

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
“ANTONIO NARRO”  
UNIDAD LAGUNA**



**DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL.**

**TITULO**

**SEROPREVALENCIA DE PARATUBERCULOSIS EN CABRAS  
CRIOLLAS LECHERAS DE LA COMARCA LAGUNERA.**

**TORREÓN, COAHUILA**

**DICIEMBRE DEL 2001**

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA  
" ANTONIO NARRO"  
UNIDAD LAGUNA



DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

TESIS

POR:

PMVZ. FELIPE MARTÍNEZ RAMÍREZ.

*Ramón A. Delgado G.*  
M.C. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ.  
ASESOR PRINCIPAL.

TESIS QUE SE SOMETE A CONSIDERACIÓN DEL H. JURADO EXAMINADOR  
COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TITULO DE:

**MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

*Ramón A. Delgado G.*

**MC. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ**  
**PRESIDENTE DEL JURADO**

**DR. CARLOS LEYVA ORASMA**  
**VOCAL**

*Juan David Hernández Bustamante*

**Ph.D JUAN DAVID HERNÁNDEZ BUSTAMANTE**  
**VOCAL**

**M.V.Z. JESÚS GAETA COVARRUBIAS**  
**VOCAL SUPLENTE**

**COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL**

**MC. JORGE ITURBIDE RAMÍREZ**

  
Coordinación de la División  
Regional de Ciencia Animal  
UAAAN - UL

## DEDICATORIAS.

### **A MIS PADRES:**

SR. VICENTE MARTÍNEZ RESÉNDIZ.

SRA. MARÍA RAMÍREZ GONZÁLEZ.

Especialmente a mi madre, con admiración, agradecimiento y respeto.

### **A MIS HERMANOS:**

JOSÉ

JUANA

FRANCISCO

INOCENTE

Ma. DEL CARMEN

ALONSO

ROSALBA

Por que siempre estemos juntos

### **A MI ASESOR:**

MC RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ.

Por su confianza, su ejemplo de trabajo y tiempo empleado en la realización de mi tesis.

### **A UNA PERSONA EXTRAORDINARIA:**

CRISTINA HERNÁNDEZ CASTRO.

Con todo cariño y lo mejor de mí.

### **A MIS MAESTROS:**

DR. CARLOS LEYVA ORASMA por su apoyo incondicional y gran calidad humana,

Ph.D DAVID HERNÁNDEZ BUSTAMANTE, por su sincera amistad y ayuda desinteresada

M.V.Z. JESÚS GAETA COVARRUVIAS, por su grata participación en mi formación profesional.

**A MIS AMIGOS:** en general a todos los integrantes de la sección "A" de mi generación; también a: Mario, Jorge Arturo, Saúl, Maurilio, Sandro (QRO) Humberto, Silvano, Javier, Ángel, Moisés, José Luis, Mariano, Tomás, Jorge, y a todos los que de momento no recuerdo.

## **AGRADECIMIENTOS.**

### **A DIOS:**

POR DARMER SALUD, Y LA VOCACIÓN DE LA MEDICINA VETERINARIA.

### **A MI ALMA TERRA MATER:**

POR PERMITIRME ALCANZAR LA META QUE UN DIA ME TRACE.

### **A MIS AMIGOS:**

POR SU COMPAÑÍA, Y POR ENCONTRAR EN ELLOS EJEMPLOS QUE SEGUIR.

### **A MIS MAESTROS:**

POR BRINDARME SUS CONOCIMIENTOS Y EXPERIENCIAS ÚTILES PARA MI FORMACIÓN PROFESIONAL.

### **AL SEÑOR PEDRO ALBERTO ZERMEÑO PÉREZ:**

POR SU APRECIABLE COLABORACIÓN EN LA TOMA DE MUESTRAS INDISPENSABLES PARA LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO.

### **EN GENERAL:**

A TODOS AQUELLOS QUE DE ALGUNA U OTRA FORMA, ME BRINDARON SUS CONSEJOS Y APOYO, ASÍ COMO TAMBIÉN SU AMISTAD.

# INDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES .....	3
III. AGENTE ETIOLÓGICO .....	5
IV. EPIDEMIOLOGIA MUNDIAL DE PTB EN CABRAS .....	7
V. PATOGENIA .....	10
VI. SIGNOS CLINICOS Y CUADRO LESIONAL.....	17
6.1 Lesiones macroscópicas .....	18
6.2 Lesiones microscópicas .....	21
VII. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO .....	23
7.1 Examen clínico .....	24
7.2. Diagnóstico inmunológico.....	24
7.3. Diagnóstico bacteriológico.....	26
VIII. JUSTIFICACIÓN .....	31
IX. OBJETIVOS .....	32
X. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
10.1 Metodología.....	33
10.2 Principios de la prueba .....	34
10.3 Material requerido.....	35
10.4 Procedimiento .....	36
10.5 Criterio de validación .....	40
10.6 Interpretación .....	41
XI. RESULTADOS.....	41
XII. CONCLUSIONES .....	42
XIII. DISCUSIÓN .....	43
XIV. LITERATURA CITADA .....	46

## RESUMEN

Se analizaron 306 muestras de suero de cabras criollas lecheras de la Comarca Lagunera con el objetivo de conocer la seroprevalencia de la paratuberculosis. El estudio se inició a partir de una población de 43,804 cabras lecheras pertenecientes a 593 productores distribuidos en los municipios de Francisco I. Madero, San Pedro, Matamoros, Viesca, y Torreón pertenecientes al estado de Coahuila y Gómez Palacio, por parte del estado de Durango.

Las muestras de suero se analizaron en el laboratorio del centro de Análisis e Investigaciones Pecuarias de la Laguna (CAIPEL) en Gómez Palacio Durango. La prueba diagnóstica empleada fue ELISA (prueba inmunoabsorbente ligada a enzimas)

Se concluye que el periodo de prevalencia de paratuberculosis en cabras criollas lecheras de la Comarca Lagunera, encontrado con este trabajo es mínimo, si consideramos que el porcentaje de muestreo fue de 0.70% y que se encontraron tres cabras rectoras positivas a paratuberculosis que significa sólo un 1%.

## I. INTRODUCCIÓN

La paratuberculosis (PTB, enfermedad de Johne) es una enteritis granulomatosa, degenerativa, crónica, contagiosa, de origen infeccioso que afecta a los rumiantes tanto domésticos como salvajes. Se describió por primera vez en Alemania en 1895 como una forma de tuberculosis aviar, pero no fue hasta 1978 que el agente causal fue aislado de ganado bovino en México y hasta 1982 se aisló de cabras lecheras.

Aunque la paratuberculosis se ha considerado mucho tiempo una enfermedad económicamente importante en bovinos, ha sido en gran parte pasada por alto en ovejas y cabras probablemente porque el valor individual del animal es inferior. Las pérdidas económicas asociadas a la paratuberculosis en estos animales es en parte debido a la disminución en la producción láctea.

El impacto económico de otras condiciones asociadas con paratuberculosis (tales como infertilidad, infecciones concomitantes o la pérdida de recursos genéticos) son difíciles de cuantificar. Aunado a esto en los últimos años existe un renovado interés acerca de las posibles implicaciones zoonóticas de *Map*, ya que existen indicios que asocian esta micobacteria a la enfermedad de Crohn. Las manifestaciones clínicas en cabras son: pérdida progresiva de la condición corporal, debilidad y disminución en la producción, también puede ocurrir diarrea intermitente pero es más común en bovinos; durante las etapas terminales otros agentes infecciosos oportunistas pueden presentarse, los cuales contribuyen a acelerar el curso de la enfermedad.

La región lagunera cuenta con un inventario caprino de 600,000 animales criollos, por lo que es una importante zona productora de leche de cabra a nivel nacional. Generalmente la mayor parte de este ganado se encuentra agrupado en pequeños hatos que pertenecen a los sectores marginados del campesinado. En base a lo anterior es frecuente encontrar rebaños en pésimas condiciones productivas en las que los aspectos nutricionales y sanitarios se presentan como los factores limitantes de mayor importancia.

Retomando el aspecto sanitario podemos señalar que existen severos problemas en las explotaciones, donde el hacinamiento, la falta de higiene y las construcciones inadecuadas favorecen la transmisión y permanencia de los agentes infecciosos. Esta combinación de animales mal nutridos que no pueden establecer una respuesta inmune adecuada con un ambiente sobrecontaminado resulta en cuadros alarmantes de las distintas enfermedades, con graves pérdidas de condición y muerte en los hatos.

Entonces juega un papel de suma importancia la incorporación de tecnologías sofisticadas a este tipo de explotaciones, estableciendo pruebas de diagnóstico rápidas y confiables capaces de detectar a los animales positivos en este caso para *Mycobacterium paratuberculosis*, el objetivo que perseguimos es determinar si se trata de una enfermedad ampliamente extendida y que suponga una seria limitación a la productividad de las explotaciones que la padecen; mediante el análisis serológico de ELISA (prueba inmunoabsorbente ligada a enzimas)

## II. ANTECEDENTES

En 1895 en la región de Oldenburg Alemania, fue observada una vaca con diarrea, pérdida de peso y suspensión de la producción láctea, las muestras de intestino fueron enviadas a examinarse a la unidad de patología veterinaria en Dresden, los tejidos fueron examinados por el Dr. H. A. Johne y el Dr. L. Frothingam, notaron engrosamiento de la mucosa intestinal y nódulos linfáticos mesentéricos y en la examinación histológica encontraron la pared intestinal con exceso de infiltración de leucocitos, células epitelioides y ocasionalmente células gigantes (Chiodini, *et. al*, 1984).

Johne y Frothingam concluyeron que la enfermedad observada fue provocada por una bacteria que causa tuberculosis en aves (*Mycobacterium avium*) y reconocieron la similaridad de la patología con la tuberculosis intestinal (normalmente causada por bacterias que causan tuberculosis en bovinos, *Mycobacterium bovis*) propusieron el nombre de pseudotuberculosis entérica para la enfermedad (Chiodini, *et.al* , 1984; Pijoan *et. al*, 1986).

En los inicios de los 1900's la enteritis pseudotuberculosa fue bien reconocida como una nueva enfermedad. Los científicos propusieron una variedad de nombres para la enfermedad, tales alternativas eran paratuberculosis y enteritis hipertrófica. En el principal reporte anual de 1906 del real colegio veterinario J. Mc Fadyean ideó el término de "enfermedad de Johne" o paratuberculosis para designar a la enfermedad (Chiodini, *et. al*, 1984).

En Dinamarca O. Bang (citado por Chiodini, *et. al*, 1984) descubrió que los animales portadores de la enfermedad de Johne respondían lentamente a la inyección intradérmica preparada de antígenos del bacilo tuberculoso (*Mycobacterium bovis*) pero respondían bien a la tuberculina aviar (antígenos preparados de *Mycobacterium avium*), en base a esta observación Bang sugirió que la tuberculina aviar puede ser usada para prueba de diagnóstico en animales (Chiodini, *et. al*, 1984).

En 1911 el científico británico F.W. Twort fue el primero en aislar el agente etiológico de la enfermedad de Johne. En México Unzueta en 1936 (citado por Ramírez *et. al*, 1986) informa la presencia de la enfermedad en bovinos lecheros utilizando como medio de diagnóstico la aplicación de Johnina y tuberculina aviar y también al observar el bacilo al microscopio. El aislamiento del microorganismo a partir de muestras de ganglios mesentéricos e intestino delgado de ganado bovino se realizó en 1978 (Chiodini, *et.al* 1984; Ramírez *et. al*, 1986)

### III. AGENTE ETIOLÓGICO.

La paratuberculosis o enfermedad de Johne es causada por una bacteria ácido-resistente *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (Map, *M. johnei*) (Jakobsen *et. al*, 2000; Gasteiner *et. al*, 1998; Vander Giessen, *et. al*, 1996; Pijoan *et. al*, 1986).

Del griego *myces* hongo, *bacterium* pequeño bastoncillo (William y Richard, 1978). Se clasifica entre las bacterias superiores, orden *actinomycetales*, del género *Mycobacterium*, este género no se incluye entre las bacterias verdaderas, sino que a causa de la arborización ocasional y de la naturaleza filamentosa de sus especies se coloca en el orden *Actinomycetales* (Kenneth y Williams, 1971; William y Richard, 1978).

Las mycobacterias poseen un componente céreo que las hace resistentes a los colorantes ordinarios y a muchos desinfectantes, tienen un contenido especialmente abundante de material graso en su composición. Por medios químicos se han obtenido de las células bacterianas lípidos complejos, ceras y fosfátidos. Una característica sobresaliente es su capacidad para tomar una tinción ácido-resistente, esta propiedad especial de tinción es conferida por las grandes cantidades de materiales céreos. El término ácido-resistente deriva del hecho comprobado, de que cuando la célula ha sido impregnada por un colorante este no puede eliminarse fácilmente (Stanier y Adelberg, 1977; Kenneth y Williams, 1971; William y Richard 1978).

Las microfotografías electrónicas muestran que las paredes están compuestas de tres capas que envuelven una membrana citoplasmática, en este aspecto las mycobacterias son similares a las bacterias gram-negativas típicas (Kenneth y Williams, 1971).

El *Mycobacterium paratuberculosis* es semejante antigénica y morfológicamente a las mycobacterias que causan la tuberculosis; es difícil de cultivar debido a que no crece con facilidad en medios normales, para su cultivo primario es necesario el enriquecimiento del medio con agar y yema de huevo, es costumbre emplear algún extracto de algún mycobacterium, por lo general *Mycobacterium Phlei* ó bacilos tuberculosos muertos (factor de crecimiento llamado micobactina, en este cultivo metaboliza y prolifera lentamente, pero los subcultivos siguientes son más abundantes, inclusive hasta en los medios no enriquecidos (Pijoan *et. al*, 1986; Allen y Baker, 1976).

Muere con la exposición durante 15 minutos a compuestos cresílicos diluidos a una proporción de 1:64, fenol 1:40 y alcohol etílico al 70% (Pijoan *et. al*, 1986).

#### IV. EPIDEMIOLOGIA MUNDIAL DE LA PARATUBERCULOSIS EN CABRAS.

La enfermedad ocurre en todo el mundo y la prevalencia parece ir en aumento en algunos países (Matthias *et. al*, 1998; Blood y Radostits, 1992).

Se ha reportado el incremento en la incidencia de la paratuberculosis en Estados Unidos, Canadá, India, Australia, Nueva Zelanda, Sudáfrica y Sudamérica, dentro de Europa la enfermedad se encuentra más comúnmente en España, Inglaterra, Francia y el norte de Alemania (Gasteiner, *et. al*, 1998; Michel, 1999).

Es más frecuente en bovinos y en menor grado en ovinos y caprinos. La incidencia es mayor en aquellos animales criados de forma intensiva bajo condiciones climáticas templadas y regiones tropicales húmedas y de manejo que conduzcan a la propagación de la infección. Estos animales estabulados están sujetos a un alto riesgo de infección debido a la gran contaminación de las heces y la prolongada supervivencia de la bacteria en sitios protegidos. La enfermedad cada vez se presenta con mayor frecuencia en caprinos, originando grandes pérdidas en los rebaños, siendo en dichos casos recomendable la inmunización (Blood y Radostits, 1992).

Mainar-Jaime y Vázquez-Boland (1997) señalan que la paratuberculosis tiene una prevalencia más alta en animales lecheros que en animales de carne, lo que probablemente refleja las diferentes condiciones de manejo bajo las cuales son alojados (intensivo y extensivo respectivamente) también se observa que los mejores animales parecen ser más propensos.

Las ovejas y cabras adquieren la infección a una edad temprana, generalmente durante los primeros seis meses (Pijoan *et. al*, 1986), al respecto Blood y Radostits (1992) señalan que una característica distintiva de la enfermedad de Johne es que afecta a animales muy jóvenes, generalmente menores de 30 días de edad, y la enfermedad clínica no aparece hasta los 3-5 años, aunque este límite de edad no debe usarse como criterio diagnóstico de confianza. Saxegaard y Fodstad (1985) coinciden en que los animales pueden contraer la infección tempranamente, generalmente antes de los tres meses de edad pero pueden no desarrollar signos hasta 2 años más tarde.

En condiciones naturales la enfermedad se transmite por ingestión de alimentos y bebidas contaminadas por heces de animales infectados que excretan esta infección de tipo subclínico. Las diversas circunstancias que tienen alguna influencia en la posibilidad de transformar esta infección en padecimiento clínico pueden ser factores como el parto, deficiencias y excesos nutricionales, transporte y elevado rendimiento lácteo. Dado que el periodo de incubación normalmente es prolongado, los animales enfermos pueden excretar microorganismos en las heces durante 15-18 meses antes de presentar signo clínico alguno (Stehman, 1992; Blood y Radostits, 1992; Pijoan, *et. al*, 1986)

La paratuberculosis es casi siempre introducida al rebaño por un animal infectado, el cual no muestra signos al momento de la compra, por lo tanto el retraso en el diagnóstico puede resultar en el establecimiento de la

enfermedad en un hato.

En México un gran porcentaje de los rebaños de cabras, están formados por animales importados de países en donde esta enfermedad existe con alta incidencia (Pijoan *et. al*, 1986).

En un estudio realizado por Jakobsen *et. al* (1999) en Dinamarca señala que hatos con ganado de carne importados, hatos de ganado lechero con un promedio importante en la proporción de vacas adultas y hatos en contacto con cabras, especialmente aquellos hatos caprinos con un bajo control de paratuberculosis, se encontró que tienen una alta prevalencia para paratuberculosis.

En la república de Sudáfrica, Koen, (1999) al realizar un muestreo de 47 granjas de 1996 a 1997, empleando pruebas para paratuberculosis de agar gel inmunodifusión (AGID) confirmando el diagnóstico por histopatología encontró que la distribución de las granjas infectadas indica una correlación positiva entre suelos ácidos (especialmente silicatos) y la infección. Solamente 1 de 47 granjas no estaba localizada en suelos ácidos; Blood y Radostits (1992) indican que en Estados Unidos se registra una elevada incidencia de la enfermedad sobre suelos ácidos, en contraste con lo que ocurre en suelos alcalinos, ya que el microorganismo es relativamente susceptible a el p.H alto del suelo.

## V. PATOGENIA.

Un número de puntos relativos a la patogénesis de la paratuberculosis, permanecen oscuros, muy incompletos, incluyendo la alta susceptibilidad de animales jóvenes y la razón por la cual las lesiones ocurren particularmente en la porción terminal del ileón y la válvula ileocecal (Juste *et.al*, 1994; Clarke, 1997).

Generalmente los microorganismos son ingeridos durante la etapa de lactancia, después de ingeridos comienzan a multiplicarse lentamente en la lamina propia del intestino, nódulos linfáticos mesentéricos y en el interior de los macrófagos induciendo una enteritis granulomatosa crónica. La progresión de la enfermedad es insidiosa, la enfermedad clínica sigue sólo unos años después de la infección inicial, lo cual ocurre con más frecuencia dentro de los primeros 6 meses de vida (Pijoan *et. al*, 1986; Secott *et. al*, 1999; Waters *et. al*, 1999).

Durante la etapa subclínica de la enfermedad los animales, generalmente tienen niveles indetectables de anticuerpos séricos específicos para *Map*, se incrementa el gamma interferon en respuesta al microorganismo y no se detecta la bacteria debido al escaso número de ellas en las heces ( Waters *et. al*, 1999).

Se conoce que independientemente de la vía de inoculación aunque el microorganismo pueda aparecer en diferentes órganos, gradualmente su presencia se hace más predominante en el tracto intestinal. El tropismo que manifiesta *Map* por el tejido intestinal podría deberse a la estimulación de las enzimas oxidativas de los macrófagos intestinales, liberadas después de la

infección (Pijoan *et. al*, 1986).

Típicamente al inicio de la enfermedad *Mycobacterium paratuberculosis* se localiza en el ileón, su pared contiene un gran número de tejido linfoide: las placas de Peyer, son grupos de macrófagos y linfocitos que están organizados en muchos nódulos linfáticos, su cubierta tiene una capa de células llamadas células M, su función es circular en el lumen del intestino donde capturan preferentemente a *Mycobacterium paratuberculosis* antes de retornar a las placas de Peyer para mostrar esos antígenos a los macrófagos y linfocitos siendo fagocitados por ellos (Chiodini *et. al*, 1984; Juste *et. al*, 1997; Secott *et. al* 1999).

Uno de los papeles de las placas de Peyer es modular la respuesta inmune contra la enorme cantidad de antígenos que alcanzan la superficie digestiva, esto incluye el desarrollo de la tolerancia a algunos de ellos, pues es conocida la habilidad de la bacteria para inducir tolerancia. La hipótesis de la tolerancia parcial puede explicar la duradera persistencia de la infección sin signos clínicos y el conocimiento de lo variable que es la respuesta inmune de los animales paratuberculosos que impide en gran medida el uso de pruebas serológicas e intradérmicas para el diagnóstico. Por lo tanto las placas de Peyer son un medio inmune especial en el que existe un delicado balance entre señales estimuladoras e inhibitorias (Juste *et. al*, 1994).

Desafortunadamente cuando las células M llevan la bacteria hacia las placas de Peyer encuentran un lugar ideal para crecer. El macrófago es la célula

---

blanco para la infección y por lo tanto tiene un papel fundamental para la comprensión del microorganismo, al multiplicarse en estas células quedan protegidos de los anticuerpos formados por el animal y de la mayoría de los antimicrobianos empleados como tratamiento. Los macrófagos engloban a *Mycobacterium paratuberculosis* con la intención de destruir al invasor extraño. Por razones que aún son confusas los macrófagos fallan en este intento (Chiodini *et. al*, 1984; Alzuherri *et. al*, 1997).

Los factores específicos (el complejo 85 ABC, la proteína de unión fibronectina FAP) pueden tener un papel en la unión a la matriz extracelular y puede mediar también el ingreso a los macrófagos. Entre las moléculas que forman la pared y envoltura celular están los glicolípidos fenólicos (PGL4 y otros) se encuentran en estudio que suprimen las enzimas oxidativas de los macrófagos al encontrar radicales libres e inducir una respuesta fuerte de anticuerpos que puede ser desfavorable para el huésped (Bercovier, 1996).

El siguiente paso requiere que estos macrófagos alcancen el área interfolicular y generen una orden a los linfocitos T que caracterizan este sitio, para presentar a los antígenos de la micobacteria a todo el sistema inmune (Juste *et. al*, 1994; Alzuherri *et. al*, 1997).

La infección se asocia con la disminución de la presentación de antígenos por parte de los macrófagos a los linfocitos, lo que puede por lo tanto alterar una respuesta inmune potencialmente efectiva del animal y permite la supervivencia intracelular de la micobacteria. La pobre presentación de los antígenos puede

resultar en una falta de mecanismos efectores de las células T tales como el gamma interferon mediado por la destrucción intracelular que es reconocido en otras micobacteriosis (Alzuherri *et. al*, 1997).

Se conoce también que el aumento en la disponibilidad de intermediarios metabólicos en estos macrófagos y no en otras células similares(en otras localizaciones), puede estimular la multiplicación bacteriana. Este ambiente favorable para el crecimiento bacteriano se hace óptimo por la pérdida de la actividad lisosomal de los macrófagos, los cuales están dedicados a ingerir a los bacilos paratuberculosos que se están multiplicando en la lamina propia del intestino (Pijoan *et. al*, 1986).

Ante la invasión de *Mycobacterium paratuberculosis* se concentran más macrófagos y linfocitos en el sitio de la infección. Los linfocitos liberan una variedad de señales químicas denominadas citokinas en un intento de incrementar el poder destructivo bacteriano de los macrófagos, estos a su vez, se fusionan formando células gigantes multinucleadas en un intento aparente de destruir a la micobacteria (Chiodini *et. al*, 1984).

En el interior de los macrófagos *Map* se multiplica hasta que eventualmente la célula muere y se extiende infectando otras células cercanas. A su vez otras partes del ileon y eventualmente otras partes del organismo son invadidas por millones de bacterias. Como *Map* persiste, prolifera y evade la eficiencia normal de los mecanismos de destrucción bacteriana de los macrófagos aún es desconocido (Chiodini *et. al*, 1984; Alzuherri *et. al*, 1997).

Considerables investigaciones son llevadas a cabo para tratar de entender como la micobacteria prospera considerando que es muy hostil el medio ambiente intracelular de los macrófagos. En términos generales dos propiedades de la micobacteria explican esta resistencia a la destrucción de los macrófagos :

**a.-)** la pared celular de la micobacteria químicamente única es resistente a la destrucción o penetración.

**b.-)** factores producidos por la micobacteria que pueden neutralizar los químicos antibacterianos producidos en el interior de los macrófagos (Chiodini *et. al*, 1984).

La lipoarabinomana (LAM) es el componente principal de la pared de la micobacteria. Lipomana (LM) y el fosfatidil inositol manosido (PIM) son las versiones simples de LAM, LM le falta arabinosa mientras que PIM le falta tanto arabinosa y más residuos mana. LAM, LM y PIM inducen la transcripción del mRNA de la citokina. Eliminando citokinas producidas por macrófagos, induciendo además la no producción de estas en macrófagos de ratón y suprimiendo la proliferación de células T inducidas por antígenos (Bercovier, 1996)

Ante la replicación bacteriana el huésped como consecuencia genera una respuesta celular inmune. En una respuesta efectiva las moléculas clase II superficiales del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) juegan un papel crítico en la presentación de antígenos por parte de las células T capaces de

---

regular y amplificar la respuesta inmune específica, por lo que la respuesta inmune de las células T es esencial para limitar la severidad de la infección. En la infección avanzada, ocurre producción de anticuerpos, pero no tiene efecto en el control de la multiplicación de *Mycobacterium paratuberculosis*. Claramente la producción de anticuerpos proporciona poca o sólo alguna protección contra el patógeno intracelular. No obstante, las células B pueden proveer apoyo para la respuesta de las células T a través de la presentación de antígenos y función coestimuladora (Chiodini *et. al*, 1984; Alzuherri *et. al*, 1997, Waters *et. al*, 1999; Secott *et. al*, 1999).

La localización inicial de las lesiones en las placas de Peyer sugieren 2 importantes conclusiones sobre la patogénesis de la paratuberculosis en relación con la ontogenia de esta estructura. La primera sobre la localización específica de las lesiones es mejor explicado con su asociación con el tejido linfoide denso de las placas de Peyer, tal hipótesis previa está basada en la retención mecánica craneal de la válvula ileocecal o a la alta concentración de hierro en los macrófagos de esta área. La disponibilidad de hierro en el huésped es muy limitada por lo tanto las bacterias tienen que desarrollar un sistema obligado eficiente para el hierro. Muchas de las micobacterias excepto *Map* tienen un doble sistema obligado para el hierro (exochelina y mycobactina) que permiten la adquisición de hierro para el crecimiento y responder al medio ambiente con diferente contenido de hierro. Se ha estimado que requiere de 7 a 64 microgramos de Fe/gr. de masa celular de micobacteria para sostener el

crecimiento (Juste *et. al*, 1997).

La segunda conclusión tentativa relacionada con el periodo de alta susceptibilidad a la infección que es justo cuando las placas de Peyer alcanzan su máximo desarrollo con respecto al tiempo de nacimiento. Esto es también compatible con la infección en la edad adulta porque la susceptibilidad fue relativa con la extensión del tejido linfoide denso intestinal en animales adultos la probabilidad de la infección desciende pero no desaparece totalmente (Juste *et. al*, 1997; De Voss *et. al*, 1999).

## VI. SIGNOS CLÍNICOS Y CUADRO LESIONAL.

El periodo de incubación de este padecimiento es prolongado e irregular de dos años o más. Los signos se manifiestan generalmente entre los 3 a 5 años de edad pero se han observado casos en animales de 1 a 2 años. Un alto porcentaje de los animales infectados en un rebaño, puede no desarrollar la fase clínica de cualquier forma estos animales estarán eliminando intermitentemente el microorganismo por las heces quedando como reservorios (Pijoan *et. al*, 1986; Blood y Radostits, 1992).

Los principales signos clínicos en pequeños rumiantes son la pérdida progresiva de condición corporal, adelgazamiento, debilidad y descenso en la producción. La pérdida de peso es un signo constante de la enfermedad de Johne, generalmente es lenta y puede que no sea detectada cuando los animales tienen una densa capa de pelo o lana (Mainar-Jaime y Vázquez-Boland, 1997; Chiodini *et. al*, 1984).

Los bovinos con paratuberculosis clínica son fácilmente reconocidos por la presencia de diarrea profusa crónica sin mal olor al principio de la infección, acompañada por una pérdida progresiva de peso, debilitamiento y pueden presentar fiebre intermitente. En contraste los caprinos afectados rara vez desarrollan diarrea acuosa abundante, continúan produciendo heces con aspecto de bolas, salvo en forma intermitente y en las fases terminales de la

enfermedad, en estos casos, las heces pierden su forma característica y pueden ser de consistencia lo suficientemente blandas como para perder su aspecto normal de bolas y aparecerán blandas y pastosas parecidas a las heces de perros y humanos. El decaimiento y la disnea son evidentes en las cabras, la emaciación, la deshidratación, el pelo hirsuto en casos avanzados de paratuberculosis. Un hecho importante es que el apetito de los animales infectados se conserva y la pérdida progresiva de peso puede ser en muchos casos el único signo aparente pero no específico. Por consiguiente cuando los animales son sometidos a la necropsia, la infección se encuentra muy avanzada, los animales se encuentran extremadamente enflaquecidos y si aún viven están débiles (Chiodini *et. al*, 1984; Pijoan *et. al*, 1986; Blood y Radostits, 1992; Mainar-Jaime y Vázquez-Boland, 1997).

## **6.1 LESIONES MACROSCÓPICAS**

La gravedad de las lesiones no guarda relación con la diarrea y la emaciación de forma que algunos animales con lesiones graves pueden aparecer clínicamente normales, mientras que muchos graves con signos clínicos intensos y crónicamente afectados no muestran lesiones macroscópicas definidas o suelen ser mínimas (Pijoan *et. al*, 1986, Blood y Radostits, 1992).

En los caprinos las lesiones quedan restringidas a la parte posterior del aparato digestivo y ganglios linfáticos vecinos, estudios patológicos revelan engrosamiento predominantemente en la mucosa intestinal del ileon, ciego y la

primera parte del colon, no obstante en cabras con la enfermedad avanzada las lesiones fueron detectadas en la totalidad del tracto intestinal, hígado, bazo y pulmones (Gezon *et. al*, 1988; Blood y Radostits, 1992; Alzuherri *et. al*, 1997).

Gezon *et. al* (1988), encontraron que la amiloidosis estaba presente en el bazo, hígado, riñones y glándulas adrenales de 67 de 118 cabras necropsiadas con paratuberculosis (56.8%), y 149 de 387 cabras (38.5%), sin evidencia bacteriológica o histológica de paratuberculosis. En el yeyuno e ileon se pueden presentar varios grados de engrosamiento, aunque esta lesión es poco común, y no tiene utilidad diagnóstica (Chiodini *et. al*, 1984; Pijoan *et. al*, 1986). Sin embargo Blood y Radostits (1992), señalaron que es característico el engrosamiento de la pared intestinal hasta tres o cuatro veces su grosor normal con plegamiento de la mucosa. Aunado a esto la válvula ileocecal se haya siempre afectada, y la lesión varía desde el enrojecimiento de los labios en etapas iniciales, hasta edema con engrosamiento y arrugamiento posterior.

En un estudio conducido por Juste *et. al* (1997), en una infección experimental de 17 corderos, vacunados y no vacunados divididos en 4 grupos encontraron lesiones de engrosamiento solamente en uno vacunado y en uno no vacunado sacrificado a los 220 días postinfección. En el cordero no vacunado las lesiones consistían en nódulos prominentes de 3-8 mm de diámetro con el centro caseoso presentes por todas partes del intestino delgado, pero más abundantes (casi confluentes), en las proximidades de la válvula ileocecal. En el animal

vacunado las lesiones fueron también nodulares, pero mucho menos voluminosas y no caseosas. A nivel microscópico no hubo lesiones a los 15 días al sacrificio. A los 45 días no hubo diferencias entre los corderos no vacunados y vacunados. Los corderos vacunados presentaron claras lesiones granulomatosas en el área interfolicular de las placas de Peyer y en los nódulos linfáticos mesentéricos e íleocecales. Los animales no vacunados mostraron solamente una infiltración polimorfonuclear comparable con las áreas de las placas de Peyer de el ileon, invadiendo los folículos y destruyendo esta estructura, en la válvula ileocecal los cambios también se dan en el área interfolicular, presentaron características más granulomatosas pero estaban pobremente delineados. A los 120 días los cambios en ambos grupos fueron definitivamente granulomatosos y mas extensos en los corderos vacunados que en los no vacunados. Sin embargo, en los primeros hubo evidencias de encapsulamiento del granuloma. El grupo vacunado sacrificado a 220 días presentaron menos granulomas, pequeños y mejor definidos que en los animales no vacunados en los que hubo un incremento en el numero de granulomas grandes. Los cambios estuvieron aún en gran parte confinados a los espacios interfoliculares de las placas de Peyer y nódulos linfáticos. Además de las lesiones en el intestino asociadas con los nódulos linfáticos, las lesiones granulomatosas se encontraron frecuentemente en los nódulos linfáticos mediastínicos y hepáticos.

Una lesión característica importante para el diagnóstico será la

linfadenitis, donde los ganglios mesentéricos e ileocecales se encuentran aumentados de tamaño, hipertrofiados, edematosos y ocasionalmente con zonas de necrosis caseosa y calcificación causando “sensación de arena” al corte, esta lesión sólo se presenta en uno de cada cuatro animales (Chiodini *et. al*, 1984; Pijoan *et. al*, 1986; Blood y Radostits, 1992).

## 6.2 LESIONES MICROSCÓPICAS

Como en los ovinos y caprinos es usual que las lesiones macroscópicas sean mínimas es importante las observaciones de las lesiones microscópicas (Pijoan *et. al*, 1986).

La infiltración de los tejidos infectados con millones de linfocitos y macrófagos induce un engrosamiento visible del intestino, el ileon se encuentra infiltrado con células mononucleares inflamatorias, macrófagos y linfocitos. Con frecuencia los macrófagos se fusionan para formar células gigantes. Tal respuesta inflamatoria es llamada inflamación granulomatosa. Esta es similar en muchos aspectos a la encontrada en la tuberculosis, de cualquier modo la inflamación granulomatosa encontrada en la enfermedad de Johne no está organizada en granulomas o tubérculos bien circunscritos si no que es difusa. La necrosis caseosa (células que forman un material de color y consistencia como de “harina de avena”, cocida y espesa), se encuentra en el centro de las lesiones causadas por tuberculosis. La necrosis caseosa generalmente no es observada en la enfermedad de Johne, en bovinos, algunas veces las ovejas pueden

presentar necrosis caseosa de los nódulos linfáticos (Chiodini *et. al*, 1984).

Alzuherri *et. al* (1997), encontraron a la necropsia en 7 de 14 ovejas adultas de 2-5 años de edad, provenientes de un rebaño con el problema establecido de paratuberculosis, y que presentaban signos clínicos de pérdida progresiva de peso y evidencia serológica de infección con *Mycobacterium paratuberculosis* positivas a resultados de pruebas de inmunodifusión en agar gel (AGID) y ensayo de inmunoabsorbencia ligada a enzimas (ELISA), a la examinación histológica de los tejidos mostró lesiones de una enteritis granulomatosa crónica severa con atrofia. La mucosa del intestino afectado estaba marcadamente engrosada e infiltrada por capas de macrófagos con abundante citoplasma eosinofílico pálido células epitelioides. La tinción de Ziehl-Neelsen reveló un gran número de bacterias ácido-resistentes dentro del citoplasma en los macrófagos en el intestino y nódulos linfáticos. Estos animales fueron clasificados las lesiones de tipo lepromatoso. Las 7 ovejas enfermas restantes tuvieron resultados poco convincentes para ELISA y fueron negativas a los resultados de AGID. Las lesiones de engrosamiento fueron similares al grupo lepromatoso, pero la examinación histológica del intestino mostró una enteritis granulomatosa con pequeños granulomas multifocales compuestos de agregados de células epitelioides entre una notable infiltración linfocitaria. La tinción de Ziehl-Neelsen en este caso mostró muy pocos organismos ácido-resistentes intracelulares. Estas lesiones fueron clasificadas como tipo tuberculoide.

## VII. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO.

Confirmar un diagnóstico tentativo de la enfermedad de Johne en el animal vivo presenta dificultades debido a la falta de una prueba serológica rápida, específica sensitiva, el crecimiento lento del microorganismo en cultivo de heces, la falta de sensibilidad de PCR directa de muestras fecales, la cual no es confiable en casos de eliminación baja e intermedia del microorganismo (Chang *et.al*, 1999; Murray *et. al*, 1999; Pijoan *et. al*, 1986, Ramírez *et. al*, . 1986).

Además en el estado temprano no se muestran signos, o son pocos, y en los últimos estadios son inespecíficos pudiéndose confundir con otras enfermedades. Otras causas de pérdida de peso injustificada en ovinos y caprinos son: la linfadenitis caseosa, abscesos internos, parasitismo gastrointestinal, artritis encefalitis caprina, neumonía progresiva ovina, deficiencias dietéticas y enfermedad dental, especialmente parasitosis internas, que es un padecimiento muy común en los hatos nacionales (Ramírez *et. al*, 1983; Pijoan *et. al*, 1986; Blood y Radostits, 1992).

Con frecuencia los animales infectados se sacrifican por otras razones, como problemas reproductivos o parasitosis antes de que los signos típicos de la enfermedad aparezcan. Por esta razón el diagnóstico deberá llevarse a cabo lo más rápidamente posible. La principal dificultad que existe para el diagnóstico de

la paratuberculosis es la identificación correcta de los animales que son resistentes y que no se infectan, pero pueden ser positivos a alguna prueba cutánea o serológica y de aquellos otros que se encuentran en el estadio intermedio, excretando el microorganismo en las heces aunque sean negativos a la prueba serológica (Ramírez *et. al*, 1983; Blood y Radostits, 1992).

Para el diagnóstico de esta enfermedad se han empleado un sinnúmero de pruebas. Sin embargo hay que señalar que estas pruebas tienen una alta proporción de resultados falsos positivos y falsos negativos, lo cual puede deberse a la ocurrencia de reacciones cruzadas en animales que estuvieron expuestos a otras micobacterias y hongos, y las diferencias importantes entre las cepas de micobacterias no son aún del todo claras (Ambrosio *et. al*, 1991; Pijoan *et. al*, 1986).

Las pruebas diagnósticas incluyen:

**a.-) examen clínico**, el signo clínico más característico en los ovinos y caprinos es la pérdida de condición acompañada de edema submandibular, debilidad, la diarrea es menos frecuente y está presente únicamente en casos terminales, o bien con ataques intermitentes y diarrea leve (Pijoan *et. al*, 1986; Blood y Radostits, 1992).

**b.-) diagnóstico inmunológico:**

1.- **las pruebas in vivo de inmunidad:** fueron las que primero se emplearon en el diagnóstico de la paratuberculosis, utilizando tuberculina aviar y posteriormente Johnina en inoculación intradérmica. Se ha visto que la

técnica más apropiada para cabras es la inoculación de Johnina por vía subcutánea, intradérmica o intravenosa. Esta prueba resulta en una reacción local similar a la encontrada en tuberculosis. El problema de este tipo de pruebas es que puede ocurrir reacciones falsas positivas por infección con otras micobacterias y organismos relacionados, por lo que se les considera como métodos poco específicos, sin embargo se reporta también una prevalencia alta de positivos en hatos donde el organismo ha sido aislado, lo que sugiere que esta prueba puede tener valor en un hato base.

**2.- Pruebas basadas en inmunidad humoral :** las pruebas serológicas son rápidas y fáciles de realizar, de cualquier modo, ninguna de ellas ha sido lo suficientemente sensitiva o específica. De estas pruebas solamente la prueba de inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), y la prueba de inmunodifusión en gel (AGID) se emplean en el diagnóstico de la paratuberculosis en ovinos y caprinos (Vander Giessen *et. al* 1996; Pijoan *et. al*, 1986).

Recientemente la prueba de inmunoabsorbente ligado a enzimas con una especificidad cercana al 100% fue desarrollada en hatos negativos a paratuberculosis. De cualquier modo las reacciones cruzadas con anticuerpos inducidos por vacunas seguirá siendo un problema. Pero el problema más importante es todavía la insuficiente sensibilidad que varía entre 47 y 60% en animales infectados y positivos a cultivo respectivamente (Vander Giessen *et. al* 1996).

La prueba de inmunodifusión en gel se ha reportado como una técnica efectiva para la identificación de cabras infectadas con *Mycobacterium paratuberculosis*. Esta técnica no ha sido muy eficaz en bovinos, pero se ha visto que si es específica para cabras. La prueba tiene la ventaja de bajo costo, ser de fácil uso, rápida y requerir una pequeña cantidad de suero y contando con el antígeno, puede hacerse en condiciones de campo, en cabras se ha visto que es de gran utilidad para detectar a los animales infectados a nivel de hato, no así para la identificación de animales individualmente (Ramírez *et. al*, 1983).

### **c.-) Diagnóstico bacteriológico:**

**1.- examen microscópico**, el frotis de raspado de mucosa rectal coloreado con la tinción de Ziehl-Nielsen es uno de los métodos más rápidos pero tiene las desventajas de que no detecta concentraciones bajas de microorganismos, por lo que algunos laboratorios prefieren utilizar la tinción fluorescente de aureamina o para detectar las micobacterias en estos raspados y en improntas de ganglios linfáticos mesentéricos y también requiere de cierta experiencia para diferenciar el *Mycobacterium paratuberculosis* de las micobacterias saprofitas que se encuentran en las heces, puesto que pueden dar resultados falsos positivos y falsos negativos (Pijoan *et. al*, . 1986; Murray *et. al*, 1999).

**2.- cultivo:** como alternativa para un programa de control de la enfermedad de Johne, el único método de diagnóstico más confiable en este momento es el cultivo del microorganismo causal *Mycobacterium paratuberculosis*, de las heces de todos los animales cada 6 meses y separar a los animales positivos a cultivo (Murray *et. al*, 1999; Vander Giessen *et. al*, 1996).

El aislamiento de *Mycobacterium paratuberculosis* de heces de bovinos, cabras, ovejas infectados es tedioso y toma mucho tiempo, el cultivo toma por lo menos 3 meses para confirmarse por las características inusuales del cultivo in vitro, especialmente la dependencia de micobactina exógena, la dependencia de hierro y el índice de crecimiento muy lento, además se necesita que el animal sospechoso elimine un mínimo de 100 microorganismos por gramo de heces. En ocasiones el cultivo puede tomar arriba de 6 meses, para obtener cultivos positivos y existe el grave problema de contaminación por hongos y bacterias en los tubos sembrados. Otros autores señalan que arriba de 16 semanas para bovinos y cabras y generalmente en el cultivo de heces de oveja puede tomar un largo periodo de incubación (con frecuencia más de 1 año) para obtener un aislamiento positivo de *Map*. En los animales muertos o sacrificados, se recomienda obtener muestras de la porción terminal de válvula ileocecal, yeyuno y ganglios mesentéricos locales, estas muestras se emplearán para la obtención de improntas, cortes histológicos y cultivos bacterianos (Chang *et. al*, 1996; Vander Giessen *et. al*, 1996; Ambrosio *et. al*, 1991; Pijoan *et. al*, 1986).

En estudios de la tuberculosis humana se ha realizado una rápida detección de *Mycobacterium tuberculosis*, por medio del uso de sistemas de cultivo radiométrico en el que un sustrato (frecuentemente ácido palmítico), es metabolizado a dióxido de carbono en un medio líquido, así puede ser medida la sensibilidad del cultivo, sobre la fase de gas. Damato y Collins 1990 (citado por Whittington *et. al*, 1998) aplicaron el cultivo radiométrico a *Mycobacterium paratuberculosis*, y encontraron que es más rápido que otros procedimientos de cultivo, al ser detectado crecimiento en los primeros 9 días después de la inoculación del medio. Sin embargo se encontró que el tiempo requerido es largo para muestras de animales con un bajo grado de infección, porque contienen relativamente una pequeña cantidad de micobacterias comparada con el número de las muestras de animales severamente afectados. El cultivo radiométrico fue combinado exitosamente con análisis de PCR IS900 para obtener una confirmación relativamente rápida de la muestra para *Mycobacterium paratuberculosis*. Sin embargo la desventaja de este método es que requiere muestras de subcultivo de el cultivo radiométrico primario viable para un medio radiométrico sin yema de huevo para obtener una porción de la muestra para la prueba de PCR, aumentando significativamente los costos (Whittington *et. al*, 1998).

La genética molecular proporciona una nueva manera de identificar microorganismos por medio del uso de pruebas de DNA, las cuales son

extensamente utilizadas en medicina humana, permitiendo una rápida identificación, realizándose meticulosamente, ya que el lento crecimiento de la bacteria es similar a algunas micobacterias. El DNA de *Mycobacterium paratuberculosis* fue empleado para construir una serie de información genética en la *Escherichia coli*. El subsiguiente desarrollo de la clonación de un fragmento de DNA se ha investigado, así se identifica y diferencia *Mycobacterium paratuberculosis* de otros miembros estrechamente relacionados con *Mycobacterium avium* (Murray *et. al*, 1989).

Algunas pruebas de DNA para la detección de *M. Paratuberculosis* han sido ya descritas pero la sensibilidad y la especificidad de estas pruebas bajo condiciones de campo no están disponibles (Vander Giessen *et. al*, 1996).

La hibridación del DNA ha sido usada para el diagnóstico e identificación de bacterias, virus, o bien en muchas otras aplicaciones. Las técnicas de detección de bases de ácidos nucleicos son lo suficientemente sensitivas para diferenciar entre especies estrechamente relacionadas y también es rápida para ser aplicada en diagnósticos de rutina e identificación de agentes infecciosos (Ambrosio *et. al*, 1991).

El descubrimiento de una secuencia de inserción de DNA específica de *Map* junto con el desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación del DNA y pruebas moleculares han revolucionado esta área. La identificación rápida, sensitiva y precisa de el organismo y la diferenciación de otros aislamientos de subespecies de *M.avium*, ahora es posible.

La identificación del DNA de *M. paratuberculosis* puede ser aplicada al diagnóstico de heces y tejidos obtenidos en necropsia, y los reportes de hallazgos de secuencias específicas de células mononucleares sanguíneas de animales infectados también pueden conducir al desarrollo de una prueba de diagnóstico útil para casos incipientes (Clarke 1997).

El uso de la prueba de PCR para el diagnóstico parece que sigue siendo una opción viable para la detección de *Mycobacterium paratuberculosis*. Es posible detectar animales con alta eliminación de bacterias por las heces con PCR, sin más aumento de la sensibilidad lo que parece inadecuado para la detección de rutina en animales con eliminación media o baja (Yang *et. al* 1996).

## VIII. JUSTIFICACION.

Con la pretensión de contribuir al conocimiento de la seroprevalencia de la paratuberculosis en la comarca lagunera se plantea este estudio, para identificar el porcentaje de cabras infectadas que pudieran producir pérdidas económicas, afectando directamente la productividad de los animales. La comarca lagunera cuenta con una población aproximada de 600,000 cabras criollas, siendo una importante región productora de leche de cabra a nivel nacional.

El estudio de la prevalencia de esta enfermedad permitirá dirigir nuestros esfuerzos para elaborar programas de salud animal que reduzcan el riesgo de infección y diseminación de la enfermedad, además coadyuvar con el aumento de la producción láctea al contar con animales sanos.

Por último la paratuberculosis empieza a ser una preocupación en salud pública, recientemente se le ha asociado con la enfermedad de Crohn (descrita por primera vez en 1932 por Crohn) la cual se manifiesta con una enteritis granulomatosa, similar a la paratuberculosis de los rumiantes.

## **IX. OBJETIVO**

Llevar a cabo un estudio serológico mediante la prueba de ELISA (prueba inmunoabsorbente ligado a enzimas) para conocer la seroprevalencia de la infección por *Map* en una muestra representativa, tomada aleatoriamente de la población de cabras lecheras de la comarca lagunera, durante el periodo comprendido de Octubre a Diciembre de 1999.

## **X. MATERIALES Y MÉTODOS.**

El trabajo de campo se inició en el mes de Octubre de 1999, realizándose un muestreo serológico de cabras lecheras criollas, mayores de 1 año, con antecedentes de no vacunación y concluyó en el mes de Diciembre del mismo año. Comprendiendo los municipios de Francisco I. Madero, San Pedro, Matamoros, Viesca y Torreón de el estado de Coahuila y Gómez Palacio de el estado de Durango.

## 10.1 METODOLOGÍA.

El sangrado se obtuvo por punción en la vena yugular. Obteniendo aproximadamente 10 ml. colectados en tubos vacutainer al alto vacío sin anticoagulante. Se trasladaron en refrigeración al laboratorio del Centro de Análisis e Investigación Pecuaria de la Laguna (CAIPEL), se retiró el coágulo de los tubos y se congelaron los sueros a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta la realización de la prueba de ELISA, estudiándose 306 sueros.

El tamaño de la muestra (N) para el estudio se obtuvo utilizando la fórmula estadística:

$$N = \frac{Z^2 pq}{E^2}$$

Donde: **N** = tamaño de la muestra

**Z**<sup>2</sup> = límite de confianza

**p** = prevalencia positiva

**q** = prevalencia negativa

**E**<sup>2</sup> = error estándar

Se consideró un límite de confianza (Z) de 95% (1.96), una prevalencia positiva (p) de 15%, una prevalencia negativa (q) de 85% un error estándar de 4%, sustituyendo los valores, se obtuvo una N de 306 muestras.

Entre los métodos serológicos ELISA es la técnica más sensible y específica para la detección de anticuerpos contra *Mycobacterium paratuberculosis*. Generalmente se acepta que su sensibilidad es comparable a la de fijación del complemento en casos clínicos, pero superior en portadores sanos debido a su mayor detectabilidad. Esto permite detectar animales portadores de 6 a 9 meses antes de la excreción de gérmenes viables en cultivo. Debido a las posibles reacciones cruzadas por el contacto con otras mycobacterias provenientes de *M. phlei* se realiza antes de permitir la reacción de ELISA propiamente dicha (Instituto Pourquier 2001).

## 10.2 PRINCIPIOS DE LA PRUEBA.

- Los antígenos de *M. paratuberculosis* se adsorben a los pozos de la microplaca de poliestireno.
- Para eliminar las reacciones cruzadas, las muestras a evaluar se diluyen 1/20 e incuban en una dilución buffer que contiene *M. phlei*, (según Yokomizo *et. al* 1985) proporcionando alta sensibilidad y especificidad a la prueba.

- Después de incubar, las muestras se colocan en los pozos de la microplaca. Si en el suero hay anticuerpos contra *Mycobacterium paratuberculosis*, se formaran complejos *M. paratuberculosis*-anticuerpo adheridos en los pozos.
- Después de un lavado, una inmunoglobulina anticuerpo monoclonal bovina, ligada a una enzima se coloca en los pozos y se incuba. Este conjugado se fija a los complejos inmunes.
- Después de otro lavado se agrega el substrato de la enzima (TMB), que permitirá su transformación en un compuesto azul que se volverá amarillo después del bloqueo. La intensidad del color es una medida del índice de anticuerpos en la muestra.

### 10.3 MATERIAL REQUERIDO.

Se utilizó el siguiente material:

- a) 5 microplacas adsorbidas
- b) Solución de lavado, 20x, 100ml.
- c) Solución buffer liofilizada, 70ml.
- d) Suero referencia negativo liofilizado, 0.5ml.

- e) Suero referencia positivo liofilizado, 0.5 ml.
- f) Conjugado monoclonal anti IgG bovina 0.5ml.
- g) Solución de revelado lista para usar (TMB), 60ml.
- h) Solución detenedora (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.5M), 60ml.
- i.-) Espectrofotómetro de microplacas.
- j) Centrífuga, tubos y microtubos.
- k) Agitador Vortex o similar.
- l) Lavador de microplacas que distribuya 300 µl por pozo.
- m) Micropipetas uni y multicanal y puntas.
- n) Agua destilada (extrapura).
- o) Cubiertas para microplaca.

#### **10.4 PROCEDIMIENTO.**

##### **1.-Adsorción de las muestras de suero a evaluar al *M. phlei*.**

a.-)Preparación de las referencias: reconstituir los controles positivo y negativo con 0.5 ml. de agua destilada.

b.-)Preparación del "buffer" :

1)Diluir un vial de la solución de lavado concentrado 20x en 1900 ml. de agua destilada. La dilución puede realizarse antes de la desaparición de los cristales que se forman entre 2 y 8 grados centígrados.

2) Agregar 70 ml. de la solución de lavado en el vial de la solución buffer.

3) agitar al menos 30 minutos hasta disolver completamente. Esta dilución se prepara antes de usarse, una mala reconstitución causará problemas en la realización de la prueba y en su interpretación.

c.-) Tratamiento de las muestras. Los sueros (referencias y muestras) se diluyen 1/20 en la dilución buffer en microtubos o tubos de hemolisis, se agita suavemente e incuba una hora a temperatura ambiente ( $20 \pm 3$  grados centígrados).

2. -Deposición del suero: colocar (ver la figura 1)

- 200  $\mu$ l del suero de referencia negativa diluido en A1 y A2
- 200  $\mu$ l de suero de referencia positiva limite diluido en B1 y B2
- 200  $\mu$ l de cada muestra de suero diluida en :
  - 1 pozo adsorbido (columna non)
  - 1 pozo no adsorbido (columna par)

Agitar suavemente el contenido de la placa

Cubrir la placa e incubar por una hora a 37 grados centígrados ( $\pm 2$  °C).



#### **4.- Agregado del conjugado:**

- Diluir el conjugado 1/100 con la solución de lavado.
- Colocar en cada pozo 100 µl del conjugado diluido.
- Cubrir la placa e incubar por una hora a 37 grados centígrados (+ - 2 grados centígrados).

#### **5.- Lavado:**

- Seguir las instrucciones del paso tres con los siguientes cambios:

El lavado final debe durar por lo menos 1 minuto.

Eliminar el exceso de líquido golpeando la placa contra una toalla absorbente

#### **6.- Revelado:**

- Colocar 100 µl de la solución de revelado en cada pozo.
- Dejar la placa a temperatura ambiente por 10 minutos, alejada de la luz.
- Detener la reacción agregando 100 µl de la solución “ stop “ en cada pozo.
- Agitar suavemente hasta que el color esté homogéneo, secar y limpiar cuidadosamente el fondo de la placa.

## 7.- Lectura:

- Leer la densidad óptica a 450 nm (DO 450).
- El lector debe blanquearse con aire.
- Calcular la DO 450 para cada muestra: restar el valor de DO 450 obtenido de un pozo sin adsorber de la DO 450 de un pozo adsorbido.

### 10.5 CRITERIO DE VALIDACIÓN

Los resultados se consideran confiables si: el suero de referencia positiva tiene una DO 450 sin corregir mínima de 0.350.

El cociente entre la DO 450 corregida de la referencia positiva y la DO 450 corregida de la referencia negativa es mayor o igual a 3.5.

### 10.6 INTERPRETACIÓN.

Sueros cuya DO 450 corregida es mayor que el 90% de la DO 450 corregida del suero positivo se consideran provenientes de ganado no infectado con *Map*.

Sueros cuya DO 450 corregida está entre 90% y 110% de la DO 450 corregida del suero positivo se consideran sospechosos. Se requiere de una segunda prueba para confirmar el estatus del animal.

Sueros cuya DO 450 corregida es mayor que el 110% de la DO 450 corregida del suero positivo se consideran provenientes de ganado infectado

## XI. RESULTADOS

Los resultados representados en porcentaje que se obtuvieron mediante el análisis serológico de ELISA (prueba inmunoabsorbente ligada a enzimas) de 306 sueros, muestran que sólo 3 animales resultaron positivos (1%) y 303 negativos (99%) lo que pone de manifiesto que la seroprevalencia de paratuberculosis no se encuentra ampliamente diseminada y por lo tanto no supone una seria limitación a la productividad de las explotaciones que la padecen.

### Promedio de seroprevalencia en %

No. de animales (sueros)	No. de positivos	Promedio de seropositividad
306	3	1%

## XII. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos, el periodo de prevalencia de la paratuberculosis en cabras criollas lecheras de la Comarca Lagunera durante el periodo específico de Octubre a Diciembre de 1999 fue ínfimo, tomando un porcentaje de muestreo de 0.70% detectándose un promedio de seropositividad de sólo 1% (3 sueros positivos de un total de 306 animales) lo que parece confirmar que la enfermedad se encuentra distribuida en una proporción mínima esto es atribuible a que los animales se encuentran en su gran mayoría en sistema extensivo .

Blood y Radostits (1992) señalan que la incidencia es mayor en animales criados de forma intensiva, se encuentran sujetos a un alto riesgo de infección debido a la gran contaminación de las heces y la prolongada supervivencia de la bacteria en sitios protegidos.

### XIII. DISCUSIÓN.

La prevalencia de esta enfermedad en cabras criollas lecheras de la Comarca Lagunera aparentemente no ha sido descrita con anterioridad.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, parece confirmar que la enfermedad se encuentra distribuida en una proporción mínima de sólo el 1%. Los animales serológicamente probados a paratuberculosis son sólo una muestra representativa al azar del total de la población de ganado caprino criollo de la laguna. Sin embargo el estudio de la seroprevalencia de anticuerpos contra *Mycobacterium avium* subespecies *paratuberculosis* (*Map*) es incipiente en la comarca lagunera. Es necesario ampliar los periodos de muestreo, el número de hatos elevando así la cantidad de muestras a evaluar. Además sería conveniente incluir la seroprevalencia de *Map* para cada municipio en particular, en la medida de lo posible la edad exacta aunque esto se antoja más difícil por la falta de registros adecuados por parte de los productores.

Ramírez *et. al* (1983) señala que en México, hasta 1978 el agente causal fue aislado a partir de muestras de ganglios mesentéricos e intestino delgado de ganado bovino y en 1982 se logró el aislamiento a partir de heces e ileon de cabras lecheras.

Son escasas las descripciones que se han realizado acerca de su difusión en zonas o regiones concretas, Ramírez *et. al* (1983) confirmaron la presencia de paratuberculosis en 12 cabras de los estados de Querétaro y Guanajuato, mediante pruebas de inmunodifusión, resultando positivos cinco de los animales; aunado a esto realizaron raspados de mucosa intestinal que se

tiñeron siguiendo la técnica de Ziehl Neelsen observándose gran cantidad de bacilos ácido-resistentes semejantes al bacilo de Johne, al examen histológico ocurrió una enteritis crónica, la mucosa y submucosa estaban infiltradas con células leucocitarias, predominando linfocitos y células epitelioides, se observaron pequeños conjuntos de células mononucleares y células epitelioides repartidas dentro de las capas musculares.

En un estudio similar de una muestra representativa de la población de pequeños rumiantes en la región de Madrid ( España) Mainar-Jaime y Vázquez-Boland (1997) reportaron una prevalencia de anticuerpos contra *Map* de 11.7% de un total de 546 muestras de sueros colectadas de 60 rebaños de ovejas y cabras, 64 animales resultaron positivos, empleando la prueba de inmunodifusión en agar gel ( AGID) que es una técnica serológica altamente específica (casi 100%) Este valor es relativamente alto, respecto a los determinados en estudios previos, realizados en otras regiones de España, utilizando la misma prueba 3-5% en Aragón (Juste *et. al* 1991; Badiola *et. al* 1983) 4% en la provincia de Segovia (Tejedor 1993) y 2% en el país vasco (Adúriz, *et. al* 1994). En el presente trabajo se atribuye el bajo porcentaje de seropositividad, en primera instancia a el tamaño de los hatos, ( generalmente menores de 200 cabezas, que se encuentran en sistema de pastoreo) además no existen semovientes de importación ni un alto índice de reemplazos, que según Mainar-Jaime y Vázquez-Boland (1997) estos tres factores están relacionados significativamente con la seropositividad y un manejo más intensivo; ya que se acepta que *Map* posee una elevada resistencia en el

medio ambiente si se dan las condiciones adecuadas, pudiendo permanecer viable hasta 287 días en los purines según la temperatura y la composición de los mismos, (Jorgensen, 1977).

Adúriz *et. al* (2000) plantea que los datos más precisos provienen de estudios realizados en rastros utilizando el cultivo de tejidos. Así tras el análisis de muestras de ganglios mesentéricos, válvula ileocecal y heces de 200 animales sacrificados en el país vasco, se observó una prevalencia de 0.5% (datos sin publicar) Estos resultados son similares a los obtenidos por Merkal (1987) en EEUU utilizando el cultivo de la válvula ileocecal, si bien cuando se analizó un mayor número de muestras por animal la proporción de casos positivos aumentó ostensiblemente llegando al 18%. En Dinamarca Jorgensen (1972) observó un incremento en la prevalencia de 2.3% al 9.8% en los siete años que transcurren entre ambos muestreos en rastro.

Praxedis *et. al* (1983) en un estudio de determinación de la prevalencia de paratuberculosis en caprinos sacrificados en 4 rastros periféricos al Distrito Federal, con base en la prueba de Inmunodifusión en gel, arrojaron una prevalencia de hasta 8.44%.

El uso de técnicas serológicas fundamentalmente ELISA, confirma la difusión de la paratuberculosis (Braun *et. al* 1990; McNab *et. al* 1991)

En este trabajo se empleó la prueba de ELISA, que es internacionalmente aceptada en pruebas de muestras representativas para anticuerpos contra la enfermedad de Johne; proporciona resultados

confiables no sólo para la investigación en poblaciones, sino que también por su alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico individual (especialmente en animales con infección subclínica), por lo tanto es el tipo de prueba más conveniente para este tipo de investigaciones que todos los métodos de investigación serológica aplicados en la actualidad.

Es importante mencionar que a partir de una población aproximada de 600,000 cabezas de ganado caprino, se redujo el estudio a 7 rutas de entrega de leche a una empresa particular que cuenta con una participación de 340 hatos, 43,804 cabezas de ganado caprino y a partir de esta se disminuyo más a 306 sueros analizados.

Se advierte que el número de sueros analizados respecto al inventario de ganado caprino es reducido, sin embargo este trabajo se puede emplear como punto de referencia para medir la seroprevalencia de la enfermedad en investigaciones futuras.

#### XIV. LITERATURA CITADA

1. Adúriz J.J; Juste R.A; Sáenz de Ocáriz C; 1994. An epidemiological study of sheep paratuberculosis in the Basque Country of Spain: serology and productive data. Proceedings of the Fourth International Colloquium on paratuberculosis, July 17 – 21. Cambridge, Uk. pp 19 – 26.
2. Adúriz J.J; Juste R.A; Garrido M.J; Geijo V.M; 2000. Epidemiología y control de la paratuberculosis bovina. Tratado de veterinaria práctica, aula veterinaria bovis No. 93: 63 – 73.
3. Allen B.W; Baker F.J. 1976. Mycobacteria, aislamiento, identificación y pruebas de sensibilidad. Edit. El manual moderno. México D.F.
4. Alzuherry H.M; Little D; Clarke C.J; 1997. Altered intestinal macrophage phenotype in ovine paratuberculosis. J Vet. Immun. and Immunopat. 49: 331 - 345.
5. Ambrosio R.E; Harris Y; Huchzermeyer H. F .A. K. 1991. A DNA probe for the detection of Mycobacterium paratuberculosis. J Vet. Microb. 26: 87 - 93.
6. Badiola J.J; García de Jalón J.A; Cuervo L; 1983. Paratuberculosis ovina. An. Facultad Veterinaria Zaragoza 14 – 15.
7. Bercovier H. 1996. Molecular basis of pathogenicity in Mycobacterial infections. J Pat. 148: 149 - 157.
8. Blood D.C; Radosits O.M 1992 Medicina Veterinaria; Editorial Interamericana; México D.F.

9. Braun R.K ; Buergelt C.D; 1990. Use of an enzyme-linked immunosorbent assay to estimate prevalence of paratuberculosis in cattle of Florida. JAVMA, 196: 1251 – 1254.
10. Chang Y.F; Kim J.B; Shin S.J; Stehman S.M; Rossiter C.A; Chang C.F; McDonough P.L; Jacobson R.H; Lein D.H. 1996. Detection of *M. paratuberculosis* DNA in blood monocytes or milk macrophages from cattle and sheep affected by Johne's disease by PCR and oligonucleotide probe. J Vet. Res. 54: 1441 - 1445.
11. Chiodini R.J; Van Kruiningen H.J; Merkal R.S. 1984 Ruminant Paratuberculosis (Johne's Disease): The current status and future prospects. Cornell Veterinary; 74: 218-262.
12. Clarke C.J. 1997. Paratuberculosis and molecular biology. J Vet. 153: 245 – 247.
13. Crohn B.B; Ginzburg L; Oppenheimer G. 1932. Regional enteritis a pathologic and clinical entity JAMA, 99: 1323 – 1329.
14. De Voss J.J; Rutter K; Schroeder B.G; Barry C.E. 1999. Iron acquisition and metabolism by mycobacteria. J Bacter. 181: 4443 – 4451.
15. Gasteiner J; Wenzl H; Fuchs K; Jark U, and Baumgartner W. 1998. Serological cross-sectional study of Paratuberculosis in cattle in Austria. J Vet. Med. 46: 457 – 466.
16. Gezon H.M; Bither H.D; Gibbs H.C; Acker E.J; Hanson L.A; Thompson J.K; Jorgenson R.D. 1988. Identification and control of Paratuberculosis in a large goat herd. J Vet Res, 49: 1817 – 1823.

17. Jakobsen M.B; Alban L; Nielsen S.S. 1999. A cross-sectional study of Paratuberculosis in 1155 Danish dairy cows. *J Vet. Med.* 46: 15 – 27.
18. Jorgensen J. B. 1972. Studies on the occurrence of paratuberculosis in cattle in Denmark. *Nordisk Veterinaer Medizin*, 29: 297 – 308.
19. Jorgensen J.B; 1997. Survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in slurry *Nordisk Veterinaer Medizin*, 29: 267 – 270.
20. Juste R.A; García Marín J.F; Peris B; Saéz de Ocáriz and Badiola J.J; 1994. Experimental infection of vaccinated and non-vaccinated lambs with *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Comp. Path.* 110: 185 – 194.
21. Juste R.A; Badiola J.J; Arnal M.C; Balaguer L; García-Marín J.F; Saéz de Ocáriz C; Marco J.C. 1991. A survey of ovine paratuberculosis in Aragon Spain by different methods. *Paratuberculosis Newslett* 3: 3 – 4.
22. Kenneth L.B; Williams P.R; 1971 *Microbiología de las principales enfermedades infecciosas*. Edit. Publicaciones cultural. México, DF.
23. Koen P; 1999. Ovine Paratuberculosis survey in the western cape province South-Africa. *S. Afr. Vet. Ver.* 70: 50 – 57.
24. Mainar-Jaime R.C; Vázquez-Boland J.A; 1997. Factors associated with seroprevalence to *Mycobacterium paratuberculosis* in small-ruminants farms in the Madrid region (Spain). *J. Prev. Vet. Med.* 34: 317 – 327.
25. McNab W.B; Meek A. H; Duncan J.R; Martin S.W; Van Dreumel A. A. 1991. An epidemiological study of paratuberculosis in dairy cattle in Ontario: study design and prevalence estimates. *Can J Vet. Res*, 55: 246 – 251.

26. Matthias H; Peter V; Rohde M; Gerald F; 1998. Identification and characterization of a novel extracellular ferric reductase from *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Inf. Im.*, 66: 710 – 716.
27. 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.
28. Michel A; 1999. Ovine Paratuberculosis in South-Africa prevalence and serological diagnosis. *S. Afr. Vet. Ver.* 70: 50 – 57.
29. Murray A; Moriarty K.M; Scott D.B. 1989. A cloned DNA probe for the detection of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Science*, 196: 47 – 50.
30. Pérez V; García-Marín J.F; Bru R; Moreno B; Badiola J.J. 1995. Resultados obtenidos en la vacunación de ovinos frente a paratuberculosis. *Med. Vet*, 12: 196 – 201.
31. Pijoan A.P; Tortora P.J.L; Ramírez C.I.C. 1986. Enfermedades de los ovinos y los caprinos. Edit. UNAM, México D.F.
32. Praxedis J.M; Cervantes R.O; Ramirez C.P. 1983. Determinación de la prevalencia de Paratuberculosis en caprinos y ovinos sacrificados en cuatro rastros periféricos al Distrito Federal. Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias.
33. Ramírez C.I.C; González S.R; De Lucas T.J. 1983. Evaluación de tres métodos de diagnóstico para la detección de Paratuberculosis en cabras. Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias.
34. Ramírez C.P; Ramírez C.I.C; Valero G.E; Trigo E.T. 1983. Paratuberculosis en cabras en México. *Téc.Pec. México*, 45: 104 – 106.

35. Saxegaard F; Fodstad F. H. 1985. Control of paratuberculosis (Johne's disease) in goats by vaccination. *Vet. Rec.* 116: 439 – 441.
36. Secott T.E; Ohme A.M; Barton K.S; Wu C.C; Rommel F.A. 1999. *Mycobacterium paratuberculosis* detection in bovine feces is improved by coupling agar culture enrichment to an IS900 specific polymerase chain reaction assay. *J. Vet. Diag. Invest.* 11: 441 – 447.
37. Stehman S.M. 1996. Paratuberculosis in small ruminants, deer and south american camelids. *Veterinary Clinics of Northamerica: food animal practice* 12: 441 – 445.
38. Stanier Y. R; Adelberg E.A; 1977. *Microbiologia*. Edit. Madrid. España.
39. Tejedor F.J. 1993. Estudio epidemiológico de la paratuberculosis ovina en la provincia de Segovia. PhD Thesis. Universidad Complutense de Madrid Spain.
40. Vander-Giessen J.M.B; Haring R.M; Vauclave E; Eger A; Haagsma J; and Vander-Zeijst B.A.M. 1996. Evaluation of the abilities of three diagnostic tests based on the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in cattle: application in a control program. *J Clin. Micro.* 30: 1216 – 1219.
41. Waters W.R; Stabel J.R; Sacco R.E; Harp J.A; Pesch B.A; and Wannemuehler M.J. 1999. Antigen specific B-cell unresponsiveness induced by chronic *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* infection of cattle. *J Infect. and Inmun.*, 67: 1593 – 1598.

42. Whittington R.J; Marsh I; Turner M.J; McAllister S; Choy E; Eamens G.J; Marshall D.J. and Ottaway S. 1998. Rapid detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in clinical samples from ruminants and in spiked environmental samples by modified BACTEC 12B radiometric culture and direct confirmation by IS900 PCR. *J Clin. Microbiol.* 36: 701 – 707.
43. William G.W; Richard H.M. 1978. *Microbiologia general*. Edit. Continental.
44. Yokomizo, Y; Yugi, R.S; and Merkal, R.W. 1985. A method for avoiding false-positive reactions in an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the diagnosis of bovine Paratuberculosis. *Jpn. J.Vet. Sci.* 47: 111 - 119.