este protocolo llevaría en los primeros años a una disminución en la prevalencia y finalmente, a la erradicación de la enfermedad del rebaño (Rossiter, 1996; Benedictus y cols., 1999; Pavlik y cols., 2000; Kalis y cols., 2001). Sin embargo, los resultados obtenidos hasta el momento han sido bastante desiguales, ya que mientras en algunos rebaños se han logrado importantes reducciones en la tasa de infección, en otros persiste la enfermedad, y en algunos casos la prevalencia se ha visto incrementada (Rossiter y cols., 1992; Withlock y cols., 1995; Pavlik y cols., 2000). El principal problema que presenta este planteamiento es la falta de un método de diagnóstico lo suficientemente eficaz (Adúriz y cols., 2000), ya que incluso la técnica del cultivo fecal, que ha sido la más ampliamente utilizada en los programas de control de la paratuberculosis, no alcanza a detectar a todos los animales infectados, sobre todo los casos subclínicos. Además presenta como inconveniente añadido el largo tiempo de espera hasta que detecta a los animales excretores, durante el cual permanecen en el rebaño diseminando la infección. A pesar de todo, importantes programas han sido llevados a cabo siguiendo este método, principalmente en algunos estados de EEUU (Rossiter y cols., 1992) y en regiones de Holanda (Benedictus y cols., 1999), estableciendo la certificación de rebaños libres de paratuberculosis, cuando durante 2 muestreos consecutivos en un año, ningún animal resultaba positivo. Sin embargo, el empleo sistemático del cultivo fecal supone un considerable coste económico, por lo que ha sido sustituido o complementado por otras técnicas como el PCR y pruebas inmunológicas, principalmente el ELISA, disminuyendo el coste

anual del programa, pero obteniendo resultados de forma más lenta (Bulaga y Collins, 1999).

Medidas de manejo.

Además del establecimiento de los diferentes programas de control se ha señalado la importancia en todas las especies, de un correcto manejo y de la adopción de medidas higiénico-sanitarias para disminuir en lo posible el contagio entre animales (Juste y Sáez de Ocariz, 1990; Adúriz y cols., 2000; Kalis y cols., 2001). Dentro de estas medidas se considera primordial la limpieza y desinfección periódica de la explotación (Merkal y Whipple, 1982), con especial atención a una eliminación exhaustiva de restos fecales, y la separación de las crías de las madres lo antes posible, o al menos de aquellas que resulten sospechosas de padecer la enfermedad (Merkal y cols., 1975a; Sherman, 1985; Pavlik y cols., 2000). En estos casos, dichas crías deben ser alimentadas con leche previamente pasteurizada (Stabel, 2001). Debido al enorme esfuerzo que requiere la erradicación de la paratuberculosis y las pérdidas que puede ocasionar, es especialmente importante evitar su entrada en rebaños o regiones libres de la misma. Para ello es necesario un estricto control en el movimiento de ganado y el establecimiento de garantías sanitarias a la hora de adquirir nuevos animales (Chiodini y cols., 1984a), bien realizando pruebas de diagnóstico a los mismos o adquiriéndolos en rebaños libres de la enfermedad.

RESULTADOS.

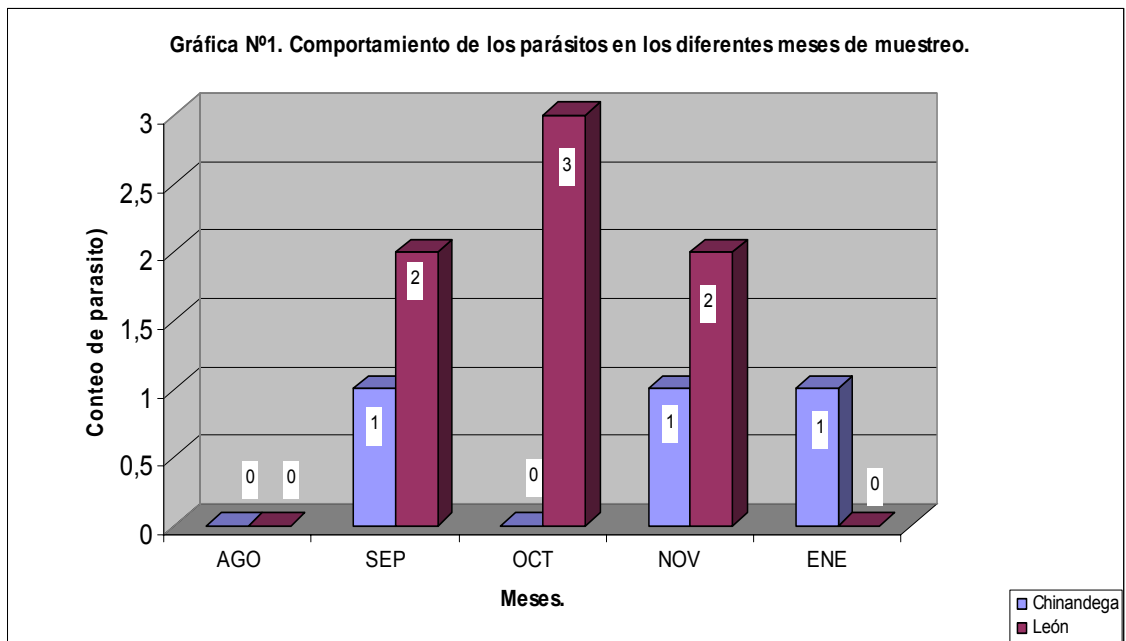
En el presente estudio realizado en los meses de agosto 2004 a enero del 2005, en los mataderos de León-Chinandega para determinar la presencia de Paratuberculosis bovina o enfermedad de Johns, en una población de 8162 animales, de donde se muestrearon 292 bovinos adultos según calculo realizado, a los cuales se les realizó la técnica de tinción de hematoxilina - eosina resultando 22 animales sospechosos por las lesiones microscópicas características se les procedió a realizar la técnica de Ziehl -Neelsen, resultando todos negativos y en diez animales se detectaron quistes parasitarios que provocaban lesiones macroscópica compatibles con una enteritis crónica con formación de pliegues en 10 animales que presentaban engrosamiento de la mucosa intestinal del ultimo tramo del intestino delgado que corresponde al íleo así como aumento de tamaño de la pared intestinal y coloración blanquecina. El ganglio de la válvula ileocecal presentaba coloración blanquecina, aumento de tamaño, forma redondeada y al corte de aspecto seco lo que corresponde a una linfadenitis crónica.

Las muestras procesadas mostraban microscópicamente engrosamiento de las microvellosidades con infiltración linfocitaria y de macrófagos así como un aumento de la población de eosinófilos debido a la presencia de quistes parasitarios los que se muestran en donde, el total de quiste observado en la grafica 1. por mes es de cero caso en el mes de agosto, de 3 casos para septiembre, de 3 casos para octubre, de 3 casos para noviembre y de 1 caso para enero obteniéndose un total de 10 quistes parasitarios en el total de animales sospechosos.

Ejemplos representativos de los resultados se muestran en las **Figuras 5, 6 y 7**. La Figura 5 es un ejemplo de una zona de ileo de un bovino teñido por la técnica de hematoxilina-eosina donde se observa la completa normalidad de las estructuras histológicas. **La Figura 6** es un ejemplo de infiltración

linfoplasocitaria y células gigantes en un caso bovino afectado por PTBC y la **Figura 7** es una reacción Zeil Nielsen positiva en una vaca afectada por PTBC.

En la grafica N° 1 que refleja los casos de animales que aparecieron con quiste parasitario por mes de estudio donde se confirma la aparición de lesiones característica a parasitosis y no de paratuberculosis en el cual se refleja la negatividad con la tinción de Ziehl-neelsen.



DISCUSION.

La repuesta inflamatoria observada macroscópicamente en el intestino y en los linfonódulos de los animales afectados fue leve coincidiendo con el engrosamiento de la pared intestinal. En los casos observados microscópicamente predominaron principalmente tipos celulares como macrófagos, eosinofilos y linfocitos.

En ninguno de los casos seleccionados se observaron ni necrosis ni caseificación. La ausencia de estas lesiones puede ser de utilidad para diferenciar microscópicamente las lesiones de PTBc., de las lesiones de tuberculosis (Chiodini, R.J.; Van KRUIJNIGEN, H.; MERKAL, R.S, .1987).

Las coloraciones para bacterias acido-alcohol resistente, realizada en extendidos obtenidos apartir de corte de tejidos intestinales de la válvula ileocecal, son relativamente sencillas pero no son muy específicas. Además existen otros organismos como Nocardia y Corynebacterium que son positivos a ZIEHL NEELSEN. (MASSONE, A.R.; MARTIN, A.A; IBARGOYEN, G.S; GIMENO, E.J (1990).

Para la observación de las lesiones histológicas características de la enfermedad, se ha utilizado de forma generalizada la técnica convencional de la Hematoxilina-Eosina, la cual debe de complementarse con la tinsión de Ziehl-Neelsen para evidenciar bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) (Johne y Frottingham, 1895; Stamp y Watt, 1954; Barker y cols., 1993). Esto último no siempre es posible, ya que es frecuente observar lesiones evidentes con escaso o nulo número de BAAR (Stamp y Watt, 1954; Buergelt y cols., 1978; Massone y cols., 1991; Pérez y cols., 1996; Coetsier y cols., 1998). Ante la posibilidad de que estos resultados negativos sean debidos a la existencia de formas bacterianas de pared celular defectiva. Sin embargo hay otros agentes que son capaces de producir engrosamiento de la mucosa intestinal, presencia de parásitos intestinales (ostertagia, tricostróngilos, cooperia, etc.). según (Cordero del Campillo M. 1999)

CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio muestran que los bovinos muestreados en los rastros de León y Chinandega durante el periodo de julio 04 a enero 05 son negativos a la presencia de PTBC, tanto a nivel histológico como citoquímico.

En el presente estudio realizado a una población de 8162 animales de los cuales se muestrearon 292 animales en un periodo de 5 meses y realizando las pruebas de laboratorio pertinentes no se obtuvo ningún caso positivo, esto significa que para detectar la enfermedad con una probabilidad de 95% se considera que la prevalencia permisible es de 1% y si hay algunos enfermos son menos del 1%.

En segundo lugar se ha de destacar que los animales muestreados no mostraban síntomas clínicos digestivos. Se observaron otros agentes que son capaces de producir engrosamiento de la mucosa intestinal como la presencia de parásitos intestinales ostertagia, tricostróngilos, cooperia (**Cordero del Campillo M., 1999**).

En la especie bovina, la paratuberculosis presenta una diversidad lesional en los animales infectados, de forma que las lesiones pueden ser clasificadas según su localización, extensión, tipos celulares predominantes y cantidad de bacilos presentes. Existen lesiones focales caracterizadas por la presencia de pequeños granulomas en los linfonodos yeyunales e ileales y ocasionalmente en la Placa de Peyer intestinales, lesiones multifocales en las que además de en los linfonodos, hay lesiones granulomatosa en las vellosidades intestinales y lesiones difusas asociadas a signos clínicos, caracterizada por enteritis granulomatosa grave y extensa.

Sin embargo en el presente estudio no se detectó presencia lesional microscópica asociada a paratuberculosis y las lesiones compatibles que se encontraron macroscópicamente corresponden al 45.45% por parásito y el resto corresponde al 54.54% que podría atribuirse a infecciones bacterianas que originan lesiones similares.

RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio de muestra sesgada en animales de descarte y no descarte destinados al sacrificio en diferentes fincas.
- Valorar la prueba de tuberculina vs. la aviar utilizada en el campo por el MAGFOR para detectar animales positivos.
- En caso de los mataderos investigar aquellos animales caquéuticos para realizar estudios.
- Continuar con el estudio utilizando otras técnicas diagnósticas que ayuden a determinar animales positivos a la enfermedad.
- Estudios de corte longitudinal (periodo mas largo y mayor tamaño de muestra)

BIBLIOGRAFIA

- ADÚRIZ, J.J.; JUSTE, R.A.; MARCO, J.C.; SÁEZ DE OCARIZ, C.; GARCÍA, A.L.; CUERVO, L. (1991): "Diagnósticos de paratuberculosis en el SIMA: Análisis epidemiológico". *ITEA*, **11**: 653-655.
- ADÚRIZ, G., JUSTE, R.A., GARRIDO, J.M.; GEIJO, M.V (2000): "Epidemiología y control de la paratuberculosis bovina". En: "*Paratuberculosis*". *BOVIS*, **93**: 63-73.
- ALZUHERRI, H.M.; LITTLE, D.; CLARKE, C.J. (1997): "Altered intestinal macrophage phenotype in ovine paratuberculosis". *Res. Vet. Sci.*, **63**: 139-143.
- ANGUS, K.W. (1990): "Intestinal lesions resembling paratuberculosis in a wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*).". *J. Comp. Path.*, **132**: 101-105.
- BAISDEN, L.A.; JOHNSON, H.W.; LARSEN, A.B. (1950): "Studies on Johnin: VIII. Preliminary studies on the specificities of acid fast allergens". *Am. J. Vet. Res.*, **11**: 382-387. avium subspecies
- BANNANTINE, J.P.; STABEL, J.R. (2001): "Identification of two *Mycobacterium* paratuberculosis gene products differentially recognised by sera from rabbits immunised with live mycobacteria but not heat-killed mycobacteria". *J. Med. Microbiol.*, **50**: 795-804.
- BANKS, WILLIAM, J, *Histología Veterinaria Aplicada*. Segunda edición 1996. Pág. 403-404.
- BAISDEN, L.A.; JOHNSON, H.W.; LARSEN, A.B. (1950): "Studies on Johnin: VIII. Preliminary studies on the specificities of acid fast allergens". *Am. J. Vet. Res.*, **11**: 382-387. avium subspecies
- BECH-NIELSEN, S.; BURIANEK, L.L.; SPANGLER, E.; HEIDER, L.E; HOFFISIS, G.F.;
DORN, R. (1985): "Characterization of *Mycobacterium paratuberculosis* antigenic proteins". *Am. J. Vet. Res.*, **11**: 2418-2420.
- BEGARA-MCGORUM, I.; WIDDIBLOOD, L.A.; CLARKE, C.J.; CONNOR, K.M.; STEVENSON, K;
MCINNIS, C.J.; SHARP, J.M; JONES, D.G. (1998): "Early immunopathological events in experimental ovine paratuberculosis". *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **63**: 265-287.
- BLOOD, D.C., RADOSTITS, O.M.; ARUNDEL, J.H.; GAY, C.C. (1989): "Paratuberculosis (Johnes disease)". En: "*Veterinary Medicine*". Ballière and Tindall. 7th Ed.: 722-729. Londres, Reino Unido
- 333-336. TAYLOR, A.W. (1951); "Varieties of *Mycobacterium johnei* isolated from sheep". *J. Path. Bact.*, **63**: BOROS, D.L. (1992): "Granulomas de hipersensibilidad" En: "*Alergia: principios y práctica*". Ed SALVAT: 261-278. Barcelona, España.

BROTHERSTON, J.G.; GILMOUR, N.J.L.; SAMUEL, J.M. (1961): "Quantitative studies of *Mycobacterium johnei* in the tissues of sheep". *J. Comp. Path.*, **71**: 286-299.

BURRELLS, C.; INGLIS, N.F.; DAVIES, R.C.; SHARP, J.M. (1995): "Detection of specific T cell reactivity in sheep infected with *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* and *paratuberculosis* using two defined mycobacterial antigens". *Vet. Immunol Immunopath.*, **45**: 311-320.

CHIODINI, R.J.; VAN KRUININGEN, H.J.; MERKAL, R.S. (1984a): "Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): The current status and future prospects". *Cornell Vet.*, **74**: 218-262.

CHIODINI, R.J.; VAN KRUININGEN, H.J. (1986); "The prevalence of paratuberculosis in culled New England cattle". *Cornell Vet.*, **76**: 91-104.

COETSIER, C.; HAVAUX, X.; MATTELARD, F.; SADATTE, S.; CORMONT, F.; BUERGELT, K.; LIMBOURG, B.; LATINNE, D.; BAZIN, H.; DENEFF, J.; COCITO, C. (1998): "Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in infected tissues by new species-specific immunohistological procedures". *Clin. Diag. Lab. Immunol.* **5**: 446-451.

COLLINS, D.M.; GABRIC, D.M.; DE LISLE, G.W. (1990): "Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA

CONDRON, R.J., SCHROEN, C.J.; BACK, C.A.; RIDGE, S.E.; HOPE, A.F. (1994): "Histological confirmation of subclinical infection with *M. paratuberculosis* in cattle". *Proc. IV Int. Coll. PTBC.*: 37-40. Cambridge, Reino Unido.

CORPA, J.M., GARRIDO, J., GARCÍA MARÍN, J.F., PÉREZ, V. (2000a): "Classification of lesions observed in natural cases of paratuberculosis in gotas". *J. Comp. Path.* **122**: 255-265.

CORDERO, DEL CAMPILLO, .parasitologia veterinaria ,1999.pág. 237-250.

DANNENBERG, A.M. (1968): "Cellular hypersensitivity and cellular immunity in the pathogenesis of tuberculosis: specificity, systemic and local nature, and associated macrophage enzymes".

ELLNER, J.J.; WALLAS, R.S. (1989): "Immunologic aspects of mycobacterial infection". *Rev. Infect. Dis.*, **11**: 455-459.

FERNANDEZ, M.; ALLER, J.M.; ALVAREZ, M. (1980): "Prevalencia de la infección en un foco de paratuberculosis ovina". *An. Fac. Vet. León*, **27**: 131-136.

GARCÍA MARÍN, J.F; BENAZZI S.; PÉREZ, V.; BADIOLA, J.J. (1992a): "Study of entrance of *M. paratuberculosis* in the lambs intestinal mucosa, using immunohistochemical methods for antigens detection". *Proc. III Int. Coll. PTBC.*: 371-377. Orlando, E.E.U.U.

GREEN, E.; TIZARD, M.; THOMPSON, J.; WINTERBOURNE, D.; McFFADEN, J.; HERMONTAYLOR, J. (1989): "Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*". *Nucleic Acid. Res.*, **17**: 9063-9073.

GRANGE, J.M.(1990): "The mycobacteria". En: "*Topley & Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity*". Parker, M.T. & Duerden B.I. Edward Arnold (Eds). 8th ed. Vol. 2: 74-97.

GWOZDZ, J.M; THOMPSON, K.G.; MURRAY, A.; REICHEL, M.P.; MANKTELOW, B.W.; WEST, D.M. (2000b): "Comparison of three serological tests and a interferon- γ assay for the diagnosis of paratuberculosis in experimentally infected sheep". *Aust. Vet. J.*, **78**: 779-783.

GONZÁLEZ, J. (1998): "Empleo de un método histológico para el estudio de la prevalencia de la paratuberculosis ovina". Tesina de licenciatura. Universidad de León.

HUTYRA, F.; MAREK, J. (1930): "Enteritis paratuberculosa de los bóvidos". En: "*Patología y terapéutica especiales de los animales domésticos*" Trad. Pedro Farreras. Ed. Revista Veterinaria de España 1º ed.: 613-620. Barcelona, España.

INGLIS, N.F.; STEVENSON, K.; DAVIES, R.C.; HEASLIP, D.G.; SHARP, J.M. (2001): "Unique expression of a highly conserved mycobacterial gene in IS901(+) *Mycobacterium avium*". *Microb.* **147**: 1557-1564.

JOHNE, H.A.; FROTHINGHAM, L. (1895): " Ein eigenthümlicher Fall von Tuberkulöse beim Rind". *Dtsch. Zeitschr. Tiermed. Vergl. Path.*, **21**: 438-454.

JUSTE, R.A.; GARRIDO, J.M.; ADÚRIZ, G. (2000): "Paratuberculosis: El agente causal de la paratuberculosis y su situación taxonómica" En: "*Paratuberculosis*" *BOVIS*, **93**; 13-28.

KALIS, C.H.J.; HESSELINK, J.W.; RUSSCHEN, E.W.; BARKEMA, H.W.; COLLINS, M.T.; VISSER, I.J.R. (1999b): "Factors influencing the isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

KAUFMANN, S.H.E. (1995): Immunity to intracellular microbial pathogens". *Immunol. Today*, **16**: 338-342. STABEL, J.R. (2000): "Transitions in immune responses to *Mycobacterium paratuberculosis*". *Vet.Microbiol.*, **77**: 465-473.

KOPECKY, K.E. (1977): "Distribution of paratuberculosis in Wisconsin, by soil regions". *JAVMA*, **170**:320-324.

KUNZE, Z.M.; PORTAELS, F.; MCFADDEN, J.J. (1992): "Biologically distinct subtypes of *Mycobacterium avium* differ in possession of insertion sequence IS 901". *J. Clin. Microbiol.*, **30**: 2366-2372.

LARSEN. A.B.; MERKAL, R.S.; VARDAMAN, T.H. (1956): "Survival time of *Mycobacterium paratuberculosis*". *Am. J. Vet. Res.*, **17**: 549-551.

LARSEN, A.B.; JOHNSON, H.W. (1947): "Antigenic relationship between the genus *Mycobacterium* and the genus *Corynebacterium* in goats and cattle". *Am. J. Vet. Res.*, **8**: 184-186.

LEVY-FREBAULT, V.V.; PORTELS, F. (1992): "Proposed minimal standards for the *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium species*". *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **42**:

LITTLE, D.; ALZUHERRI, H.M.; CLARKE, C.J. (1996): "Phenotypic characterisation of intestinal lymphocytes in ovine paratuberculosis by immunohistochemistry". *Vet. Immunol. Immunopath.*, **55**: 175-187.

LIU X.; FENG, Z.; HARRIS, N.B.; CIRILLO, J.D.; BERCOVIER, H.; BARLETTA, R.G. (2001).

"Identification of a secreted superoxide dismutase in *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*". *FEMS Microbiol. Lett.*, **202**: 233-238

MATTHEUS, P.R.J.; McDIARMID, A. (1979): "The production in bovine calves of a disease resembling paratuberculosis with a *Mycobacterium sp.* isolated

MASSONE, A.R.; ITAGAKI, S.; IBARGIYEN, G.S.; MARTIN, A.A.; DOI, K.; GIMENO, E.J. (1991):

"Demonstration of *Mycobacterium paratuberculosis* in tissue sections: comparative studies of from a wood pigeon (*Columba palumbus*)".

MERKAL, R.S.; LARSEN A.B. (1962): " Improved methods for primary cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* ". *Am. J. Vet. Res.*, **23**: 1307-1308.Londres, Reino Unido..

MERKAL, R.S.; WHIPPLE, D.L.; SACKS, J.M.; SNYDER, G.R. (1987): "Prevalence of *Mycobacterium. paratuberculosis* in ileocecal lymph nodes of cattle culled in the United States. *JAVMA*, **190**: 676-680.

MUSKAENS, J.; BAKKER, D.; DE BOER, J.; KEULEN, L. (2000): "Paratuberculosis infection in sheep on farms with paratuberculosis infected cattle in the Netherlands" *Proc. VI Int. Coll. PTBC.*: 213. Melbourne, Australia.

MOMOTAMI, E.; WHIPPLE, D.L.; THIERMANN, A.B.; 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". *Vet. Pathol.*, **25**: 623-627.

OLSEN, I.; TRYLAND, M.; WIKER, H.G.; REITAN, L.J. (2001a): "AhpC, AhpD, and a secreted 14- kilo dalton antigen from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* distinguish between paratuberculosis and bovine tuberculosis in an enzyme-linked immunosorbent assay". *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **8**: 797-801.

PATTERSON, D.S.P.; ALLEN, W.M.; LLOYD, M.K. (1967): "Clinical Johne's disease as a protein losing enteropathy". *Vet. Rec.*, **81**: 717-718.

PAVLÍK, I.; ROZSYPALOVÁ, Z.; VESELÝ, T.; BARTL, J.; MARTLOVÁ, L.; VRBAS, V.; VALENT, L.; RAJSKÝ, D.; MRACKO, I.; HIRKO, M.; MISKOVIC, P. (2000a): "Control of paratuberculosis in five cattle farms by serological test and faecal culture during the period 1990-1999". *Vet. Med.-Czech*, **45**: 61-70.

PAYNE, J.M.; RANKIN, J.D. (1961): "The pathogenesis of experimental Johne's disease in calves": *Res. Vet. Sci.*, **2**: 175-179.

PEPIN, M.; MARLY, J.; PARDON, P. (1987): "*Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep and the complement fixation test for paratuberculosis". *Vet. Rec.*, **120**: 236.

REBHUN, W.C (1995): "Infectious diseases of the gastrointestinal tract". En: "*Diseases of dairy cattle*". Ed Williams and Wilkins. 1^a ed: 208-213. Baltimore

REDDY, K.P.; SRIRAMAN, P.K.; GOPAL NAIDU, N.R.; RAMA RAO, P. (1984): "Pathology of Johne's disease in sheep". *Indian Vet. J.*, **61**: 179-164.

REICHEL, M.P.; KITTELBERGER, R.; PENROSE, M.E.; MEYNELL, R.M.; COUSINS, D.; ELLIS, T.; MUTHARIA, L.M.; SUGDEN, E.A.; JOHNS, A.H.; DE LISLE, G.F. (1999): "Comparison of serological test and faecal culture for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle and analysis of the antigens involved" *Vet. Microbiol.*, **66**:

ROSSITER, C.A. (1996): "Farm-specific approach to paratuberculosis (Johne's disease) control". *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.*, **12**: 383-415

ROWAN N.J.; MACGREGOR, S.J.; ANDERSON, J.G.; CAMERON, D.; FARISH, O. (2001): "Inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* by pulsed electric fields". *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**: 2833-2386

SAXEGAARD, F. (1990): "Experimental infection of calves with an apparently specific goat-patogenic strain of *Mycobacterium paratuberculosis*". *J.Comp. Path.*, **102**: 149-156.

STAMP, J.T.; WATT, J.A. (1954): "Johne's disease in sheep". *J. Comp. Path.*, **64**: 26-39.

STANFORD, J.L. (1983): "Immunologically important constituents of mycobacteria. Antigens. En: The Biology of the Mycobacteria. Immunological and environmental aspects. Ratledge, C.; Stanford, J.L (Eds.) Academic press. Vol 3.: : 85-127 Londres, Reino Unido

STEVENSON, K; INGLIS, N.F., RAE, B.; BURRELLS, C.; DONACHIE, W.; SHARP, J.M. (1992): "Identification and characterization of immunogenic proteins of *Mycobacterium paratuberculosis*". *Proc III Coll Int. on PTBC.*: 238-240. Orlando, E.E.U.U.

SMYTHE, R.H. (1951): "Some observations on Johne disease". *Vet. Rec.*, **63**: 359-363

STROMMINGER, B.; STEVENSON. K.; GERLACH, G.F. (2001): "Isolation and diagnostic potential of ISMav2, a novel insertion sequence-like element from *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*". *FEMS Microbiol. Lett.*, **196**: 31-37.

THOREL, M.F.; KRICHEVSKY, M.; LEVY-FREBAULT, V.V. (1990): "Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. *nov.*, *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* subsp. *nov.*, and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum*". *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **40**: 254-260

VAN KRUININGEN, H.J.; RUIZ, B.; GUMPRECHT, L. (1991): "Experimental disease in young chickens induced by a *Mycobacterium paratuberculosis* isolate from a patient with Crohn's disease". *Can. J. Vet. Res.*, **95**: 199-202.

VAN KRUININGEN, H.J.; CHIODINI, R.J.; THAYER, W.R.; COUTU, J.A.; MERKAL, R.S.; RUNNELS, P.L. (1986): "Experimental disease in infant goats induced by a *Mycobacterium subparatuberculosis* RMAN, D.M. (1985): "Current concepts in Johne's disease". *Med. Vet. Small Anim. Clin.*, **80**: 77-84

WHAN, L.B.; GRANT, I.R.; BALL, H.J.; SCOTT, R.; ROWE, M.T. (2001): "Bactericidal effect of chlorine on *Mycobacterium paratuberculosis* in drinking water". *Lett. Appl. Microbiol.*, **33**: 227-

WAYNE, L.G.; KUBICA, G.P. (1986): Family *Micobacteriaceae* Chester, 1987. En: "*Bergey's manual of Systematic Bacteriology*". Sneath, P.H.A.; Mair, N.S. Sharpe, M.E.; Holt, J.G. (Eds.) Willians & Wilkins Vol. 2.: 1436-1457. Baltimore, E.E.U.U. 231.

WHITTINGTON, R.J.; TARAGEL, C.A.; OTTAWAY, S.; MARSH, I., SEAMAN, J.;FRIDRIKSDOTTIR, V. (2001c): "Molecular epidemiological confirmation and circumstances of occurrence of sheep (S) strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cases of

WHITLOCK, R.H. (1998): "Enfermedad de Johne (paratuberculosis): Test diagnósticos individuales y a nivel de rebaño". *AMEMBE. Boletín informativo* **17**: 24-26.

YOKOMIZO, Y.; YUGI, H.; MERKAL, R.S. (1983): "A metod of avoiding false positive reactions in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculosis". *Jap.J. Vet. Sci.*, **47**: 111-119.

YOUNG, D.; GARBE, T.; LATHIGRA, R.; ABOU-ZEID, C. (1990): "Proteins antigens: structure, function and regulation. En: "*Molecular biology of the Mycobacteria*". McFadden, J. Surrey. D.(Eds.). University Press: 1-35. Londres, Reino Unido.

A N E X O

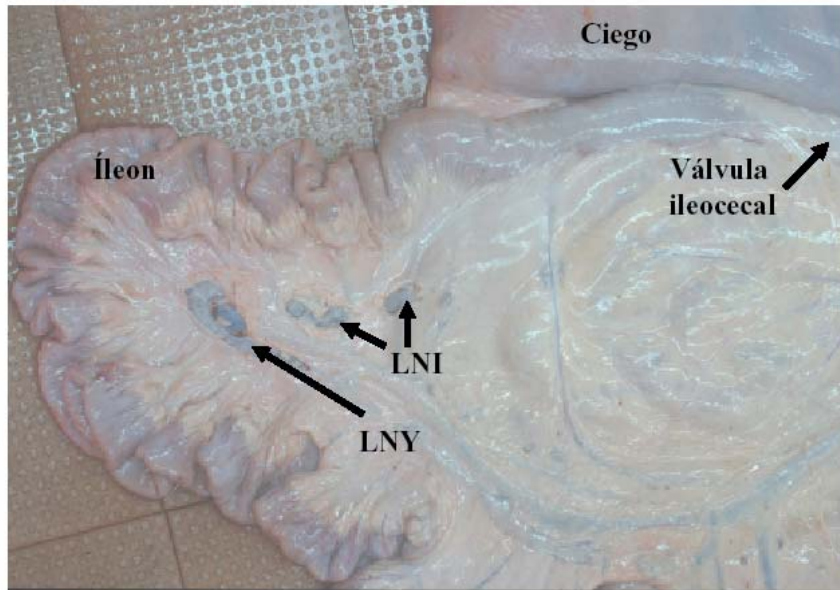


Fig. VIII-1. Localización, en una vaca sana, de las diferentes áreas intestinales y linfonodos tomados como muestras Tramo final de yeyuno, íleon, válvula ileocecal y ciego. Cadena de linfonodos yeyunales: linfonodo yeyunal caudal (LNY), ileales (LNI).

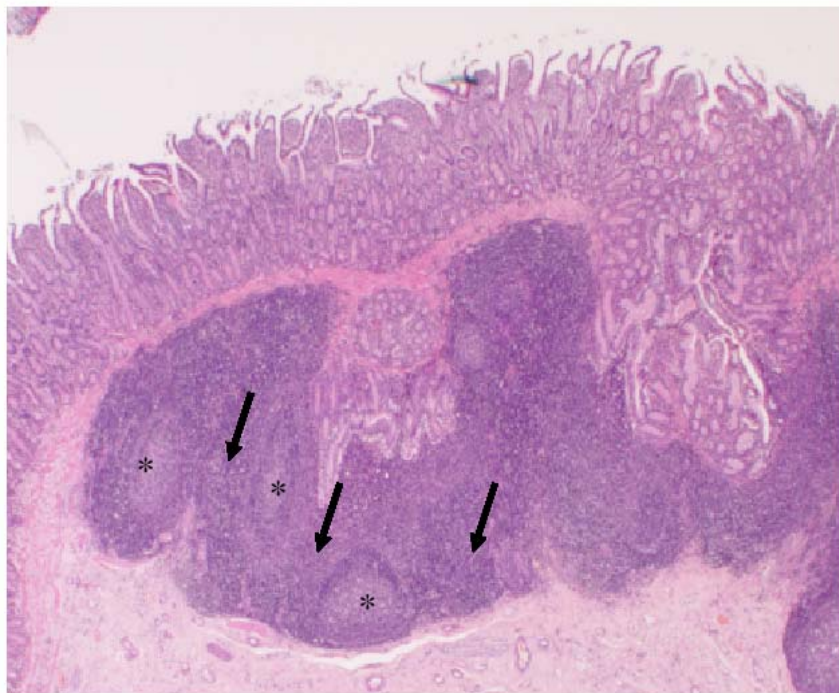
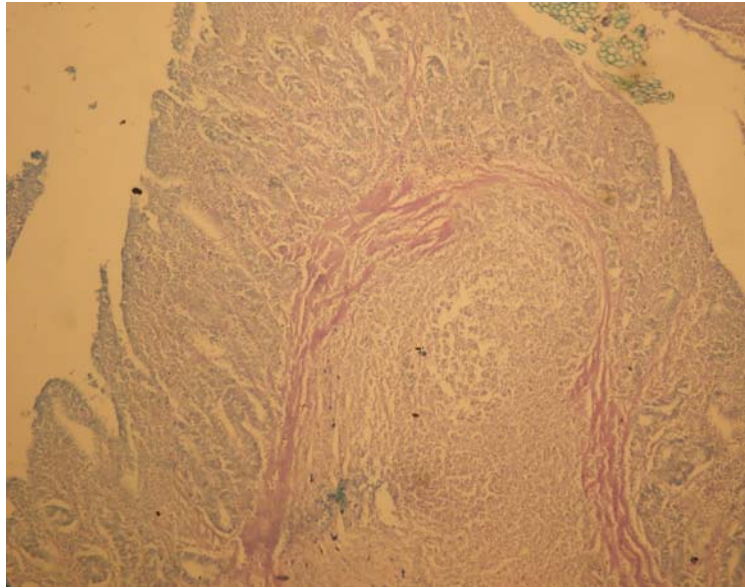


Fig. VIII-2. Morfología de la placa de Peyer de la válvula ileocecal (complejo linfoglandular) en una vaca sana. Se observan nódulos linfoides (*) y áreas interfoliculares (→) con criptas de Lieberkhün que atraviesan la muscular de la mucosa y penetran en el interior del tejido linfoide. H-E. X12,5.

Morfología de la válvula ileocecal. Microvellosidades intestinales.
Con tinción de H-E X10



Morfología de la microvellosidades intestinales (quiste parasitario) técnica de
ZN X20

