

COMPARACIÓN DE LAS PRUEBAS DIAGNOSTICAS, ZIEHL NIELSEN FRENTE
A ELISA, PARA LA DETECCIÓN DE *Mycobacterium avium* SUBESPECIE
paratuberculosis, EN VACAS DE 4 A 7 AÑOS, EN UN HATO LECHERO,
UBICADO EN EL CORREGIMIENTO DE CATAMBUCO, MUNICIPIO DE PASTO.

FRANZ ANDRES CAICEDO LAGOS
JAVIER RUIZ QUINTERO

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
PROGRAMA DE MEDICINA VETERINARIA
SAN JUAN DE PASTO
2005

COMPARACIÓN DE LAS PRUEBAS DIAGNOSTICAS, ZIEHL NIELSEN FRENTE
A ELISA, PARA LA DETECCIÓN DE *Mycobacterium avium* SUBESPECIE
paratuberculosis, EN VACAS DE 4 A 7 AÑOS, EN UN HATO LECHERO,
UBICADO EN EL CORREGIMIENTO DE CATAMBUCO, MUNICIPIO DE PASTO.

FRANZ ANDRES CAICEDO LAGOS
JAVIER RUIZ QUINTERO

Tesis de grado presentado como requisito para optar al título de
Medico Veterinario

Presidente
Katia Benavides Romo
Medico Veterinario

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
PROGRAMA DE MEDICINA VETERINARIA
SAN JUAN DE PASTO
2005

“ Las ideas y conclusiones aportadas en la tesis de grado, son responsabilidad exclusiva de sus autores.”

Artículo 1° del acuerdo N° 32 de octubre 11 de 1966, emanado del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación

HECTOR FABIO VALENCIA
Jurado Delegado

FERNANDO GARZÓN G.
Jurado

KATIA BENAVIDES ROMO
Presidente

San Juan de Pasto, Abril de 2005

DEDICATORIA

A DIOS, por enseñarme el camino y tenderme su mano para seguirlo, por ser la luz de cada día y por estar en cada momento de mi vida.

A la Virgen Santísima, por cuidarme e interceder por mí cuando lo necesito, por darme la mas bella de las bendiciones, Bendita Tu entre todas las mujeres.

A José Gregorio Hernández C. por ser lo más bello que Dios me ha regalado.

A Hugo Armando, mi padre, por el amor incondicional que siento todos los días de mi vida y por darme la fuerza y fortaleza en todo instante.

A Carmen y Hugo, por su inmenso corazón para apoyarme, por estar siempre cerca en todos los momentos de mi vida, por ser amigos, por ser padres.

A Nickel, Daniela, Lennyth, Hernán, Lucelly, Andrés, Jóse, Ángela, Julieth por ser mi gran apoyo en los momentos difíciles, por ser amigos, por ser hermanos.

A Katia, por su gran ayuda y por ser una excelente amiga.

A Javier, por las extensas jornadas de estudio e investigación.

FRANZ ANDRES CAICEDO LAGOS

DEDICATORIA

Dedico este trabajo:

Al que afirmo la tierra, decidió cuanto habría de medir.

Al que puso sus cimientos, al que puso la piedra principal de apoyo, mientras cantaban a coro las estrellas de la aurora, entre la alegría de sus servidores celestiales.

Al que puso compuertas para contener el mar cuando broto del seno de la tierra.

Al que le dio una nube por vestido y la niebla por pañales.

Al que ordena que salga la aurora y amanezca el día.

Al que la luz le obedece para que se difunda por la tierra.

Al que hace aparecer los relieves de la tierra y se tiñen de color como un vestido.

A ti Dios celestial que me acompañas noche y día, gracias.

(Basado en Job 38, 4 – 14)

A la mujer que Dios le dijo: “Alégrate, llena de gracia; el Señor esta contigo.”

“Bendita tú entre todas las mujeres y bendito el fruto de tu vientre.” Gracias Virgen Maria.

(Lc 1, 28), (Lc 1, 42)

Al verdadero Dios y verdadero hombre, que murió por nuestros pecados y resucitó para que creamos, “Jesús dijo: Has creído porque has visto. Dichosos los que creen sin haber visto.”

(Jn 20, 29)

A Oswado y a Idali que un día decidieron recibir la bendición de Dios para formar este hogar tan bello, lleno de amor, cariño y comprensión. Gracias doy a Dios por haberme otorgado la dicha de tener unos padres tan especiales y tan amorosos.

A mis hermanos Jimmy, Ernesto y Daniel, con los que compartimos las risas, los juegos, la lluvia, el sol y el pan de cada día. Con ellos vuelvo a ser niño y me sorprendo de lo generoso que ha sido Dios con mi familia.

JAVIER RUIZ QUINTERO

AGRADECIMIENTOS

Katia Benavides Romo
Médico Veterinario – Universidad de Nariño

Héctor Fabio Valencia Ríos
Médico Veterinario – Universidad de Caldas
Decano Facultad de Ciencias Pecuarias

Fernando Garzón Gómez
Médico Veterinario
Director del Programa de Medicina Veterinaria Universidad de Nariño

Álvaro Hidalgo
Médico Veterinario

Ingrit Koch Santacruz
Médico Veterinaria – Universidad de la Salle

Ivo Pavlik
Veterinario del Instituto de Investigación – República Checa

Juan Manuel Astaiza
Médico Veterinario – Universidad de Caldas.

Ernesto Ruiz Quintero
Ingeniero de Sistemas – Universidad de Nariño

Carlos Pulido
Ingeniero de Sistemas – Universidad de Nariño

Mauricio Guerrero Osejo
Médico Veterinario – Universidad de Nariño

Natalia Ordóñez Giraldo
Médico Veterinario – Universidad de Nariño

Maria Cristina Aristizabal.
Bacterióloga – Hospital Civil

Luis Alfonso Solarte
Secretario de la Facultad de Ciencias Pecuarias.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	25
1. DEFINICIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA	27
2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	30
3. OBJETIVOS	31
3.1. OBJETIVO GENERAL	31
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4. MARCO TEÓRICO	32
4.1. DEFINICIÓN	32
4.2. FACTORES EPIDEMIOLÓGICOS	33
4.3. EPIDEMIOLOGÍA	37
4.4. DISTRIBUCIÓN	41
4.5. ETIOLOGÍA	44
4.5.1. Morfología	46
4.5.2. Clasificación	49
4.6. PATOGENIA	52
4.6.1. Transmisión	52
4.6.2. Infección	54
4.6.3. Multiplicación	57
4.6.4. Estados Iniciales de Infección	60

4.6.5.	Estado medio-tardío de Infección	65
4.6.6.	Estado terminal de la Infección	66
4.7.	MANIFESTACIONES CLÍNICAS	67
4.8.	PATOLOGÍA CLÍNICA	70
4.9.	DIAGNOSTICO	75
4.9.1.	Pruebas de detección del organismo o antígeno	76
4.9.2.	Pruebas de diagnostico anticuerpo	79
4.9.3.	Histopatología	86
4.10.	TRATAMIENTO	87
4.11.	MANEJO Y CONTROL	88
4.11.1.	Vacunación	92
4.12.	PARATUBERCULOSIS Y ENFERMEDAD DE CROHN	93
5.	DISEÑO METODOLÓGICO	96
5.1.	POBLACIÓN Y MUESTRA	97
5.2.	DISEÑO ESTADÍSTICO	97
5.3.	VARIABLE A EVALUAR	98
5.4.	TÉCNICAS PARA LA RECOLECCION Y ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN	99
5.4.1.	Toma de muestra	99
5.4.2.	Procedimiento de campo	99
5.4.3.	Procedimiento de laboratorio	99
6.	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	102
6.1.	PREVALENCIA DE <i>Mycobacterium avium</i> subespecie <i>paratuberculosis</i> , MEDIANTE TINCIÓN DE ZIEHL NEELSEN EN RASPADO DE MUCOSA	

RECTAL, EN VACAS DE 4 A 7 AÑOS, EN LA FINCA UBICADA EN CATAMBUCO, PASTO, NARIÑO, COLOMBIA.	102
6.1.1. Total de población evaluada	102
6.2. PREVALENCIA DE <i>Mycobacterium avium</i> subespecie paratuberculosis, MEDIANTE LA PRUEBA SEROLÓGICA ELISA, EN VACAS DE 4 A 7 AÑOS, EN LA FINCA UBICADA EN CATAMBUCO, PASTO, NARIÑO, COLOMBIA.	103
6.2.1. Total de población evaluada	103
6.3. CARACTERÍSTICAS AL EXAMEN CLÍNICO	103
7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	106
7.1. CONCLUSIONES	106
7.2. RECOMENDACIONES	107
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Estimaciones de prevalencia de hatos lecheros en otros países ganaderos	41
Tabla 2. Estudios de prevalencia.	42
Tabla 3. Examen Clínico.	104

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Cuando el ganado bovino presenta mas comúnmente la enfermedad de JOHNE	35
Figura 2. Hatos lecheros con uno o más vacas ELISA positivos.	40
Figura 3. Formula química de la micobactina	45
Figura 4. <i>Micobacterium paratuberculosis</i>	47
Figura 5. <i>Mycobacterium avium</i> subespecie <i>paratuberculosis</i>	47
Figura 6. Colonias de <i>M. paratuberculosis</i> en medio de cultivo sin Tween	48
Figura 7. Medio de cultivo agar con Tween	49
Figura 8. Árbol filogenético parcial de la relación de micobacteria patogénica basado en la secuencia del DNAr.	51
Figura 9. Placas de Peyer	55
Figura 10. El <i>M. paratuberculosis</i> dentro de los macrófagos	58
Figura 11. La marcación inmunogold del <i>M. paratuberculosis</i> intracelular y extracelular.	59
Figura 12. Infiltrado de macrófagos	64
Figura 13. Fotomicrografía de una sección de intestino de una vaca con enfermedad de Johne	65
Figura 14. Ileon engrosado por infiltración con macrófagos y linfocitos	65
Figura 15. Presentación hipotética del <i>M. paratuberculosis</i> y los anticuerpos	66
Figura 16. Vaca con cuadro clínico de paratuberculosis	68
Figura 17. Vaca con cuadro clínico de paratuberculosis	68

Figura 18. Condición llamada Mandíbula de botella	69
Figura 19. Mucosa del ileon con paratuberculosis	71
Figura 20. Intestino delgado de una vaca con paratuberculosis	71
Figura 21. Linfagitis en el ileon del bovino	72
Figura 22. Cordones engrosados	72
Figura 23. Nódulos linfáticos	73
Figura 24. Ganglios linfáticos de bovinos con paratuberculosis	73
Figura 25. Calcificación de las placas en la pared de la aorta	75
Figura 26. Prueba serológica AGID para la enfermedad de Johne	80
Figura 27. Porcentaje de 142 vacas con enfermedad de Johne	83
Figura 28. Diagrama de la prueba de ELISA	84
Figura 29. Tinción ácido resistente en el ileon	86
Figura 30. Sitio de inyección de la vacuna	92
Figura 31. Corregimiento de Catambuco	96

GLOSARIO

APOPTOSIS: proceso que incluye necrosis coagulativa y retracción.

AUTOTROFA: organismo capaz de sintetizar los nutrientes necesarios a partir de agua, dióxido de carbono, sales inorgánicas y una fuente de energía.

AZUL DE METILENO: compuesto orgánico sintético, en forma de cristales verde oscuro o de polvos cristalinos brillantes, usado en el tratamiento de la metahemoglobinemia, como antídoto en el envenenamiento de cianidas, como colorante en patología y bacteriología y como antiséptico.

BACTEREMIA: presencia temporal de bacterias en sangre.

CALCIFICACIÓN: depósitos de sales cálcicas en un tejido.

CAQUEXIA: estado profundo y marcado de un trastorno constitucional; enfermedad general de la salud y malnutrición.

CÉLULAS GIGANTES: fusión de los macrófagos, formando grandes células multinucleadas, en un aparente esfuerzo para matar la micobacteria.

CÉLULAS MEMBRANOSAS: células altamente especializadas que hacen parte del epitelio folículo asociado componente del tejido linfoide intestino asociado. Tienen microvellocidades o micropliegues en su superficie apical, y se adhieren a las células adyacentes por las uniones firmes y desmosomas.

CITOQUININAS: variedad de señales químicas liberadas por los linfocitos en un esfuerzo por aumentar el poder de muerte bacteriana de los macrófagos y reclutar más células para luchar contra la infección.

CLOFAZIMINA: medicamento antiinfeccioso. Elimina ciertos tipos de bacterias que causan la lepra (enfermedad de Hansen). También reduce la inflamación causada por la enfermedad. Aún no hay cápsulas genéricas disponibles.

CÉLULAS DENDRÍTICAS: cualquiera de las extensiones filiformes del citoplasma de una neurona; las dendritas, las cuales se ramifican típicamente en proyecciones arboriformes, componen la mayor parte de la superficie receptora de una neurona.

CROHN: enfermedad inflamatoria del intestino delgado del humano, con algunos síntomas clínicos como pérdida de peso, dolor abdominal, diarrea o constipación, vómito y malestar general.

DESMOSOMAS: “puntos de unión” que constituyen una de las unidades estructurales que unen las células epiteliales. Se denomina hemidesmosomas a la mitad de las unidades.

DISEMINAR: en el contexto de la biología de paratuberculosis, diseminar con frecuencia hace referencia a la excreción de *M. Paratuberculosis* en heces, leche ó semen. Los animales en los estados más avanzados de la infección llega a diseminar el microorganismo por las heces.

EDEMA: acumulación anormal de líquido en las cavidades y espacios intercelulares del cuerpo.

ELECTROFORESIS: movimiento de partículas cargadas, suspendidas en un líquido, en varios medios (p. Ej. , papel, gel, líquido) bajo la influencia de la aplicación de un campo eléctrico.

ELISA: (del inglés: enzyme-linked immunosorbent assay) ensayo inmunoabsorbente de unión de enzima. Tipo de prueba de uniones primarias usado para detectar y medir tanto el antígeno como en anticuerpo. Cualquiera de los dos están unidos a un sustrato sólido (superficie de poliestireno) y se añade un segundo anticuerpo al que está unido la enzima, seguido de un sustrato para el enzima.

ENTERITIS: inflamación de la mucosa intestinal dando lugar a signos clínicos de diarrea, a veces disentería, dolor abdominal, deshidratación y pérdida y desequilibrio. En casos más graves hay mucho moco en las heces, y en los peores hay tiras e incluso láminas de mucosa exfoliada. La gastritis comúnmente es una lesión acompañante. Las causas son muchas, e incluyen: bacterias, virus, productos químicos, comidas dañinas, y parásitos nematodos protozoos.

ENTEROPATÍA: cualquier enfermedad del intestino. Incluye enteritis mas aquellas enfermedades en las que no hay lesión física de enteritis, pero hay una intensa diarrea.

ESFEROPLASTOS: Célula microbiana o vegetal de la que se ha eliminado la mayor parte de la pared celular, generalmente por un tratamiento enzimático. De manera estricta, en un esferoplasto persiste una parte de la pared celular, mientras que en un protoplasto la pared se ha eliminado por completo. En la práctica, ambos términos se suelen utilizar indistintamente.

ESPECIFICIDAD: capacidad que posee una prueba determinada para dar una reacción positiva solamente en aquellos animales que tienen la enfermedad para la cual se recomienda dicha prueba.

ESTREPTOMICINA: es uno de los antibióticos aminoglicósidos más antiguos. debido a su uso muy extendido, muchas bacterias gramnegativas, previamente susceptibles, han desarrollado resistencia y han perdido mucha de su efectividad y popularidad.

EXOQUELINAS: uno de los dos tipos de quelantes de hierro de alta afinidad que la micobacteria sintetiza.

FACTOR NECRÓTICO TUMORAL ALFA (TNF α): citoquinina.

FAGOCITOS: cualquier célula que ingiere microorganismos u otras células; también si ingiere partículas extrañas.

FAGOCITOSIS: englobamiento de microorganismos, otras células u otras partículas extrañas por los fagocitos.

FAGOSOMA MICROBACTERIAL: vesícula rodeada de una membrana en un fagocito que contiene el material fagocitado en una micobacteria.

FENOTÍPICO: apariencia externa de un animal en todas sus características tanto anatómicas como fisiológicas y de comportamiento; es la mezcla de las características genéticas y las influencias ambientales; en contradicción al genotipo, en que solo se tiene en cuenta los factores hereditarios.

FIBRONECTINA: glucoproteína adhesiva; una forma circular en el plasma actuando como una opsonina, otra es una proteína de la superficie celular y que interviene en interacciones de adherencia celular

FUCSINA FENICADA: uno de varios colorantes de rojo a púrpura.

GENÓMICO: (genoma), serie completa de factores hereditarios contenidos en una serie haploide de cromosomas; inventario genético.

GLOBIAS: aglomerados de bacilos.

GNOTOBIÓTICOS: que ha nacido libre de gérmenes y ha sido infectado con microorganismos conocidos.

GRANULOMAS: masa de aspecto tumoral o nódulo de tejido granular con fibroblastos de crecimiento activo y formación de capilares. Está compuesto por un conjunto de macrófagos modificados semejantes a células epiteliales rodeado por

células mononucleares sobre todo linfocitos. A veces presenta células gigantes multi-nucleadas en el centro. La causa es un proceso inflamatorio crónico asociado a una enfermedad infecciosa o a una invasión por un cuerpo extraño.

HIBRIDACIÓN: se puede usar un fragmento de ADN con un radioisótopo marcado como una prueba para detectar secuencias de ácido nucleico relacionadas con células y tejidos. El método requiere que tanto la prueba como la secuencia de ácido nucleico celular sean formas de cadena única y entonces permitirán formar tanto formas de doble cadena ADN:ADN como ADN:ARN.

HIPERPLASIA: aumento anormal del volumen de un tejido u órgano causado por la formación y crecimiento de nuevas células normales.

HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA: reacción de tipo IV. Incremento lento de la respuesta inmunitaria de mediación celular (incluyendo linfocitos T) a un antígeno específico, como ocurre en el rechazo de un injerto, algunas enfermedades autoinmunitarias, etc.

IgG CALOSTRALES: el calostro contiene un alto nivel de IgG durante varios días después del parto. Después de la ingestión, las moléculas de IgG del calostro se absorben y se intercambian inalteradas a través de la mucosa intestinal durante los primeros uno o dos días en ganado, perros, cerdos y caballos. Y hasta cuatro días en las ovejas y cabras.

INOCULACIÓN: introducción de microorganismo patógeno, material infectado, suero u otras sustancias en tejidos de organismos vivos o en medio de cultivo; introducción de un producto de enfermedad en un animal sano, para producir una forma suave de la enfermedad, seguida por inmunidad.

INTEGRINAS: son receptores que median la adhesión celular y regulan la formación de complejos de señalización. Contienen los sitios de unión para la fibronectina.

INTERFERON GAMMA (IFN- γ): un químico liberado por varias células, en particular células blancas sanguíneas para aumentar la respuesta celular inmune a un agente infeccioso.

INTERLEUQUINA: citoquinas que actúan entre células leucocitarias.

ISONIAZIDA: compuesto antibacteriano utilizado en el tratamiento de la tuberculosis

JOHNINA: extracto de cultivo de *Mycobacterium paratuberculosis* utilizado en una prueba cutánea de hipersensibilidad tardía para la enfermedad de Johne. La

prueba es positiva cuando en el lugar de la inyección se produce un engrosamiento y edema a las 48 horas de esta.

LEVAMISOL: antihelmíntico de amplio espectro de probada eficacia contra lombrices gastrointestinales y pulmonares, que se puede administrar oralmente, por inyección o en el propio alimento del ganado. No tiene ningún efecto sobre la tenia y sobre dueloas hepáticas.

LINFADENITIS: inflamación de los ganglios linfáticos; aparece con frecuencia como síntoma incidental de enfermedades en animales; en ciertos casos es síntoma principal, como en el estrangol de los caballos, el absceso cervical de los cerdos, la tuberculosis bovina, la linfadenitis gaseosa de ovejas y carneros y el linfosarcoma de perro y gato.

LINFANGITIS: inflamación de los vasos linfáticos.

LINFOCITOS T: Leucocito mononuclear, no granulado que posee un núcleo, que se tiñe intensamente, con una cromatina muy densa; su citoplasma es muy claro y toma un color azulado cuando se tiñe. Linfocitos producidos por células madre de la médula ósea que emigran durante la embriogénesis tardía al timo. Allí se producen un gran número de células, la mayor parte de las células se destruyen.
Macrófagos: cualquiera de las células fagocíticas, grandes y mononucleares derivadas de las células de la médula ósea.

MICOBACTINA: sustancia producida por algunas micobacterias que es capaz de estimular el crecimiento de otras micobacterias.

MICROVELLOCIDADES: proceso sobresaliente minúsculo que se origina en la superficie libre de la célula, especialmente en las de las circunvoluciones proximal del túbulo renal y en el epitelio intestinal.

MONOCITOS: estas células fagocitan la partículas microscópicas de mayor tamaño, animadas o inanimadas, además de las bacterias responsables de su presencia.

NRAMP1: proteína de la membrana integral expresada exclusivamente en el compartimiento lisosomal de los monocitos y macrófagos.

PASTEURIZACIÓN: método que consiste en calentar la leche u otros líquidos a una temperatura de 60° C durante 30 minutos, destruyendo las bacterias patógenas y retrasando considerablemente el desarrollo.

PATOGNOMÓNICO: característico o que distingue específicamente a una enfermedad o estado patológico; es un signo clínico u otra indicación sobre la que se puede hacer el diagnóstico.

PIRACINAMIDA: agente antibacteriano usado por vía oral para el tratamiento de la tuberculosis humana.

PLACAS DE PEYER: placas elevadas y ovales de folículos linfáticos agrupados en la mucosa y submucosa del intestino delgado. Llamadas también nódulos linfáticos agregados.

PREVALENCIA: el número total de casos de una enfermedad específica existentes en una población dada en un momento determinado.

PROTEÍNAS SÉRICAS TOTALES: todas las proteínas existentes en el plasma sanguíneo, incluyendo las inmunoglobulinas.

RESPUESTA HUMORAL: mediada por anticuerpos formados por linfocitos B antígeno-específico. Cada linfocito B tiene receptores IgM monoméricos que capturan el antígeno específico, iniciando la producción de las inmunoglobulinas específicas.

RIFABUTINA O ETAMBUTOL: agente tuberculostático.

RIFAMPICINA: derivado de la rifamicina. Agente antibacteriano y antifúngico que se usa en el tratamiento de infecciones micobacterianas, actinomicosis e histoplasmosis.

SAPRÓFITO: cualquier organismo, tal como bacteria, que vive sobre materia orgánica o en descomposición.

SENSIBILIDAD: En pruebas diagnósticas, cantidad mínima de molécula diana que puede detectar el análisis.

SEROPOSITIVO: que manifiesta resultados positivos frecuente a un examen serológico, es decir, aquel animal con anticuerpos séricos detectables frente a un microorganismo particular.

SIDERÓFORO: macrófago que contiene hemosiderina. Sustancias químicas sintetizadas por organismos vivos para el propósito de ligar y/o transportar hierro dentro de las células.

SONICACIÓN: Disgregación de células o de moléculas de ADN por ondas ultrasónicas.

SUBCLÍNICO: sin manifestaciones clínicas, dícese de las etapas iniciales o de una enfermedad leve de una enfermedad.

SURFACTANTE: agente activo en superficie, como un jabón o detergente sintético. En fisiología pulmonar mezcla de fosfolípidos (principalmente dipalmitoilfosfatidilcolina) secretados por las células tipo II o células grandes alveolares de los alvéolos y vías áreas respiratorias, que reduce la tensión superficial de los líquidos pulmonares.

TEJIDOS LINFOEPITELIALES: matriz de tejido reticular, cuyos interespacios contienen linfocitos.

TRANSFERRINA: globulina sérica que une y transporta hierro.

TRANSLOCACIÓN: incorporación de un fragmento de un cromosoma en un cromosoma no homólogo.

TUBERCULINA (PPD: purified protein derivate): producto soluble estéril, parcialmente purificado, del crecimiento del bacilo tuberculoso en un medio líquido especial libre de proteínas.

ULTRAPASTEURIZACIÓN: Consiste en someter a la leche a temperaturas muy elevadas (más de 100 grados) durante muy poco tiempo (menos de 10 segundos), afectando a los gérmenes pero dejando prácticamente intactas las propiedades nutricionales.

VÍA TRANSPLACENTARIA: a través de la placenta.

ZIEHL NEELSEN: Fucsina fenicada contrastada con azul de metileno, que es usada para teñir microorganismos ácido-resistente, especialmente *Mycobacterium* sp. en frotis y tejidos.

ZOONOSIS: enfermedad de los animales transmisible al hombre.

RESUMEN

La paratuberculosis ó enfermedad de Johne, es una enteritis crónica causada por el *Mycobacterium paratuberculosis* o bacilo de Johne. El principal signo de esta enfermedad crónica es una diarrea progresiva la cual llega a ser permanente y abundante, acompañada por pérdida de peso y debilidad llegando hasta la muerte. Esta enfermedad puede afectar todos los rumiantes(ganado bovino, ovejas, cabras). Está incluida en programas de estudios de epidemiología la cual llega a ser mas importante. El diagnóstico de la paratuberculosis es complicado por su largo periodo de incubación que oscila entre 6 meses y 15 años.

El objetivo de este estudio fue comparar dos pruebas diagnósticas Ziehl Neelsen (raspado de mucosa rectal) y ELISA (detección de anticuerpo séricos), para detectar al microorganismo. La finca ubicada en Catambuco, en Pasto, Nariño. Donde se examinaron 30 vacas entre 4 a 7 años. Los resultados demostraron: con la tinción Ziehl Neelsen (raspado de mucosa rectal), se obtuvo una prevalencia de 9.42% y 10.58%, con un margen de error del 5%. Para la prueba de ELISA se obtuvo una prevalencia de 12.58% y 14.05% con un margen de error del 5%. Por lo anterior se concluye, que al hacer diferenciación entre prevalencias de las dos pruebas: Ziehl Neelsen y ELISA para detectar enfermedad de Johne, 3 ó 4 animales dentro de una población de 100 vacas muestreadas, no serían detectadas por la prueba de Ziehl Neelsen, pero si por la prueba ELISA. Hemos comparado los dos métodos y concluimos: que para detectar *Micobacterium avium* supsp. *paratuberculosis* con la tinción de Ziehl Neelsen y ELISA, 3 ó 4 vacas de 100 examinas, no podrían ser detectadas por la tinción de Ziehl Neelsen, mientras que el método de ELISA podría detectarlas.

ABSTRACT

Paratuberculosis, or Johne's disease, is a chronic enteritis caused by *Mycobacterium paratuberculosis* or Johne's bacillus. The main clinical sign of this chronic disease is a progressive diarrhoea which becomes permanent and abundant, accompanied by weight loss and weakness leading to death. This disease can affect all ruminants (cattle, sheep, goats). It is now included in programs of epidemiological survey which are becoming more important. Diagnostic of paratuberculosis are complicated by a long incubation period for the infection lasting from 6 months to 15 years.

The objective of this study was to compare two proofs Ziehl-Neelsen staining (rectal mucous membrane smearing) with ELISA (serum antibody detection), to detect this microbe. Farm is located in Catambuco, in Pasto, Nariño. 30 cows among 4 to 7 years were examined. The results demonstrated: with the Ziehl-Neelsen staining (rectal mucous membrane smearing), prevalence range from 9.42% y 10.58% (5% of margin of error) was obtained, while For the ELISA test, prevalence range from 12.58% y 14.05% (5% of margin of error) was obtained. We have compared two methods and we have concluded: to detect *Micobacterium avium* supsp. *Paratuberculosis* by Ziehl-Neelsen staining and ELISA, 3 or 4 cows of 100 examined cows, these could not be detected by Ziehl-Neelsen staining, while the ELISA method could detect it.

INTRODUCCIÓN

Nariño es una zona de gran desarrollo agropecuario, dentro de este ámbito la ganadería lechera cumple un papel sobresaliente, constituyéndose en la mayoría de los casos objeto de muchos estudios, dentro de ellos un aspecto que influye en la producción son las patologías del tracto gastrointestinal.

El presente trabajo tiene como fin comparar las dos pruebas diagnosticas, Ziehl Neelsen frente a ELISA, para detectar la presencia del microorganismo *Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis* en una finca ubicada en Catambuco, Nariño, ya que se han presentado casos positivos reportados en este lugar, tanto en el Instituto Colombiano Agropecuario ICA como en el laboratorio de la clínica veterinaria Carlos Martínez de la Universidad de Nariño.

Es de gran importancia resaltar que este tipo de patologías producen cuadros gastrointestinales crónicos, reportándose en diarreas prolongadas, con pérdida de peso, caquexia y disminución notoria en la producción. La enfermedad clínica aparece desde los 2 años en adelante.

Sigurðardóttir en su investigación titulada “Uptake of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* through the Distal Small Intestinal Mucosa in Goats: An Ultrastructural Study” asegura, la infección ocurre a una edad temprana y, después de un periodo de la incubación largo, lleva a una enteritis granulomatosa y linfadenitis. La Infección se establece partiendo de la ingestión de las bacterias, su penetración a la mucosa intestinal, y la fagocitosis subsiguiente por los macrófagos residentes. Las bacterias se multiplican dentro de los macrófagos y con el tiempo causan severa inflamación granulomatosa en el intestino y en los nódulos linfáticos. Normalmente se localizan lesiones intestinales tempranas en la submucosa, entre o involucrando la corteza de los nódulos linfoides de las placas de Peyer. Esta asociación con el tejido linfoide de las placas de Peyer sugiere que el epitelio foliculo asociado (FAE) esté comprometido en la captación del bacteria.

Collins en su portal web “Johne’s Information Center” apunta, compensando el hecho de que pueden crecer aparentemente sólo en los animales, el microorganismo ha desarrollado la capacidad de persistir en el ambiente para los largos periodos de tiempo que espera por la oportunidad para infectar un animal de nuevo.

Hay que tener en cuenta que por ser una enfermedad que no tiene notificación obligatoria, los propietarios y encargados del ganado desconocen su incidencia y propagación, por consecuencia no se le da la relevancia que debe tener. Siendo un riesgo latente la propagación entre granjas, usualmente a través del transporte de animales clínica y subclínicamente enfermos, resultando en una propagación de la enfermedad, por la falta de conocimiento y los riesgos que constituyen tener animales positivos en el hato. El presente trabajo es uno de los primeros estudios realizados en Colombia sobre esta enfermedad.

La prueba de Ziehl Neelsen realizada con raspado de mucosa rectal, presenta una baja sensibilidad, siendo la técnica más usada para diagnosticar en nuestro medio, mientras que la prueba de ELISA es de alta confiabilidad y no se usa por cuestiones de costo y accesibilidad.

Se debe considerar que este agente se ha encontrado en la etiología de la enfermedad de Crohn, la cual es una afección crónica inflamatoria del tracto gastrointestinal en humanos, aunque todavía no se ha podido demostrar con certeza que sea el agente causal, sigue siendo un riesgo para el hombre, y en algún momento se puede comprobarlo como agente causal.

1. DEFINICIÓN Y DELIMITACION DEL PROBLEMA

Actualmente, tanto en el municipio de Pasto como en el departamento de Nariño, no existe ningún estudio referente a la presencia de paratuberculosis mediante las pruebas de Ziehl Neelsen y ELISA.

En la finca, donde se desarrolló esta investigación, se han presentado en los últimos tres años, casos positivos a la prueba de Ziehl Neelsen en raspado de mucosa rectal, las muestras fueron llevadas tanto en el Instituto Colombiano Agropecuario como en el laboratorio de la Clínica Veterinaria Carlos Martínez de la Universidad de Nariño, donde todas las muestras fueron tomadas de animales con diarrea, presuntamente en estado crónico.

Según los datos proporcionados por el laboratorio del Instituto Colombiano Agropecuario a cargo de la doctora Rosario Rosero y después el doctor Juan Bernardo Serrano entre los años 1992 a 2002 , se registraron 108 casos positivos a la prueba ácido alcohol resistente, y en el laboratorio de la Clínica Carlos Martínez Hoyos de la Universidad de Nariño a cargo de la doctora Katia Benavides Romo, entre los años 2001 a 2002, presentó 25 casos positivos a la prueba de Ziehl Nielsen, estas muestras fueron a nivel del departamento de Nariño. Un estudio realizado en el año 2001, por los doctores Nicolás V. Ramírez, Gerardo B. Gaviria, Luis Fernando Restrepo y Catalina Gómez, en su trabajo titulado “Diagnóstico epidemiológico referente a varias patologías de bovinos en tres haciendas de la Universidad de Antioquia, quienes buscaron a nivel nacional algún dato sobre en la enfermedad de Johne, y reportaron ninguna investigación.

A pesar de todo, el artículo presentado en la Asociación Internacional de Paratuberculosis por los autores Ferreira et al. titulado “Detección de Anticuerpos para *Mycobacterium paratuberculosis* en hatos de Brazil”, quienes realizaron en 1004 bovinos de 45 propiedades en el estado de Río de Janeiro, realizando la investigación con la prueba de ELISA. Encontraron un resultado del 18% de animales positivos, y el 82% de los hatos tuvieron al menos un animal positivo. El rango de porcentaje es del 4.7% al 46.5%/hato. La misma asociación presenta un estudio de diagnóstico e investigación en Argentina entre 1992 y 2002 por los autores Paolicchi et al. con el programa ROC – MedCalc, quienes utilizaron la técnica serológica ELISA, realizado con un total de 68.335 sueros que fueron procesados, además un total de 9.123 muestras (heces, órganos y leche) reportadas en ganado de 4 y más años, en la capital y provincias. Las

investigaciones fueron realizadas para obtener la seroprevalencia real donde se encontró en Buenos Aires un resultado del 26,5%.

Es importante considerar que la Organización Internacional de Epizootias entre sus normas sanitarias internacionales se encuentra el Código Sanitario para los Animales Terrestres, con el objetivo de velar por la seguridad sanitaria del comercio internacional de animales terrestres y productos de origen animal. En el capítulo 1.1.2. donde se encuentran la lista de las enfermedades de la OIE, hallándose la paratuberculosis en la lista B, la cual designa las enfermedades transmisibles que se consideran importantes desde el punto de vista socioeconómico y/o sanitario en el ámbito nacional y cuyas repercusiones en el comercio internacional de animales y productos de origen animal son considerables. Estas enfermedades son por lo general objeto de un informe anual, no siendo una enfermedad de notificación obligatoria. Este motivo hace que las empresas gubernamentales no estén obligadas a hacer estudios, ni dar capacitación a los ganaderos sobre la presencia de la enfermedad.

Además, es importante lo que comenta G. Ollis en su artículo titulado Johne's disease, presentado en la página del Centro del desarrollo rural para la agricultura en Estados Unidos, la prevalencia y pérdidas económicas asociadas con la enfermedad de Johne son desconocidas. Esto se debe a que no hay una prueba diagnóstica práctica que determine con confianza las infecciones de *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* en animales que no han desarrollado signos clínicos. Hecho importante para nosotros ya que consideramos que por esta razón, sus propietarios no hacen la prueba de laboratorio, y se preocupan por tratar la diarrea sintomáticamente, más no por saber la etiología.

Para la realización de este estudio es importante tener en cuenta investigaciones realizadas. Como por ejemplo, la que Franklin Garry hizo en el National Animal Health Monitoring System (NAHMS), con hatos de ganado lechero en 1996, perteneciente al Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. Donde reporta que el 45% de los productores no estaban familiarizados con la enfermedad o que la reconocían por su nombre, pero, sabían muy poco de la misma. En los estados Unidos se están realizando planes de control de la enfermedad. Pero la anterior razón hace que los propietarios no hayan tomado las medidas pertinentes. Caso parecido sucede en nuestro país que no es ajeno a la misma circunstancia.

Es necesaria la investigación realizada por el National Animal Health Monitoring System (NAHMS) en ganado lechero en 1996 que estima, las pérdidas son altas.

Esto debido a la reducción en la producción Láctea. Otro estudio, incluye dos estados (New York y Wisconsin), que han demostrado grandes pérdidas económicas, relacionado con la disminución en la producción y el desecho prematuro. Estos costos de pérdidas económicas en los Estados Unidos fueron de \$US 200-250 millones anuales.

Scott Wells resalta en su artículo Enfermedad de Crohn que hay una posible relación entre *M. paratuberculosis* y algunos casos de enfermedad de Crohn en humanos. Pudiendo ser un problema zoonótico.

Cabe resaltar, esta enfermedad por estudios realizados en Escocia por el doctor Beard et al. le han dado la importancia, debido al aumento de la incidencia de la enfermedad en el ganado doméstico, especialmente el ganado bovino, por el posible vínculo zoonótico con la enfermedad de Crohn.

2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

No existen estudios de comparación de las pruebas diagnósticas, Ziehl Nielsen frente a ELISA, para la detección de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*, en vacas de 4 a 7 años, en el corregimiento de Catambuco, en el municipio de Pasto, Nariño, Colombia?

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Comparar las dos pruebas diagnósticas, Ziehl Nielsen frente a ELISA, para la detección de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*, en vacas de 4 a 7 años, en un hato lechero, ubicado en el corregimiento de Catambuco, Pasto, Nariño, Colombia.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la prevalencia del *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*, en los animales analizados, de un hato lechero del corregimiento de Catambuco, mediante la tinción de Ziehl Nielsen, en raspado de mucosa rectal, en busca de globias de bacilos Gram positivos.
- Determinar la prevalencia del *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*, en los animales analizados, de un hato lechero del corregimiento de Catambuco, mediante la prueba ELISA, en suero sanguíneo, en busca de anticuerpos serológicos.
- Comparar las dos pruebas diagnósticas, Ziehl Nielsen frente a ELISA, con base en las prevalencias de cada una.
- Publicar los resultados obtenidos, en la revista CESUM, Dpto. de Biología.

4. MARCO TEÓRICO

4.1. DEFINICIÓN

La paratuberculosis, según Beard¹ et al., es una enteritis crónica de rumiantes causada por el *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (M.A.P.). La enfermedad se encuentra a nivel mundial y causas perdidas económicas considerables a las granjas e industrias afectadas.

Este desorden conocido como paratuberculosis en un inicio fué descrito en 1895 por Johne y Frothingham quiénes identificaron los microorganismos en las lesiones granulomatosas en el intestino de ganado afectado que se presentó en la tinción alcohol ácido-resistente, indicando algún tipo de germen micobacterial. J. R. Stabel² expresa, este se cultivó de ganado en 1910 y fué clasificado como un mycobacterium por Twort y Twort e Ingram. El microorganismo se caracterizó totalmente varios años después y lo nombraron *Mycobacterium paratuberculosis*. Esta distribuido internacionalmente en rumiantes domésticos, tales como ganado bovino, oveja, cabras, así como el ciervo, antílope, y bisonte.

El doctor Franklyn Garry³ quien hace parte de la universidad del estado de Colorado en los Estados Unidos contempla en su artículo, que esté patógeno crece muy lentamente y causa una emaciación progresiva, y es altamente resistente a la inmunidad del animal. Además los animales infectados lo portan por varios años, antes de presentar signos de la enfermedad o encontrarse positivos a alguna prueba. Principalmente la infección afecta el intestino, produciendo una diarrea prolongada, escasa digestión y pérdida excesiva de peso. Los animales enfermos no pierden el apetito hasta que se vean severamente afectados.

¹ BEARD P. M. DANIELS, M. J. HENDERSON, D. PIRIE, A. RUDGE, K. BUXTON, D. RHIND, S. GREIG, A. HUTCHINGS, M. R. MCKENDRICK, I. STEVENSON, K. Y SHARP, J. M. Paratuberculosis Infection of Nonruminant Wildlife in Scotland. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. Abril de 2001. [Marzo 3 2004]. <<http://jcm.asm.org/cgi/content/full/39/4/1517?view=full&pmid=11283080#Top>>

² STABEL, J. R. Johne's Disease: A Hidden Threat!. National Animal Disease Center, Ames [online]. 30 Septiembre 1997. [Julio 31 de 2004]. <<http://jds.fass.org/cgi/reprint/81/1/283.pdf>>

³ GARRY, Franklyn. WELLS, Scott. OTT, Stephen y HANSEN, Don. Who can afford a \$200 loss per cow? OR *Johne's disease* - What do I need to know?. Animal and Plant Health Inspection Service [online]. Marzo 1999. [Enero 16 2004]. <http://www.aphis.usda.gov/vs/ceah/cahm/Dairy_Cattle/johnsart.htm>

Así mismo Stabel⁴ complementa, el ganado se infecta cuando son terneros, pero a menudo no desarrolla los signos clínicos hasta los 2 a 5 años de edad. La afección clínica se caracteriza por una diarrea crónica o intermitente, emaciación, y muerte.

Estos animales jóvenes (menores de 30 días) son más propensos al riesgo de la infección, esta puede persistir en el ambiente por largos periodos. Allen⁵ et al. complementan, si no se trata, la infección se extiende silenciosamente dentro de un hato. Aunque cualquier animal del hato puede infectarse, ocurre normalmente en terneros que ingieren el estiércol contaminado o consumen la leche infectada. Una vez ingerido, los bacilos persisten y se multiplican dentro de los macrófago en el tracto intestinal y otros tejidos linfoides.

Además, Rebecca Arnott⁶ nos comenta que se disemina en ganado, cabras, alpacas y venados (las ovejas parecen ser resistentes a la cepa del ganado).

4.2. FACTORES EPIDEMIOLÓGICOS

Stephen Ott⁷ dice, estas bacterias son diseminadas, en un amplio número, por heces de animales contaminados. Una vez fuera del animal, el microorganismo es bastante fuerte, viviendo por meses en agua, alimento y estiércol. Los bovinos sanos pueden infectarse por alimento y agua contaminada con heces. Estos animales podrían desarrollar la enfermedad y propagarla dentro del hato.

El M.A.P. es un microorganismo patógeno obligado de los animales. Esto significa que el único lugar donde ellos pueden multiplicarse en la naturaleza es dentro de un animal. Con mayor precisión, estar dentro de las células que hacen parte del sistema inmunológico del animal llamados los macrófagos. Michael

⁴ STABEL, J. R. Op. Cit., <<http://jds.fass.org/cgi/reprint/81/1/283.pdf>>

⁵ ALLEN, S. SOTOS, J. SYLTE, M. J. Y CZUPRYNSKI, C. J. Use of Hoechst 33342 Staining To Detect Apoptotic Changes in Bovine Mononuclear Phagocytes Infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology [online]. Estados Unidos: Marzo de 2001 [Enero 25 de 2004]. <<http://cdli.asm.org/cgi/content/full/8/2/460#Top>>

⁶ ARNOTT, Rebeca. Bovine Johne's disease — common questions and answers. NSW Agriculture [online]. Australia: Julio 27 de 2001. [Junio 25 de 2004]. <<http://www.agric.nsw.gov.au/reader/nsw-agriculture>>

⁷ GARRY Franklyn. Op. cit. <<http://www.agric.nsw.gov.au/reader/bjd/dai90.htm#disease>>

Collins⁸ termina diciendo, cuando el M.A.P. deja el animal, por ejemplo en el excremento, puede sobrevivir durante mucho tiempo en los ambientes tales como tierra y agua, pero no puede multiplicarse fuera del animal. Por consiguiente, la fuente primaria de contaminación son los animales infectados.

La ingestión de heces con el microorganismo, es la fuente más común de propagación, como son los pastos y las ubres contaminadas. Rebeca Arnott⁹ sostiene, algunos terneros de hembras infectadas, nacen con la enfermedad y unas pocas vacas infectadas lo diseminan en la leche, la propagación entre granjas, sucede con el transporte de animales enfermos clínica y subclínicamente.

Michael Collins¹⁰ comenta, la ingestión de estiércol es la manera más común de infección en terneros. De segunda esta la leche de las vacas infectadas, pero, posiblemente es la más importante como fuente de infección en los terneros. La probabilidad de infección en terneros por beber leche infectada, es directamente proporcional al tiempo gastado con la madre y/o que a menudo se alimenten con la leche infectada. En ganado de carne donde las prácticas agrícolas, permiten a los terneros permanecer con sus madres y alimentarse naturalmente, las oportunidades para la transmisión de madre a su descendencia es más grande. Puede excretarse directamente en la leche de la madre o podría estar en las ubres de la vaca si estas se contaminan con el estiércol. El agua estancada contaminada con estiércol de ganado es otra fuente potencial de infección. Menos probable, pero posible, las pasturas contaminadas como otra fuente de propagación. Esta enfermedad ha sido reportada en animales de vida salvaje.

El mismo autor¹¹ anuncia que después de ser infectado hay un periodo de incubación prolongado. Durante esta fase los animales parecerán saludables y crecerán normalmente. El periodo de incubación varía ampliamente entre las vacas y las razones para este grado de variación biológica es desconocido. La edad en la cual la enfermedad de Johne es mas común en el ganado lechero es a los 5 años, que generalmente coincide con el 2º, 3º, ó 4º periodo de lactancia. El figura 1, está basado en los datos de investigadores australianos, muestra que pueden verse los signos clínicos en vacas lecheras, desde los 2 años de edad y hasta los 12 años de edad.

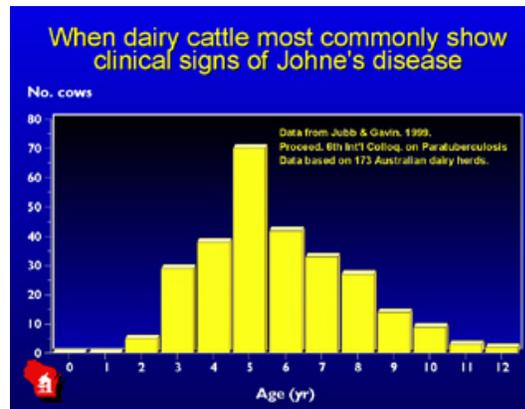
⁸ Johne's Information Center. [online]. Universidad de Wisconsin – Colegio de Medicina Veterinaria / Estados Unidos. 10 diciembre 2003. <<http://www.johnes.org/index.shtml>>

⁹ ARNOTT, Op. cit., <<http://www.agric.nsw.gov.au/reader/bjd/dai90.htm#disease>>

¹⁰ Johne's Information Center. Op. cit., <<http://www.johnes.org/dairy/epidemiology.html#sources>>

¹¹ Ibid., <<http://www.johnes.org/dairy/epidemiology.html#incubation>>

Figura 1. Cuando el ganado bovino presenta más comúnmente signos de la enfermedad de Johne.



Fuente: <http://www.johnes.org/dairy/epidemiology.html#incubation>

Los terneros mayores de 30 días son extremadamente propensos, y, aunque la susceptibilidad disminuye con la edad, los terneros mayores de 12 meses permanecen susceptibles. El ganado mayor de 12 meses llega a aumentar la resistencia, y también es raro que ganado adulto se infecte, así lo dice Rebeca Arnott¹².

Duane Rice¹³ replica, que además de la leche, también son expuestos a camas infectadas. La investigación también sugiere que la infección en los terneros antes del nacimiento puede contribuir a la transmisión de la enfermedad de Johne en los hatos infectados.

Se realizó un estudio de control en hatos lecheros en Noruega de anticuerpos con altos y bajos niveles, respectivamente, contra M.A.P., realizado por los doctores Fredriksen y Jarp¹⁴. Observaron que los factores más importantes relacionados con los altos valores serológicos de anticuerpos contra el M.A.P. en hatos lecheros

¹² ARNOTT, Op. cit., <<http://www.agric.nsw.gov.au/reader/bjd/dai90.htm#disease>>

¹³ RICE, Duane N. y ROGERS Douglas G. JOHNES DISEASE (PARATUBERCULOSIS). NebGuide [online]. Abril 1990. [Agosto 1 2004]. <<http://ianrpubs.unl.edu/animaldisease/g977.htm#top>>

¹⁴ FREDRIKSEN, B. y JARP, J. Factors affecting the herd level of antibodies against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy. International Association for Paratuberculosis [online]. 11 – 14 junio 2002. [Mayo 11 de 2004]. <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst7_p22.htm>

de Noruega son, la localización geográfica, el acceso de pasturas de venado (*Cervus elaphus*), la presencia de aves silvestres en el almacén del alimento y el consumo de pasturas comunes. No es posible excluir la posibilidad que los animales silvestres y aves representen un reservorio del microorganismo, pero parece ser que hay una relación estrecha entre las reacciones cruzadas a la bacteria.

Con respecto a las reacciones cruzadas Hutchings¹⁵ encuentra que, las heces de conejo contienen 4×10^6 cfu *M. a. paratuberculosis*/g y la dosis necesaria para producir enfermedad en los rumiantes domésticos es de un rango de 10^3 a 10^9 organismos, la ingestión de un poco de pellet-fecal podría constituir una dosis efectiva. Evidencias sugieren que los conejos poseen el riesgo más alto para el ganado bovino.

Mercado¹⁶ menciona, los animales infectados clínicamente excretan entre $1,3 \times 10^5$ y $5,9 \times 10^6$ organismos/g de materia fecal, mientras que los portadores subclínicos eliminan entre 40 y 100 organismos/g de materia fecal.

Una investigación, en 20 hatos ganaderos con paratuberculosis, se examinaron 2.906 muestras del medio externo, y 57 (2.0%) fueron positivas a M.A.P.. Los tipos de RFLP de estas cepas fueron siempre la misma para los tipos de RFLP aislados de animales que residen en el mismo lugar. Ivo Pavlik¹⁷ realizó el estudio en 2 años, en una granja infectada, evaluó la persistencia de M.A.P. en la lechada. El tipo de RFLP no fue cambiado en 10 meses. El microorganismo se aisló de 1 (3.0%) no vertebrado de 33 muestras de gusanos, 78 (22.2%) de 351 larvas de zánganos (*Eristalis tenax*) y 4 (2.0%) de 202 muestras de moscas de dípteros de la familia Scatophagidae (*Scatophaga* sp.) y Calliphoridae (*Calliphora vicina* y *Lucillia caesar*). Los tipos de cepas aisladas de RFLP fueron idénticas con los

¹⁵ HUTCHINGS, MR. y DANIELS, MJ. HENDERSON, D. GREIG, A. Potential wildlife to ruminant transmission routes for *M. a. Paratuberculosis*. International Association for Paratuberculosis [online]. 11 – 14 junio 2002. [Mayo 11 de 2004]. <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst7_o13.htm>

¹⁶ MERCADO, Martinis. CICUTA, Daniela. BOEHRINGER, María E. PAOLICCHI, Silvia I. MORSELLA, Fernando. ROIBÓN, Claudia. BENITEZ, Walter R. BARCELÓ, Maria.C. MIRANDA, A. O. Paratuberculosis en ganado lechero de Corrientes. Facultad de Ciencias Veterinarias – UNNE [online]. [Junio 23 de 2004]. <<http://www.unne.edu.ar/cyt/2002/04-Veterinarias/V-059.pdf>>

¹⁷ PAVLÍK, I. YAYO AYELE, W. FISCHER, O. MATLOVA, L. SVASTOVA, P. BARTOS, M. MACHACKOVA, M. ALEXA, M. LAMKA, J. "Role of the external environment, plants and non-vertebrates for the spread of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*". International Association for Paratuberculosis [online]. 11 – 14 junio 2002. [Mayo 11 de 2004]. <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst7_o12.htm>

tipos de RFLP de ruminantes infectados en las granjas respectivas. Para otras posibles fuentes de M.A.P., las verduras eran cultivadas (lechuga, rábano, tomate) cuatro semanas en tierra infectada artificialmente por suspensión de M.A.P. del tipo RFLP B-C1 normalmente aislado de ruminantes y del medio ambiente. Se aislaron cepas idénticas de los tipos RFLP de la raíz, tallo, hoja, rábano y tomate. Los No-vertebrados (*Lumbricus terrestris*, *Blatta orientalis*, *Tenebrio molitor*, *Zophobas atratus*) se infectaron con *M. paratuberculosis* del tipo RFLP suspensión B-C1 aislada de heces de vacas. Se detectó la diseminación del microorganismo en el excremento de no-vertebrados hasta las 72 horas postinfección. No se encontró un periodo largo de persistencia del agente infeccioso. En vista de la posible importancia de la enfermedad, el programa de control debe considerar una higiene severa y la práctica de sanidad completa incluyendo la desinfección y desinfestación de establos y las áreas de la propiedad.

4.3. EPIDEMIOLOGÍA

Buergelt¹⁸ anuncia, la enfermedad de Johne, se ha descrito a lo largo del mundo desde su descubrimiento en 1895. El *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*, es un bacilo intracelular facultativo ácido-resistente. Se ha reconocido en animales cautivos (los artiodáctilos) y ruminantes de variedad silvestre. Se ha informado como una enfermedad espontánea en una variedad de ruminantes no domésticos de tipo libre, incluso el alce, la oveja de las montañas rocosas, cabra de las montañas rocosas, venado de pelo blanco, ciervo axis, ciervo de Florida, y el alce tule. Y también documenta la presencia de este microorganismo en los conejos salvajes en Escocia. Otros informes se han ocupado de los brotes de alrededor del mundo en el ciervo rojo. Así que, una variedad de especies animales silvestre que llevan el bacilo pueden tener un potencial para diseminar a ruminantes domésticos que comparten la misma pastura y hábitat.

Es una afección crónica que afecta el intestino de todos los animales ruminantes, incluyendo ganado, ovejas y cabras. Ollis¹⁹ menciona, que aunque muchos animales en un hato pueden ser infectados, generalmente menos del 5% de ellos desarrollan signos clínicos de la enfermedad.

¹⁸ BUERGELT, C. D. LAYTON, A. W. GINN, P. E. TAYLOR, M. J. KING, M. HABECKER, P.L. MAULDIN, E. WHITLOCK, R. ROSSITER C. Y COLLINS, M. T. The Pathology of Spontaneous Paratuberculosis in the North American Bison (*Bison bison*). *Veterinary pathology* [online]. 2002. [Junio 23 de 2004]. <<http://www.vetpathology.org/cgi/content/full/37/5/428#top>>

¹⁹ OLLIS, G. W. Johne's Disease. NSW Agriculture [online]. 17 Mayo 2001. [Marzo 19 de 2004]. <[http://www1.agric.gov.ab.ca/\\$department/deptdocs.nsf/all/agdex742#Cause](http://www1.agric.gov.ab.ca/$department/deptdocs.nsf/all/agdex742#Cause)>

Ademas Collins²⁰ manifiesta, los ejemplos de rumiantes que también se incluyen: ciervos, alces, antílopes, bisontes, etc., (Camélidos tales como llamas, guanacos y alpacas, mientras se considera que los "pseudo-rumiantes", también son susceptibles a la infección). Además reafirma, hubo unos informes de M.A.P. que infectaron cerdos, caballos, y primates no humanos.

Realizado un estudio por Beard²¹ et al. quienes utilizaron tanto el cultivo y el análisis histopatológico en el zorro, el armiño, la comadreja, el cuervo, el grajo, el chova, la rata, el ratón de la madera, la liebre, y tejon los cuales albergaban el M.A.P., sugiriendo que la epidemiología de esta enfermedad es más compleja y poco comprendida. Recolectaron un total de 591 muestras, de 18 especies, desde agosto de 1998 a octubre de 1999 en cuatro granjas y propiedades adjuntas del oriente de Escocia: dos en Angus y dos en las regiones de Perth y Kinross. Todas las cuatro granjas tuvieron una historia de niveles moderado a altos de paratuberculosis en el ganado bovino y conejos, y también se había confirmado un caso en una oveja. Y ellos concluyeron sobre la evidencia en la fauna de Escocia que son naturalmente infectados con este microorganismo y la condición del huésped es mucho más amplia de lo pensado. Los cultivos fecales positivos de los zorros, los armiños, cuervos, grajos, ratas, y ratones de madera, sugieren una contaminación medio ambiental con el microorganismo y por eso propone un riesgo para las granjas al pastar el ganado cerca de propiedades infectadas.

Estudiaron durante cuatro años un brote de la enfermedad de Johne en una manada de ciervo rojo. Fawcett²² et al. usaron técnicas serológicas, histopatológicas y de cultivo para supervisar el progreso de la enfermedad, también se aplicaron pruebas superficiales de hipersensibilidad de tipo retardada. Aunque no encontraron animales que pudieran ser reservorios de la enfermedad por la baja sensibilidad de la prueba superficial, sin embargo, por histopatología siguieron apareciendo casos de animales infectados.

Con lo respecta a los bovinos, Garry²³, afirma que los terneros menores de 6 meses son más vulnerables a la infección. Bajo condiciones de alojamiento

²⁰ Johne's Information Center. Op. cit., <<http://www.johnes.org/general/epidemiology.html#host>>

²¹ BEARD, Op. cit., <<http://jcm.asm.org/cgi/content/full/39/4/1517?view=full&pmid=11283080#Discussion>>

²² FAWCETT, A.R. GODDARD, P.J. MCKELVEY, W.A. BUXTON, D. REID, H.W. GREIG, A. MACDONALD, A.J. Johne's disease in a herd of farmed red deer. PUBMED [online]. 1 abril 1995. [Junio 10 de 2004]. <http://cmr.asm.org/cgi/external_ref?access_num=7661952&link_type=MED>

²³ GARRY, Op. cit., <http://www.aphis.usda.gov/vs/ceah/cahm/Dairy_Cattle/johnsart.htm>

intensivo con un alto nivel de exposición del ganado joven a los microorganismos, puede llegar a ser común en ganado de 1 a 3 años. Los animales enfermos son desechados y la enfermedad podría no considerarse como un problema de hato por algún tiempo.

El microorganismo es de crecimiento lento, de hecho, uno de los crecimientos más lentos entre las bacterias. Puede tomar años para que la infección ocurra a través del estiércol. Graeme Eamens²⁴ dice, mucho ganado infectado no disemina cantidades razonables de bacterias en el estiércol hasta después de los 2 años.

Tim Jessep²⁵ comenta en su artículo para la NSW Agriculture, en ganado, son susceptibles aun hasta los 12 meses, con frecuencia no llegan a estar infectados hasta después del primer año. En muchos casos, el ganado se infecta en su lugar de procedencia.

Y Collins²⁶ explica, el ganado infectado se compra con frecuencia y a menudo se infectan los hatos de expansiones grandes. Esto se apoya en los datos del estudio de frecuencia de presentación en los hatos ELISA-positivos en los Estados Unidos, basado en el tamaño del hato mostrado en el figura 2.

El estudio realizado en los Estados Unidos 1996 por Franklyn Garry²⁷, quien utilizó pruebas serológica e historias clínicas, para identificar hatos con al menos el 10% de vacas infectadas. Los resultados fueron del 22% en los hatos lecheros. Hatos grandes, con al menos 300 vacas, presentaron un 40% de animales infectados, mientras los pequeños hatos, 50 vacas, presentaron un 20%.

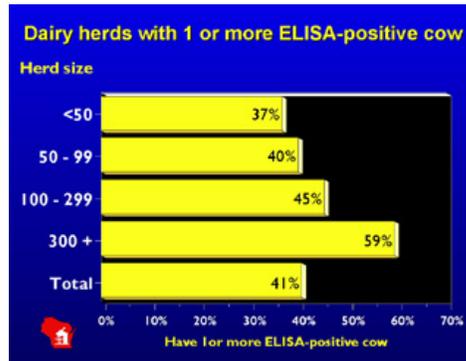
²⁴ EAMENS, Graeme. Testing for bovine Johne's disease. NSW Agriculture [online]. Julio de 2001. [Marzo 19 de 2004]. <<http://www.agric.nsw.gov.au/reader/bjd/dai89.htm#difficult>>

²⁵ JESSEP, Tim. Johne's disease in cattle herds. NSW Agriculture [online]. Julio de 2001. [Marzo 19 de 2004]. <<http://www.agric.nsw.gov.au/reader/bjd/dai51.htm#Survival>>

²⁶ Johne's Information Center. Op. cit., <<http://www.johnes.org/dairy/epidemiology.html#prevalence>>

²⁷ GARRY, Op. cit., <http://www.aphis.usda.gov/vs/ceah/cahm/Dairy_Cattle/johnsart.htm>

Figura 2. Hatos lecheros con uno o más vacas ELISA-positivo.



Fuente: <http://www.johnes.org/dairy/epidemiology.html#prevalence>

Los doctores Thompson, Libal y Stewart²⁸ en su investigación en el estado de Texas, comentan, un aumento de seropositivos en ganado Braman puede ser debido al incremento de susceptibilidad a la infección o a una diferencia en la respuesta inmune a la enfermedad. La diferencia en el acrecentamiento para los hatos seropositivos podría ser debido a una alta prevalencia de la infección o al aumento de microorganismos que presentan reacción cruzada para el test de ELISA.

Chaffer y Grinberg²⁹ comentan, el impacto económico es difícil de cuantificar. Aunque, los efectos adversos de la infección en el estado clínico son bien documentados, mientras su impacto específico en la fertilidad, mastitis y producción de leche durante la fase subclínica son menos documentados. La propuesta de este estudio, fue dirigido a estas preguntas, comparando anticuerpos anti-*M. paratuberculosis*, realizados con el test comercial IDEXX ELISA, entre el intervalo de parto y el conteo de células somáticas. Obtenido de libros del hato de ganado lechero de la Asociación de criadores en Israel para la producción láctea. La prevalencia del M.A.P. en los animales positivos a la prueba en los tres hatos fue de 7%, mientras que, según la edad fue de 1.5% para el primer periodo de lactancia, 7% para la segundo, 14% para la tercero y 10% para el cuarto y en adelante. Los animales negativos a la prueba de ELISA durante un mes de estudio

²⁸ ROUSSEL, A.J. THOMPSON J.A. LIBAL, M.C. STEWART, E.M. Prevalence and risk factors for paratuberculosis among beef cattle in the state of Texas, USA. International Association for Paratuberculosis [online]. 11 – 14 junio 2002. [Mayo 11 de 2004]. <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst7_o5.htm>

²⁹ CHAFFER, M. Y GRINBERG. The effect of sub-clinical Johne's disease on milk production, fertility and milk quality in Israel. International Association for Paratuberculosis [online]. 11 – 14 junio 2002. [Mayo 11 de 2004]. <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst7_o7.htm>

produjeron significativamente más leche que los positivos ($p=0.01$). Ninguna, de estas diferencias, sin embargo, fueron estadísticamente significativas. No hubo diferencia significativa en la comparación entre el intervalo de parto y el conteo de células somáticas entre los dos grupos. Se concluyó que los factores evaluados en este estudio no tuvieron un hato problema significativo.

4.4. DISTRIBUCIÓN

De acuerdo con Michael Collins³⁰, la enfermedad de Johne se ha informado en cada continente. Suecia y algunos estados en Australia son las únicas regiones del mundo que pueden declararse libres, basados en el sistema de reportes confiables y de las investigaciones extensivas, que usan las pruebas de laboratorio. La tabla 1 indica la estimación aproximada de prevalencia en algunos países en el año 1996.

Tabla 1. Estimaciones de prevalencia de hatos lecheros en otros países ganaderos:

Pais	Prevalencia
Australia (est. de Victoria)	14-17%
Nueva Zelanda	60%
Países Bajos	55%
Bélgica	22%
Austria	7%
Inglaterra / Gales	17%
Dinamarca	47%
Alemania/Arnesberg	10-30%

Fuente: <http://www.johnes.org/dairy/epidemiology.html#prevalence>

El Centro de Vigilancia Epidemiológica de España dice al respecto, aunque los datos de años anteriores son escasos, en los últimos años se ha ido observando un aumento de la frecuencia de la enfermedad. Como se observa en la tabla 2.

³⁰ Johne's Information Center. Op. cit., <http://www.johnes.org/general/epidemiology.html#prevalance>

Tabla 2. Estudios de prevalencia (traducido de Allen J. Rousset)

País	Prueba diagnóstica	Prevalencia en animales	Prevalencia de rebaños	Referencia
Dinamarca	ELISA en leche	8,8%	86%	Jakobsen 2000
Noruega	ELISA en suero	11%	50%	Forehll 1999
Austria	ELISA en suero	2%	7%	Gasteiner 1999
Eslovenia	ELISA en suero	1,2%	6,5%	Ocepek 1998
Costa Rica	ELISA en suero	11,9%	18,7%	Dolz 1999
Australia Oeste	ELISA en suero, cultivo fecal	0%	0%	Ellis 1999
EEUU (leche)	ELISA en suero	2,5%	22,5%	Dargatz 1997
EEUU (carne)	ELISA en suero	0,4%	7,9%	Dargatz 1998
Corea	ELISA en suero	1,7%	no disponible	Tae Jong 1997
Suiza	ELISA en suero	no disponible	8%	Audige 1997
Argentina (Patagonia)	ELISA en suero	1,7%	no disponible	Layana 1997
Inglaterra	PCR y cultivo	3,5% y 2,6%	no disponible	Cetinkaya 1996
Suiza	ELISA en suero	6%	---	Meylan 1995

Fuente: <http://sameens.dia.UNED.es/trabajos2/T2A/GonzalesFernandezdeCastroM/epidemia.htm#Medios>

Sevilla³¹ nos muestra un estudio detallado, realizado en España en prevalencia de paratuberculosis donde abarcó el área central del norte del país comprendiendo el condado de Basque y reportó una prevalencia general de infección subclínica del 30%, se realizaron 2 estudios basados en la detección de M.A.P. con PCR en muestras de leche. Por el pequeño tamaño muestreado se estimó un amplio error y además solo tuvo un valor en la prevalencia máxima estimada del 47,6% y 19,3% respectivamente.

³¹ SEVILLA, I. ADURIZ, G. GARRIDO, JM y GEIJO MV. A preliminary survey on the prevalence of paratuberculosis in dairy cattle in Spain by bulk milk PCR. International Association for Paratuberculosis [online]. 11 – 14 junio 2002. [Mayo 11 de 2004]. <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst7_o1.htm>

La Asociación Internacional de Paratuberculosis presenta valores de prevalencia en países de Latinoamérica. Uno de ellos realizado por los autores Ferreira³² et al. realizaron un estudio en 1004 bovinos de 45 propiedades en el estado de Río de Janeiro. Las muestras fueron realizadas con la prueba de ELISA. Se encontró un resultado del 18% de animales positivos, y el 82% de los hatos tuvieron al menos un animal positivo. El rango de porcentaje es de 4.7% a 46.5%/hato.

Otro estudio de diagnóstico e investigación en Argentina entre 1992 y 2002 hecho por los autores Paolicchi³³ et al. Con el programa ROC – MedCalc, utilizaron la técnica serológica de ELISA, realizado con un total de 68.335 sueros que fueron procesados, además, un total de 9.123 muestras (heces, órganos y leche) reportadas en ganado de 4 y más años, en la capital y provincias. Las investigaciones fueron realizadas para obtener la seroprevalencia real donde se encontró en Buenos Aires un resultado del 26,5%.

Se determinó la seroprevalencia del *Mycobacterium paratuberculosis* en hatos lecheros y vacas, en la más importante región lechera de Uruguay, estudio serológico realizado por Piaggio³⁴, Núñez y Gil. La población de ganado lechero en la región estudiada, es de 2.000 hatos con 180.000 vacas de ordeño. Los sueros fueron probados con un kit de ELISA del Laboratorio de IDEXX Inc. La prevalencia aparente fue del 16.02%. Un hato positivo se definió, que un hato con dos o más vacas positivas a ELISA. El porcentaje de hatos positivos fué 72% (26/36). La enfermedad está presente en Uruguay con una alta propagación.

En el período comprendido entre enero y mayo de 2001 se realizó el estudio de algunas entidades patológicas del ganado de las haciendas El Progreso, La Montaña y Vegas de la Clara, las cuales son de propiedad de la Universidad de Antioquia. Por medio del estudio de muestras de materia fecal y de suero sanguíneo, se analizaron varias entidades parasitarias, bacterianas y virales que

³² FERREIRA, R. FONSECA, L.S. LILENBAUM, W. Detection of Anti- *Mycobacterium paratuberculosis* antibodies in Brazilian herds. International Association for Paratuberculosis [online]. 11 – 14 junio 2002. [Mayo 11 de 2004]. <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst7_p7.htm>

³³ PAOLICCHI, F. MORSELLA, C. VERNA, A. SPATH, E. MARTINIS, D. ZUMARRAGA, M. GIOFREE, A. CATALDI, A. ROMANO, M. Diagnosis, epidemiology, and Program of Control of Paratuberculosis in bovine herds of Argentina. International Association for Paratuberculosis [online]. 11 – 14 junio 2002. [Mayo 11 de 2004]. <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst7_p1.htm>

³⁴ PIAGGIO, J. NÚÑEZ, A. GIL, A. Johne's disease serological prevalence in Uruguayan dairy cows. International Association for Paratuberculosis [online]. 11 – 14 junio 2002. [Mayo 11 de 2004]. <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst7_p3.htm>

afectan al ganado en nuestro medio. Conforme al Dr. Nicolás Ramírez³⁵ y sus colaboradores informan que en Colombia no se conoce la prevalencia de paratuberculosis en los hatos.

4.5. ETIOLOGÍA

La bacteria *Mycobacterium* es un microorganismo gram-positivo, que incluye un número de patógenos en humanos y animales. N. Beth Harris³⁶ asegura, el *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (M.A.P.) es el agente etiológico de una severa gastroenteritis en rumiantes conocida como enfermedad de Johne.

A lo anterior, Collins³⁷ adiciona, debido a su incapacidad para producir la micobactina, el M.A.P. sólo pueden crecer dentro de las células animales donde "toma" hierro de las células del huésped, más frecuentemente de las células inmunes llamadas macrófagos. Así, es un patógeno obligado de mamíferos.

La micobactina es un sideróforo comercialmente disponible. Los sideróforos son químicos sintetizados por organismos vivientes con el propósito de ligar y/o transportar hierro en las células. La estructura química de la micobactina J (las micobactinas comercialmente disponibles son un suplemento en los medios bacteriológicos como soporte en el crecimiento del M.A.P.) fué descrito por Schwartz y De Voss. Michael Collins³⁸ adiciona, este microorganismo es dependiente de la micobactina (figura 3) en los medios de cultivo. Con mínimas excepciones, el M.A.P. se considera la única especie de micobacteria dependientes de micobactina para su crecimiento in vitro. Esta característica es utilizada para distinguir este germen de otras micobacterias que puede aislarse durante el ensayo del cultivo de heces o muestras de tejido.

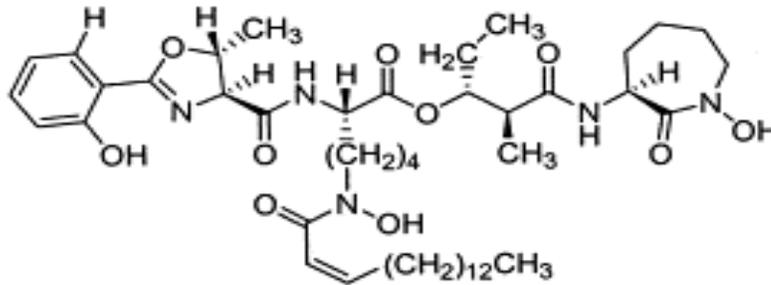
³⁵ RAMÍREZ, Nicolás V. GAVIRIA, Gerardo B. RESTREPO, Luis Fernando. GÓMEZ Catalina. Diagnóstico epidemiológico referente a varias patologías de bovinos en tres haciendas de la Universidad de Antioquia. Universidad de Antioquia [online]. Enero - mayo 2001. [Junio 23 de 2004]. <http://kogi.udea.edu.co/articulos/Med_Bovina/proyecto%20diagn%F3stico.pdf>

³⁶ HARRIS, Beth N., BARLETTA Raúl G. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. PUBMED [online]. Julio 1999. [Junio 10 de 2004]. <<http://cmr.asm.org/cgi/content/full/14/3/489#top>>

³⁷ Johne's Information Center. Op. cit., <<http://www.johnes.org/biology/general.html#2>>

³⁸ Ibid., <<http://www.johnes.org/glossary.html#likelihood>>

Figura 3. Fórmula química de la micobactina.



Fuente: <http://www.johnes.org/glossary.html#likelihood>

Así mismo, Jessep³⁹ considera, el germen, es muy resistente, puede ser capaz de vivir por un periodo mayor de un año en el suelo. Esta razón, se debe tener en consideración cuando se haga planes de control.

Este microorganismo es capaz de persistir por largos periodos debido al alto contenido de lípidos en la pared celular y la inactividad metabólica de los organismos. Schroen⁴⁰ comenta, los factores físicos que podrían influir en la supervivencia en el suelo incluyen la temperatura, el pH, la exposición a rayos ultravioleta y la humedad. El suelo seco y la temperatura alta (30°C) fueron los factores más significativos en la disminución comparado con las condiciones húmedas. De estas condiciones resultó una obtención intermedia de la bacteria comparada con la condición anterior. El efecto del pH fue menor, pero presentaron confusión con el tipo de suelo y la materia orgánica. La exposición a rayos ultravioleta no tuvo efectos directos sobre la supervivencia, sin embargo en periodos de verano donde presenta una alta exposición solar y que por consecuencia ocasiona una alta temperatura en el suelo y condiciones secas, será muy efectiva para la reducción del microorganismo en el medio ambiente.

Ollis⁴¹ consigna en su trabajo, es resistente a la degradación medio ambiental, como también a muchos desinfectantes. Este microorganismo sobrevive en agua estancada, estiércol o en el suelo por más de un año. También resiste la congelación de menos 14°C por bastante tiempo. La capacidad de este para

³⁹ JESSEP, Op. cit., <<http://www.agric.nsw.gov.au/reader/bjd/dai51.htm#Survival>>

⁴⁰ SCHROEN, C.J. Factors affecting the survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in soil. International Association for Paratuberculosis [online]. 11 – 14 junio 2002. [Mayo 11 de 2004]. <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst1_o5.htm>

⁴¹ OLLIS, Op. cit., <[http://www1.agric.gov.ab.ca/\\$department/deptdocs.nsf/all/agdex742#Cause](http://www1.agric.gov.ab.ca/$department/deptdocs.nsf/all/agdex742#Cause)>

sobrevivir en el medioambiente se puede reducir por la presencia de orina o por procesos de ensilaje.

Por otra parte, en el estudio realizado por Katayama⁴² et al. comenta, los rayos ultravioleta incluidos en la luz solar ha sido considerada como un desinfectante efectivo contra patógenos en pasturas, pero pocos datos han sido publicados en su relativa eficacia contra este microorganismo., investigaron la influencia de radiación UV-B en la viabilidad de las células de M.A.P., suspendidas en agua destilada y leche diluida bajo condiciones de humedad y secado. Las cepas utilizadas fueron la BBM2201 y la ATCC19851. Sin embargo, sobrevivió bajo irradiación de 1,085,000J/m², cual es equivalente a la luz solar de varios meses. Los resultados indican que el germen reside dentro de la leche diluida o pasturas, incluso pueden sobrevivir por un largo periodo bajo exposición a la luz solar.

4.5.1. Morfología. Es una bacteria pequeña (0.5 x 1.5 micra) de forma redondeada. Que puede ser vista usando un microscopio luz de 40x u objetivos de mayor poder. Cuando se aplica la tinción del Gram, es azul y siendo Gram-positivo. Cuando se aplica tinción ácido-alcohol-resistente como la de Ziehl-Neelsen o la tinción de Kinyoun, el M. paratuberculosis tinte rojo y se conoce como ácido-alcohol resistente positivo. La transmisión de microscopía electrónica revela la pared célula áspera cerosa con su estructura trilaminar. Collins⁴³ termina expresando que en la micobacteria también puede verse las vacuolas intracelulares o inclusiones comunes. Como se muestra en la figura 4.

Nicolet explica, “el germen es un bacilo delgado (0,5 x 1- 2 micras), aerobio, inmóvil, ácido-resistente. Su cultivo en medios artificiales es muy difícil. Tarda de 4 a 8 semanas en crecer a la temperatura optima de incubación de 38 – 39 grados centígrados y en condiciones estrictamente aerobias; el crecimiento es más rico y rápido en los subcultivo”⁴⁴.

⁴² KATAYAMA, N. KAMATA, G.S. YOKOMIZO, G.Y. Influence of ultraviolet-B (UV-B) on viability of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. International Association for Paratuberculosis [online]. 11 – 14 junio 2002. [Mayo 11 de 2004]. <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst7_p21.htm>

⁴³ Johnes’ Information Center. Op. cit., <<http://www.johnes.org/biology/general.html#6>>

⁴⁴ NICOLET, Jacques. Compendio de bacteriología medica veterinaria. Zaragoza: Acribia. 1985. p.191.

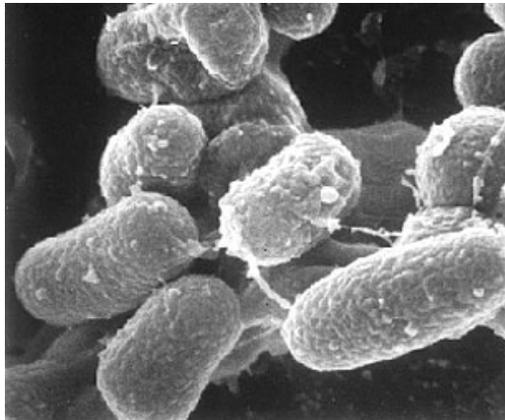
Figura 4. *Mycobacterium paratuberculosis*.



Fuente: <http://www.johnes.org/biology/general.html#6>

La Universidad de Wisconsin⁴⁵ señala, el examen por microscopía electrónica nos permite ver la superficie de objetos extremadamente pequeños como las bacterias de *M. paratuberculosis*. Observamos como esta bacteria crece en grupos y tiene una pared celular áspera, cerosa como se observa en la figura 5. La pared celular es responsable de la resistencia a los antibióticos, desinfectantes químicos, y los factores medioambientales como el calor y frío.

Figura 5. *Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis*. (Esta fotografía pertenece a la Universidad de Wisconsin).



Fuente: http://www.johnes.org/general/_EM_scanning.html

⁴⁵ Johnes's Information Center. Op. cit., <http://www.johnes.org/general/_EM_scanning.html>

Cocito⁴⁶ determina, el ADN del agente etiológico tiene una composición base(66 a 67% G+C) dentro del rango de estas micobacterias (62 a 70% G+C), un tamaño (4.4 x 10⁶) a 4.7 x 10⁶) el bp) más grande que de la mayoría de las micobacterias patogénicas (2.0 x 10⁶) a 4.2 x 10⁶) bp), y una alta relación (> 90%) al ADN del *Mycobacterium avium*.

Santiago Vadillo reporta, “El M.A.P. muestra un crecimiento disgónico que aparece sólo en los medios que contienen micobactina J incorporada, y tarda entre 5 y 14 semanas en producir un crecimiento primario de colonias muy pequeñas, inferiores a 1 mm, lisas y sin pigmentación, que con el tiempo se van haciendo rugosas y aumentan de tamaño hasta 4 mm”⁴⁷.

La morfología colonial del M.A.P. es afectado por la composición del medio de cultivo. En el medio agar yema de huevo Herrold, uno de los medios de cultivo más utilizados en los laboratorios de diagnóstico veterinario, aparecen colonias pequeñas, algo ásperas y de color blanquecinas a amarillas. El acercamiento presentado en la figura 6 de las colonias en medio agar Middlebrook, muestra la morfología colonial áspera típica del microorganismo crecido en ausencia de Tween, así lo reporta Michael Collins⁴⁸.

Figura 6. Colonias de *M. paratuberculosis* en medio de cultivo sin Tween.



Fuente: http://www.johnes.org/general/_Colony7H11.html

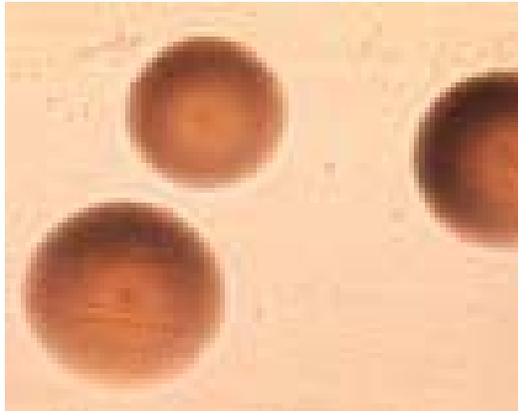
⁴⁶ COCITO, C. GILOT, P.COENE, M. KESEL, M. de. POUPART, P. Y VANNUFEL, P. Paratuberculosis. PUBMED [online]. Julio 1994. [Junio 10 de 2004]. <<http://cmr.asm.org/cgi/ijlink?linkType=ABST&journalCode=cmr&resid=7/3/328>>

⁴⁷ VADILLO, Santiago. PÍRIZ, Segundo. MATEOS, Emilio. Manual de Microbiología Veterinaria. 1ed. Madrid: McGraw Hill-Interamericana. 2002. p. 515.

⁴⁸ Johnes's Information Center. Op. cit., <http://www.johnes.org/general/_Colony7H11.html>

El mismo autor⁴⁹ comenta, Tween 80 (un detergente que mejora la tasa de crecimiento) es un surfactante utilizado en medios de cultivos para acelerar el crecimiento de la micobacteria. Con la adición de Tween 80 la tasa de crecimiento aumenta y su morfología colonial se vuelve lisa y redondeada pareciéndose a *M. avium* como se muestra en la figura 7.

Figura 7. Medio de cultivo agar con Tween.



fuelle: <http://www.johnes.org/biology/general.html#5>

Ademas Manning⁵⁰ apunta, la pared celular de la micobacteria está compuesta de una mezcla serosa espesa de lípidos y polisacáridos. La pared celular, aunque no esté bien estudiada, parece similar a la mayoría de las características de otras micobacterias. Hay que tener en cuenta que mientras muchas cepas de *M. avium* producen una superficie glicolipídica que permiten que las cepas puedan ser serotipificadas (es decir, distinguir los anticuerpos específicos para cada subtipo glicolipídico), la cepa del *M. paratuberculosis* carece de tal antígeno glicolipídico en su superficie.

4.5.2. Clasificación. El género *Mycobacterium* es un conjunto de bacilos grampositivos que forman parte de los actinomicetales por los componentes de su pared celular. Es aerobio (metabolismo oxidativo). Estas bacterias se caracterizan por su elevada proporción de lípidos (ácido micólico, fosfolípidos). La gran proporción en lípidos de la pared explica, de alguna forma, lo débilmente Gram positivos, siendo resistente a la decoloración con ácidos si se han teñido

⁴⁹ Ibid., <<http://www.johnes.org/biology/general.html#5>>

⁵⁰ Ibid., <<http://www.johnes.org/biology/general.html#7>>

con fucsina (acidoresistencia). Nicolet⁵¹ manifiesta que Las diferentes formas de las micobacterias van de bacilos ligeramente curvos o de filamentos cortos sin ramificaciones (o sólo rudimentarias), encontrándose pequeños bastoncitos o cocos. No producen micelios aéreos ni esporas, opuestamente a muchos actinomices. El género *Mycobacterium* se conocen más de 30 especies, patogénicas estrictas y facultativas, así como puramente saprófitas.

Observando la figura 8 y relacionando con lo que Collins⁵² expresa, en una base genética, el *M. paratuberculosis* es virtualmente idéntico al *M. avium*. Sin embargo, las características fenotípicas del *M. paratuberculosis* son diferentes de las del *M. avium*: El *M. paratuberculosis* crece mucho más despacio, requiere un químico de hierro-transporte conocido como la micobactina, para su crecimiento in vitro, forma colonias ásperas en medio agar sólido, e infecta los mamíferos en lugar de aves. Por consiguiente, ha estado en debate la clasificación taxonómica más apropiada para el *M. paratuberculosis*. Una opinión apoyada por la Asociación Internacional en Paratuberculosis es que este microorganismo debe reclasificarse como una subespecie del *M. avium* y así renombrado como *M. avium subespecie paratuberculosis*.

Thorel⁵³ et al. realizaron un análisis taxonómico numérico de 38 cepas de *Mycobacterium paratuberculosis* y cepas micobacteriales relacionadas, incluso la micobacteria de la paloma de madera; Este análisis se basó en 22 pruebas, que se seleccionaron por su valor discriminativo potencial de un total de 51 pruebas estudiadas y produjo cuatro grupos bien definidos. El grupo uno contuvo las cepas de *M. paratuberculosis*, incluyendo dos cepas aisladas de los pacientes con la enfermedad de Crohn; el grupo 2 que contuvo cepas de *Mycobacterium avium* y referencia de *Mycobacterium intracelular*; el grupo 3 consistía de la micobacteria de la paloma de madera; y la única cepa en el grupo 4 era *M. paratuberculosis* 316F, que se utilizó como antígeno y producción de la vacuna. Las cepas en el grupo 1 fueron dependientes a la micobactina aun cuando ellas fueron subcultivadas, considerando que las cepas del grupo 3 eran incapaces de crecer en el medio de huevo y su crecimiento se estimuló en un pH 5.5. También fueron características útiles para diferenciar entre los grupos 1 y 3 el estímulo de

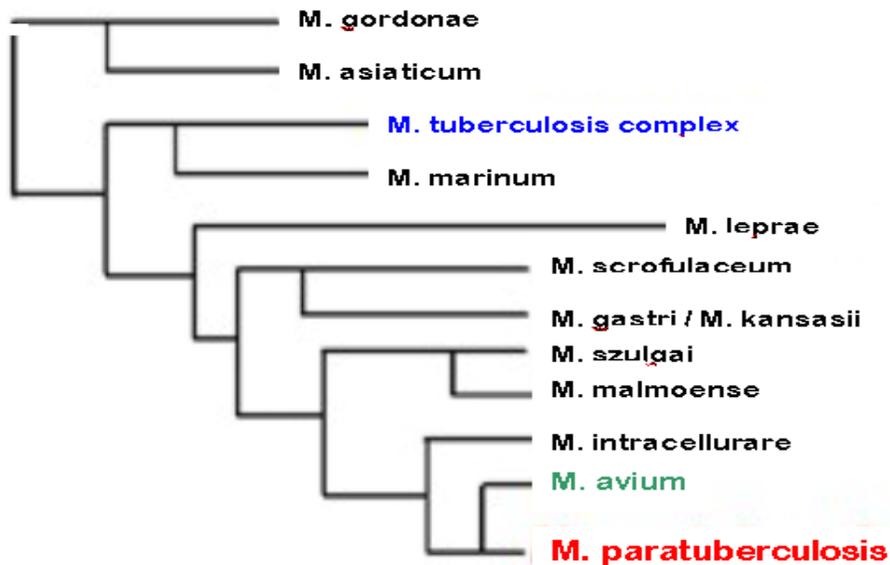
⁵¹ NICOLET, Op. cit., p. 184.

⁵² Johnes's Information Center. Op. cit., <<http://www.johnes.org/biology/general.html#1>>

⁵³ THOREL, M.F. KRICHEVSKY, M. Y LEVY-FREBAULT, V.V. Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. PUBMED [online]. 1990. [Junio 10 de 2004]. <<http://cmr.asm.org/cgi/ijlink?linkType=ABST&journalCode=ijs&resid=40/3/254>>

crecimiento por el piruvato, la resistencia a D-cicloserina (50 micrograms/ml), y la actividad del fosfata alcalina. Los resultados de estudios previos de hibridación ADN-ADN han demostrado que el *M. avium* (Chester 1901), el *M. paratuberculosis* (Bergey et al. 1923), y la micobacteria de paloma de madera pertenecen a una sola especie genómica, y nosotros proponemos que el nombre de esta especie debe ser *M. avium*. En base a los resultados de análisis genómicos anteriores basados en la longitud de fragmento de restricción, los resultados del estudio de polimorfismo, y los modelos de ADN determinados por la electroforesis del campo de inversión gel, así como los resultados de nuestro estudio fenotípico, nosotros proponemos que las especies deben ser divididas en subespecie que corresponde a la patogenicidad y características del huésped.

Figura 8. El árbol filogenético parcial de la relación de micobacteria patógena basado en la secuencia 16S del DNA.



Fuente: <http://www.johnes.org/biology/general.html#1>

Harris⁵⁴ y Barletta mencionan que las especies de *M. avium* están corrientemente subdivididas en tres subespecies, *M. avium subsp. avium* (*M. avium*), *M. avium subsp. paratuberculosis*, y *M. avium subsp. silvaticum* (*M. silvaticum*). La designación del *M. Paratuberculosis* esta basada en la hibridación de DNA-DNA, y análisis taxonómico numérico. El *M. paratuberculosis* puede ser diferenciado fenotípicamente del *M. avium* y *M. silvaticum* por su dependencia de micobactina y genotípicamente por la presencia de múltiples copias de un elemento de inserción.

⁵⁴ HARRIS, Op. cit., <<http://cmr.asm.org/cgi/content/full/14/3/489#SEC2>>

Un estudio realizado en Argentina en seroprevalencia por Paolicchi⁵⁵ et al., encontraron un total de 136 cepas aisladas en heces (n=100: 66 de ganado de carne(gc), 28 de ganado lechero(gl), 6 ciervos(c)); en órganos (n=34: 12 gc, 3 gl, 19c), y en muestras de leche (n=2 gl). De todas las cepas aisladas y tipificadas por P.C.R. confirmadas por secuencia inserción IS900, 61 cepas han sido tipificadas por R.F.L.P.

4.6. PATOGENIA

4.6.1. Transmisión. Sweeney⁵⁶ señala, la transmisión del ternero se produce poco después del nacimiento, por la ingestión del excremento de vacas contaminadas, este es el método más importante de transmisión. La severidad y la dimensión de la enfermedad son dependientes a la cantidad de microorganismos en la exposición y la edad del animal. Sólo una dosis pequeña puede requerir para establecer la infección en un ternero recién nacido, y es probable la resistencia relacionada con la edad, al introducir una dosis alta de microorganismos a una vaca adulta.

La vía más común de contagio es la que ocurre de la madre a su ternero, por los gérmenes presentes en la ubre. Los animales mayores de 12 meses pueden contraer la enfermedad del suelo contaminado. Tim Jessep⁵⁷ explica, en algunos terneros hay la posibilidad de nacer contagiados. Por el riesgo de la enfermedad (antes, como también después de nacido) toda progenie de vacas afectadas tiene una probabilidad alta de infección. La leche es también considerada un riesgo. La inseminación artificial y la transferencia de embriones son consideradas como fuentes de contaminación de bajo riesgo. La forma más común de contagio en las granjas, es tener un animal subclínicamente afectado.

Franklyn Garry⁵⁸ asegura, el microorganismo parece encontrarse del 20 – 40% en terneros de vacas que presentan signos clínicos y el 10% en terneros de vacas que no presentan signos. Además, la bacteria puede diseminarse directamente en la leche y el calostro de vacas infectadas, aun sin contaminación fecal.

⁵⁵ PAOLICCHI, Op. cit., <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst7_p1.htm>

⁵⁶ SWEENEY R.W. Transmission of paratuberculosis. PUBMED [online]. Julio 1996. [Junio 10 de 2004]. <http://cmr.asm.org/cgi/external_ref?access_num=8828107&link_type=MED>

⁵⁷ JESSEP, Op. cit., <<http://www.agric.nsw.gov.au/reader/bjd/dai51.htm#Spread>>

⁵⁸ GARRY, Op. cit., <http://www.aphis.usda.gov/vs/ceah/cahm/Dairy_Cattle/johnsart.htm>

El calostro materno infectado con M.A.P. contribuye con la transmisión en granjas de producción lechera. Quigley⁵⁹ argumenta, la pasteurización no es una opción viable ya que esto reduce las IgG calostrales y no elimina el microorganismo. Las fuentes de IgG exógenas son la leche, calostro, sangre y huevos, que son los ingredientes en los suplementos calostrales disponibles en el mercado. Sin embargo los productos corrientes suministran insuficientes IgG para reemplazar el calostro maternal.

Un asunto muy importante es la posibilidad de que el feto pueda contaminarse en el útero si la madre está en las fases más avanzadas. Don Hansen y Christine Rossiter⁶⁰ manifiestan que los estudios han mostrado lo siguiente, madres en las fases III y IV, los fetos en útero se infectaron del 8% al 40%. Los fetos pueden ser abortados o nacer y no presentar su afección hasta que sean adultos. No se conoce cómo las infecciones en útero afectan las pruebas de diagnóstico en estos animales que sobreviven. El riesgo del feto es bajo en las madres en las fases I y II.

Los doctores anteriores dan un margen más amplio mientras que la doctora Lisa Williamson⁶¹ menciona, al menos el 25% de las vacas infectadas diseminan por vía transplacentaria a los fetos. Los toros infectados diseminan microorganismos en el semen, pero la transmisión sexual no ha sido probada.

Y para complementar, Graeme⁶² afirma, es un microorganismo de crecimiento lento, de hecho, uno de los crecimientos más lento entre las bacterias. Puede tomar años para que la infección ocurra a través del estiércol. Mucho ganado infectado no disemina cantidades razonables de bacterias en el estiércol hasta después de los 2 años.

⁵⁹ QUIGLEY, JD. KOST, CJ. WOLFE, TA. Absorption of IgG in calves fed colostrum replacer products derived from bovine. International Association for Paratuberculosis [online]. 11 – 14 junio 2002. [Mayo 11 de 2004]. <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst7_o17.htm>

⁶⁰ HANSEN, Don y ROSSITER, Christine. "Clinical Description and Epidemiology of Johne's Disease in Cattle". Vetmed [online]. Estados Unidos: 13 marzo 2004. [marzo 3 de 2004]. <<http://www.vetmed.wsu.edu/courses-jmgay/JDPArticle1.htm>>

⁶¹ WILLIAMSON, Lisa. Adult Ruminant Diarrhea. Vet [online]. [23 enero 2004]. <[http://lam.vet.uga.edu/LAM/LM000155.HTML#Johnes%20Disease%20\(Paratuberculosis\)](http://lam.vet.uga.edu/LAM/LM000155.HTML#Johnes%20Disease%20(Paratuberculosis))>

⁶² EAMENS, Op. cit., p. <<http://www.agric.nsw.gov.au/reader/bjd/dai89.htm#difficult>>

4.6.2. Infección. WhitLock⁶³ define 4 fases de infección:

- Fase 1, infección silenciosa (terneros, novillas y ganado joven de 2 años de edad). Mucho ganado se infecta cuando es ternero, el microorganismo prolifera lentamente en la mucosa del ileon y nódulos linfáticos regionales y pueden rara vez ser detectados con las pruebas de laboratorio sensibles como cultivo fecal. No podría detectarse en la examinación microscópica de tejidos obtenidos postmortem, pero son detectables en cultivos de tejidos.
- Fase 2, adultos portadores inaparentes. Estos no tienen diarrea pero tienen anticuerpos detectables y/o una respuesta inmune alterada y podrían estar propensos a otras enfermedades, tales como mastitis e infertilidad. Muchos de estos animales tienen hallazgos de cultivos fecales negativos por técnicas corrientes, el microorganismo podría ir en el estiércol que contamina el medio ambiente y es una amenaza a otros animales en el hato.
- Fase 3, enfermedad clínica. En esta fase los animales pierden peso y presentan diarrea, tienen aun apetito, pero la sed aumenta, por pocas semanas se presenta diarrea intermitente. Los signos vitales permanecen estables. Se desarrolla gradualmente emaciación y caquexia, disminuye la producción láctea. Muchos tienen cultivos fecales con resultados positivos y elevados anticuerpos detectados por prueba de Elisa y prueba de Inmunodifusión Agar Gel.
- Fase 4, enfermedad clínica avanzada. Los animales están débiles, emaciados y generalmente tienen diarrea profusa, edema intermandibular o mandíbula embotellada, característico en esta fase. Puede presentarse que de una fase 2 pase a fase 4. Muchos pasan a matadero y no podrían ser aptos al consumo humano, la muerte ocurre debido a la caquexia y la deshidratación.

Para que ocurra la infección, los animales jóvenes ingieren el M.A.P., este pasa hacia delante del tracto intestinal hasta alcanzar la parte más baja del intestino delgado (el ileón). Collins⁶⁴ argumenta, la pared del ileón contiene un número

⁶³ BRADFORD, P. Smith y WHITLOCK, Robert. Large animal internal medicine. 2ed. St. Louis: Mosby, 1996 p. 902.

⁶⁴ Johne's Information Center. Op. cit., <<http://www.johnes.org/dairy/pathology.html#infection>>

grande de bolsas de tejido linfoide conocidas como las placas de Peyer, como se muestra en la figura 9, que simplemente quedan bajo la superficie interior del intestino. La concentración más alta de placas de Peyer está en el ileón terminal y es por esta razón anatómica, que la infección empieza aquí.

Figura 9. Placas de Peyer.



Fuente : <http://www.johnes.org/dairy/pathology.html#infection>

La mucosa del tracto gastrointestinal tiene un sistema inmune local bien desarrollado, el tejido linfoide intestino asociado (GALT). Los mayores componentes del GALT son las placas de Peyer. Estas consisten en folículos, cortezas con una cubierta de epitelio folículo asociado (FAE), y las áreas interfoliculares en la submucosa. Sigurðardóttir⁶⁵ argumenta, el FAE incluye células altamente especializadas, las células membranosas (M). Aparte de las células M, hay números variables de células epiteliales columnares, células de la copa ocasionales, y linfocitos. Las células M tienen microvellocidades o micropliegues en su superficie apical, y se adhieren a las células adyacentes por las uniones firmes y desmosomas. La membrana basolateral es invaginada, formando una bolsa (un espacio extracelular) conteniendo leucocitos. Las células M son importantes en prueba de antígeno y el transporte a las células inmunocompetentes del tejido linfoide subyacente. Las bacterias ganan acceso al compartimiento subepitelial de la pared intestinal por vía de transporte transcelular o paracelular por las células M. Este estudio indica que en las crías de las cabras, el microorganismo entra en la pared intestinal principalmente a través de las células M en el epitelio folículo-asociado de las placas del Peyer.

⁶⁵ SIGURÐARDÓTTIR, Ó. G. PRESS, C. M. y EVENSEN. Ø. Uptake of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* through the Distal Small Intestinal Mucosa in Goats: An Ultrastructural Study. *Veterinary pathology* [online]. 2001. [Junio 23 de 2004]. <<http://www.vetpathology.org/cgi/content/full/38/2/184#top>>

Lugton⁶⁶ anuncia, las micobacterias patogénicas, incluyendo las que causan tuberculosis y paratuberculosis, pasan las barreras de la mucosa por endocitosis dentro de los sitios linfoepiteliales. Estos sitios de entrada normalmente incluyen la orofaringe, tonsilas nasofaríngeas y las placas de Peyer. Los bacilos descargados en la superficie basolateral de las células M epiteliales sumergidas son absorbidas por las células profesionales asociadas antígeno-presentes con los linfocitos T del área parafolicular. Las células dendríticas y los macrófagos permiten la replicación micobacterial en estos sitios, debido al ambiente inmunológico permisivo en los tejidos linfoepiteliales. La anulación de reacciones de hipersensibilidad retardada de tipo local generalmente asegura continuar la integridad y función de estos tejidos. Los fagocitos que contienen micobacterias intracelulares, diseminan la infección a otras partes del cuerpo y probablemente también emigren hacia atrás en la superficie de la mucosa para verter los bacilos.

Se entiende poco los mecanismos involucrados en la patogénesis de la enfermedad. A esto, Homuth⁶⁷ dice, se ha propuesto que el M.A.P. invade el intestino delgado a través de las células M del epitelio de la corteza y luego entra en los macrófagos residentes y monocitos sanguíneos.

Mamotani⁶⁸ inoculó el M.A.P. vivo y muerto al calor, en los sinusoides ileales de terneros y se examinó por microscopía electrónica. En las 5 horas después de la inoculación, los bacilos ácido-resistentes estuvieron en los macrófagos subepiteliales, pero no en las células M que cubren las cápsulas. A las 20 horas, más de 50 bacilos ácido-resistentes por la sección cruzada estaban en los macrófagos epiteliales en las cápsulas. Tanto los bacilos vivos como los muertos en calor entraron en las cápsulas. La suma del suero bovino anti-M. paratuberculosis para la inoculación reforzó la entrada de las bacterias en las cápsulas. Por microscopía electrónica, a las 20 horas los bacilos intactos con las zonas electro-transparentes (espacios peribacilares) estaban en el citoplasma supranuclear de las células M. Las células M también contuvieron vacuolas, incluyendo el material electro-denso interpretado como el bacilo degradado. Los macrófagos

⁶⁶ LUGTON, I. Mucosa-associated lymphoid tissues as sites for uptake, carriage and excretion of tubercle bacilli and other pathogenic mycobacteria. PUBMED [online]. Agosto 1999. [Junio 10 de 2004]. <http://cmr.asm.org/cgi/external_ref?access_num=10457205&link_type=MED>

⁶⁷ HOMUTH, Matthias. VALENTIN-WEIGAND, Peter. ROHDE, M. y GERLACH, Gerald-F. Identification and Characterization of a Novel Extracellular Ferric Reductase from *Mycobacterium paratuberculosis*. Infection and Immunity [online]. Febrero 1998. [Marzo 19 de 2004]. <<http://iai.asm.org/cgi/content/full/66/2/710#Top>>

⁶⁸ MOMOTANI, E. WHIPPLE, D. L. THIERMANN, A. B. Y CHEVILLE, N. F. Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches in calves. PUBMED [online]. 1988. [Junio 10 de 2004]. <<http://cmr.asm.org/cgi/ijlink?linkType=ABST&journalCode=vetpath&resid=25/2/131>>

subepiteliales y intraepiteliales contuvieron bacilos y material bacteriano degradado en los fagosomas. Estos resultados sugieren que las células M ileales del ternero absorben los bacilos, y que los macrófagos subepiteliales e intraepiteliales secundariamente aceptan bacilos o bacterias debridadas que se expulsan de las células M.

La fibronectina (FN) de unión se requiere para la adherencia e internalización de varias micobacterias en las células epiteliales in vitro. Secott⁶⁹ sostiene, los diferentes enterocitos de las vellosidades, que restringen integrinas de expresión en su superficie basolateral, las células M despliegan integrinas a la densidad alta en su superficie apical. Muchos de estas integrinas de la superficie contienen los sitios de unión para la fibronectina. Una vez ligado el M.A.P., la FN podría colocar un puente de los microorganismos a las integrinas en la superficie de células M en el ileon terminal y podría facilitar su translocación por la barrera epitelial en las placas de Peyer. La unión del microorganismo a las células M y la subsiguiente translocación de germen por estas células al tejido inmune intestino-asociado son los pasos iniciales necesarios en el desarrollo de la paratuberculosis.

4.6.3. Multiplicación. Michael Collins⁷⁰ afirma, desafortunadamente para los terneros de ganado lechero, después de que las células M traen el M.A.P. a las placas de Peyer y ellas son abarcadas por los macrófagos, las bacterias se encuentran en una situación ideal. Los macrófagos no matan este tipo de bacterias por razones que sólo se entienden parcialmente. Las micobacterias, sin embargo, son uno de los pocos tipos de bacterias que pueden sobrevivir a los efectos antibacterianos de los macrófagos, pero realmente crecen y se multiplican dentro de ellos, siendo llamado patógeno bacteriano intracelular facultativo. La figura 10 indica al M.A.P. (rojo) dentro de los macrófagos (azul).

Consignado en el artículo de Bannantine⁷¹ y Stabel, se atribuye la supervivencia de la micobacteria patogénica al hecho de que el fagosoma micobacteriano no fusiona con los lisosomas. El desarrollo del germen se midió en las fases tempranas durante la infección de macrófagos no activados. El crecimiento se

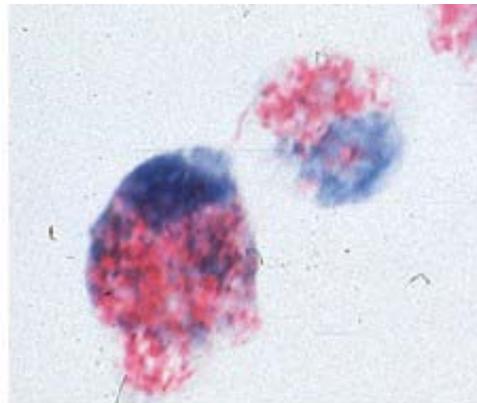
⁶⁹ SECOTT, T.E. LIN, T.L. WU, C.C. Fibronectin Attachment Protein Homologue Mediates Fibronectin Binding by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Infection and Immunity* [online]. Abril 2001. [Marzo 19 de 2004]. <<http://iai.asm.org/cgi/content/full/69/4/2075#Top>>

⁷⁰ Johnes's Information Center. Op. cit., <<http://www.johnes.org/dairy/pathology.html#multiplication>>

⁷¹ BANNANTINE, John P. y STABEL, Judith R. Killing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* within macrophages. *BioMed Central Microbiology* [online]. 30 enero de 2002. [Abril 8 de 2004]. <<http://www.biomedcentral.com/1471-2180/2/2#IDALCWQS>>

midió por el conteo de células bacterianas seguida de diluciones seriadas en las inclinaciones de HEYM. El conteo celular de tres experimentos independientes mostraron un declive lento en la viabilidad del microorganismo en 7 días. Después de la infección, una fase de crecimiento inicial ocurrió hasta las horas 24 postinfección de dónde el conteo micobacterial empezó a declinar. En dos de los tres experimentos, un aumento en el conteo bacterial ocurrió después de las 70 horas postinfección hasta las 95 horas dónde ocurrió un segundo declive en la micobacteria viable. Estos datos sugieren que el M.A.P. sobrevive más tiempo en los macrófagos que otros patógenos, incluyendo otras especies de micobacterias.

Figura 10. El *M. paratuberculosis* dentro de los macrófagos.

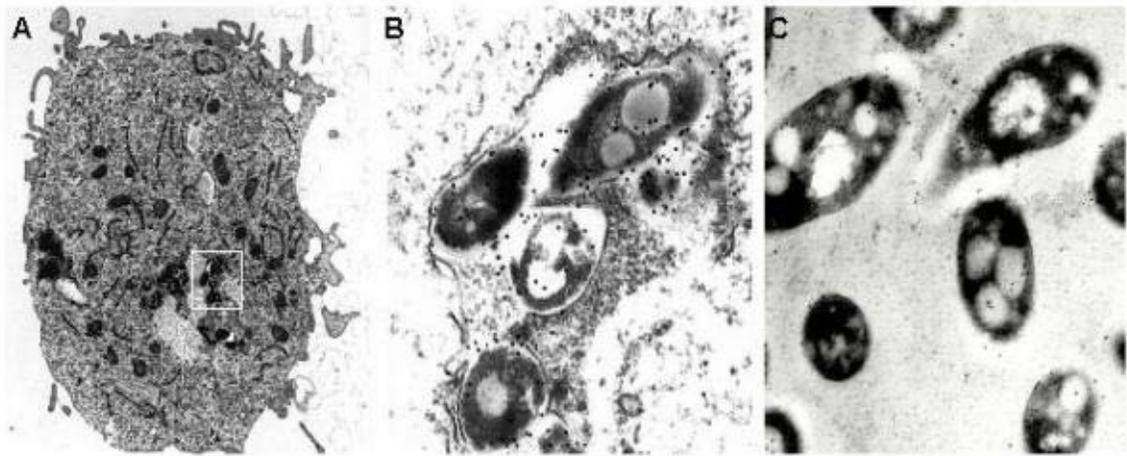


Fuente: <http://www.johnes.org/biology/general.html#4>

Bannantine⁷² explica en la figura 11, la marcación inmunogold del M.A.P. intracelular y extracelular. Un solo macrófago se muestra a las 48-h postinfección (A). (B) Un agrandamiento de la región encerrada en el cuadro de la figura A presentando la marcación inmunogold del M.A.P. intracelular. (C) La preparación del cultivo de M.A.P. en medio Middlebrook 7H9. La partícula dorada marcada se vio predominantemente en la periferia de las células micobacteriales. Magnificación: 11,180 × (A); 104,000 × (B); 88,400 × (C).

⁷² Ibid., <<http://www.biomedcentral.com/1471-2180/2/2#IDALCWQS>>

Figura 11. La marcación inmunogold del *M. paratuberculosis* intracelular y extracelular



Fuente : <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/2/2/figure/F2>

El éxito de estos patógenos depende principalmente de su capacidad para sobrevivir la ingestión de los macrófagos. Homuth⁷³ menciona, en este ambiente, el hierro juega un papel importante en el equilibrio entre la supervivencia micobacteriana y las estrategias de defensa del huésped, ya que no sólo sirve como un nutriente bacteriano esencial sino también como un cofactor para la producción de oxidantes antibacteriales como los radicales OH. La micobacteria sintetiza dos tipos de quelantes de hierro de alta afinidad (los sideróforos), las exoquelinas secretadas y la micobactina celular pared asociada. Sin embargo, es un interrogante el papel de estos sideróforos en la adquisición in vivo de los restos férricos. Las proteínas micobacteriales secretadas parecen jugar un papel importante en la interacción entre el macrófago del huésped y el parásito bacteriano. Se han descrito dos enzimas secretadas, la SOD y el catalasa-peroxidasa, su función es proteger la micobacteria contra los radicales de oxígeno antibacterianos dentro del macrófago. Por consiguiente, los autores informan de una nueva reductasa férrica extracelular de la micobacteria, que podría jugar un papel en la supervivencia bacteriana dentro de los macrófagos proporcionando hierro como un nutriente bacteriano esencial e interfiriendo simultáneamente con la producción de oxidantes antibacteriano.

El mecanismo de defensa potencial contra patógenos intracelulares es la apoptosis de células infectadas. Allen⁷⁴ et al. determinan, hay evidencia creciente

⁷³ HOMUTH, Matthias. Op. cit., <<http://iai.asm.org/cgi/content/full/66/2/710#Top>>

⁷⁴ ALLEN, Op. cit., <<http://cdli.asm.org/cgi/content/full/8/2/460#Text>>

que los monocitos y macrófagos pueden controlar el crecimiento micobacterial con esta estrategia. Los datos en el estudio presente demuestran que la exposición a la hormona de crecimiento bovina, no tuvo el efecto en los niveles de apoptosis en los monocitos bovinos infectados con el M.A.P., durante un periodo de incubación de 6 a 48 horas. En resumen, la apoptosis ocurre relativamente rápido (6 horas o menos) en monocitos bovinos infectados. Quizás la apoptosis refleja un esfuerzo rápido de los fagocitos mononucleares bovinos de librarse de esta bacteria.

No deben confundirse los macrófagos epitelioides de la paratuberculosis leve con los macrófagos gigantes residentes del tracto intestinal y nódulos linfáticos asociados, que contienen gránulos amarillos o material cristalino en su citoplasma. Buergelt⁷⁵ et al. manifiesta, estos se distinguen fácilmente de las células epitelioides y las células gigantes debido al pigmento y por la observación no se demuestra la presencia de microorganismos ácido-resistentes. El citoplasma de estos macrófagos residentes constantemente presentan un color azul profundo con la tinción ácido-resistente, sugiriendo actividad metabólica. Probablemente la capacidad combinada de macrófagos epitelioides activados y células gigantes que destruyen los microbios micobacteriales fagocitados en las fases tempranas, no se tiñen con la tinción ácido-alcohol resistente. Alternativamente, los bacilos pueden transformarse a un estado de esferoblastos o pueden degradarse completamente. Así, el diagnóstico de paratuberculosis no se confirmará en muchos de los casos leves, y en cambio los animales infectados se categorizarán como sospechosos.

4.6.4. Estados iniciales de infección. Stabel⁷⁶ relata, el microorganismo obtiene una respuesta celular mediada por el huésped que puede ser caracterizada por hipersensibilidad retardada tipo IV, las respuestas proliferativas de los linfocitos para la mitogénesis, producción de citoquinas por linfocitos T estimulados. Mientras las enfermedades progresan de la fase subclínica a la clínica, disminuye la respuesta inmunocelular mediada, y predomina una fuerte respuesta humoral. La presencia del anticuerpo no protege al huésped contra la enfermedad; de hecho, la inmunidad celular mediada activa parece ser esencial para mantener la infección en restricción. Durante las fases finales de enfermedad, puede resultar la falta de una respuesta inmunocelular mediada antígeno específica, permitiendo la diseminación rápida de la infección a lo largo del huésped.

⁷⁵ BUERGELT, Op. cit., <<http://www.vetpathology.org/cgi/content/full/37/5/428#top>>

⁷⁶ STABEL, Op. cit., <<http://jds.fass.org/cgi/reprint/81/1/283.pdf>>

Manning⁷⁷ anuncia, los linfocitos liberan una variedad de señales químicas, llamadas citoquinas, en un esfuerzo por aumentar el poder de muerte bacteriana de los macrófagos y reclutar más células para luchar contra la infección.

La asociación de pediatría de España explica:

Las citoquinas son moléculas liberadas por diversas células que participan en la activación de otras células; con ello el organismo dispone, en un tiempo mínimo, de muchas células en disposición de reaccionar. Se denominó interleuquina (IL) a las citoquinas que actúan entre células leucocitarias, aunque luego se observó que estas interacciones eran mucho más amplias, quedando superado este concepto. Las acciones de la interleuquinas son muy redundantes, participando generalmente varias, así como otras que inhiben su acción. Los receptores de las interleuquinas son parecidos y algunos comparten cadenas idénticas. Tienen una vida media corta y actúan sobre células muy próximas por lo que sus acciones repercuten poco sobre los valores plasmáticos. El factor necrótico tumoral alfa (TNF α) y otras interleuquinas, como la IL-1 o IL-6, se liberan inmediatamente después de una agresión y se consideran "proinflamatorias", mientras que otras (IL-10, IL-13) tienen efecto contrario. La IL-2, sin ser exactamente proinflamatoria, facilita la proliferación de células, como linfocitos T, lo que explica la rápida respuesta del organismo ante una agresión⁷⁸.

Los macrófagos bovinos pueden inducir la liberación de interleuquina 1 (IL-1), IL-6, y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Beth Harris⁷⁹ informa, estas citoquinas también son asociadas con la formación de granulomas y caquexia en otros síndromes de la enfermedad. Las citoquinas parecen afectar la capacidad del M.A.P. para sobrevivir dentro de los macrófagos.

La IL-1 es un mediador importante de la inflamación y se ha implicado en varias formas de inmunopatología. La IL-1 recombinante produjo atrofia de las vellosidades, hiperplasia de las criptas y aumento en el conteo de linfocitos intraepiteliales en los ratones normales y estimuló la proliferación de una línea

⁷⁷ Johnes Information Center. Op. cit., <<http://www.johnes.org/dairy/pathology.html#early>>

⁷⁸ Bases de la respuesta inmunitaria. Asociación española de pediatría [online]. España: 7 marzo 2004. [Febrero 12 de 2004]. <<http://www.aeped.es/vacunas/pav/modulo1/03.html>>

⁷⁹ HARRIS, Op. cit., <http://cmr.asm.org/cgi/content/full/14/3/489#SEC3_2>

celular epitelial intestinal in vitro. Mowat⁸⁰ et al. comentan, proponen que la IL-1 juega un papel efector en la enteropatía inmunológicamente mediada, sí por los efectos directos en las células epiteliales o una acción secundaria en otras, las células estromales en la mucosa.

Los mamíferos restringen el suministro férrico a los patógenos bacterianos. Harris y Barletta⁸¹ adicionan, las citoquinas pueden funcionar, causando que los macrófago limiten activamente su concentración intracelular de hierro en un esfuerzo por restringir el crecimiento bacteriano. Los macrófagos regulan los receptores de transferrina, reduciendo los niveles férricos.

Poco se conoce sobre la capacidad de los macrófagos bovinos infectados de generar una respuesta inmune. Weiss⁸² et al. informan, en sus estudios anteriores han mostrado que los macrófagos bovinos infectados con M.A.P. están regulados bajo la expresión de moléculas de complejo mayor de histocompatibilidad clase I y clase II dentro de las 12 a 24 horas después de la infección y esa expresión no se aumenta por la incubación subsiguiente con interferon gamma (IFN- γ). Por consiguiente, los macrófagos infectados no pueden presentar el antígeno eficazmente a los linfocitos. El TNF- α es un activador mayor de respuestas inflamatorias e inmunes y es importante en la formación de granulomas e iniciación de una respuesta inmune protectora en las infecciones micobacteriales. Alternativamente, la IL-10 es una citoquina anti-inflamatoria y anti-inmune. La IL-10 se ha presentado para inhibir la activación del macrófago, la secreción de la citoquina, actividad microbicida, y diferenciación a las células dendríticas. El efecto de la IL-10 es mediado en parte a través de la inhibición de la producción de TNF- α y la IL-12 por los macrófago y la inhibición de la expresión de IFN- γ por los linfocitos T.

⁸⁰ MOWAT, A.M. HUTTON, A.K. GARSIDE, P. STEEL, M. A role for interleukin-1 alpha in immunologically mediated intestinal pathology. PUBMED [online]. Septiembre 1993. [Junio 10 de 2004]. <http://cmr.asm.org/cgi/external_ref?access_num=8244450&link_type=MED>

⁸¹ HARRIS, Op. cit., <http://cmr.asm.org/cgi/content/full/14/3/489#SEC3_3>

⁸² WEISS, Douglas J. EVANSON, Oral A. MORITZ, Andreas, DENG, Ming Qi. y ABRAHAMSEN, Mitchell S. Differential Responses of Bovine Macrophages to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. Infection and Immunity [online]. Octubre 2002. [Marzo 19 de 2004]. <<http://iai.asm.org/cgi/content/full/70/10/5556#top>>

Estas citoquinas, producirán atrofia muscular, emaciación, alopecia, disturbios renales y leucopenia. La doctora Amelia Bernardelli⁸³ comenta, esta sintomatología ocurre en los primeros estadios de la enfermedad; con el transcurso del tiempo, deberá coexistir con la inmunidad humoral, liberación de inmunoglobulinas (IgG) y consecuentemente edema, lagrimación y procesos diarreicos.

Weiss⁸⁴ detalla, los microorganismos de M.A.P. son sensibles al óxido nítrico, pero la cantidad de óxido nítrico producido por los macrófagos bovinos es mucho menor de lo necesitado para la muerte eficaz. El pretratamiento con el interferon gamma (IFN- γ) o el factor granulocito-monocito colonia-estimulante (GM-CSF) restringió el crecimiento de microorganismo en los monocitos, pero no en los macrófagos monocitos-derivados. Estos datos indican que estos macrófagos bovinos tienen una capacidad limitada de matar y esa resistencia a la infección puede ser relacionada a la capacidad del macrófago de inducir una respuesta inmune eficaz.

Harris⁸⁵ manifiesta también que la Nramp1, una proteína de la membrana integral expresada exclusivamente en el compartimiento lisosomal de los monocitos y macrófagos, se han implicado en el control de la replicación micobacterial quitando hierro o cationes divalentes activamente del espacio fagosomal, disminuyendo la cantidad de hierro disponible a las bacterias intracelulares.

Después de la fagocitosis, la Nramp1 señala a la membrana fagosomal que contiene el microbio dónde puede modificar el entorno intrafagosomal para afectar la repetición microbiana. Canonne-hergaux⁸⁶ amplía, un segundo miembro de la familia de Nramp mamífero, la Nramp2, fue descubierta y mostrada para ser deformado en modelos animales de deficiencia férrica. La proteína de Nramp2 fue mostrada para ser el sistema de mayor captación de hierro transferrina-independiente del sistema del intestino. Los resultados en la investigación sugirieron que el Nramp1 puede controlar la replicación intracelular microbiana quitando activamente el hierro u otro catión divalente del espacio fagosomal.

⁸³ BERNARDELLI, Amelia. y RODRÍGUEZ Toledo, Jorge. Manual de Procedimiento Técnico - Diagnóstico de Paratuberculosis. Asociacio Argentina de Veterinaria de Laboratorio de Diagnóstico [online]. 2000. [Marzo 19 de 2004]. <<http://www.aavld.org.ar/paratub.pdf>>

⁸⁴ WEISS, Op. cit., <<http://iai.asm.org/cgi/content/full/70/10/5556#top>>

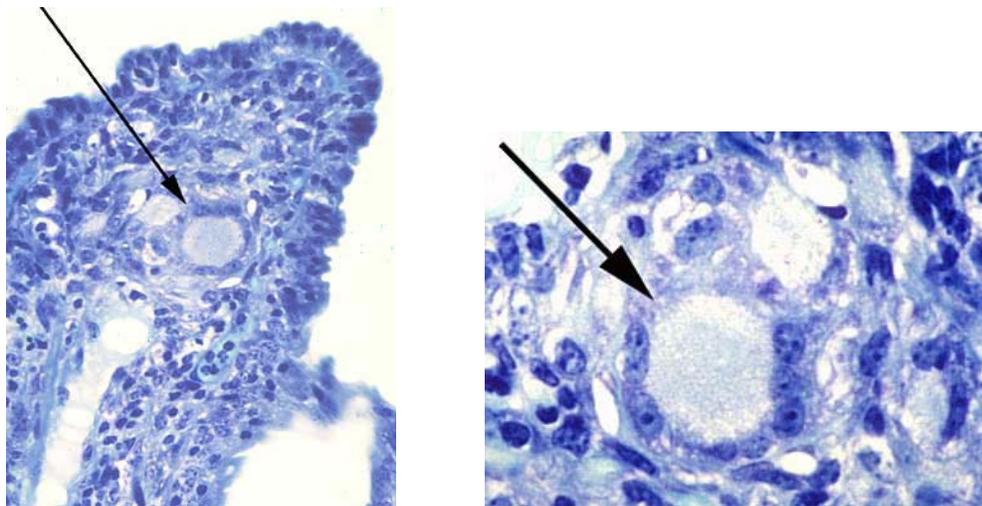
⁸⁵ HARRIS, Op. cit., <http://cmr.asm.org/cgi/content/full/14/3/489#SEC3_3>

⁸⁶ CANONNE-HERGAUX, F. GRUENHEID, S. GOVONI, G. GROS, P. The Nramp1 protein and its role in resistance to infection and macrophage function. PUBMED [online]. Julio 1999. [Junio 10 de 2004]. <http://cmr.asm.org/cgi/external_ref?access_num=10417735&link_type=MED>

Los restos de hierro en el ambiente limitante, la mayoría de las especies micobacteriales producen sideróforos lipidosolubles como la micobactina y sideróforos hidrosolubles como las exoquelinas. Ya que el M.A.P. es una micobactina autotrofa, sólo puede sintetizar exoquelina. Barletta⁸⁷ comenta, estos sideróforos parecen ser pertinentes en la patogenicidad de la micobacteria. Cómo el microorganismo sobrevive intracelularmente cuando produce sólo exoquelinas es incierto.

Elizabeth Manning⁸⁸ describe que los macrófago se fusionan, como se presenta en la figura 12, esto hace que se formen grandes células multi-nucleadas presentadas en la figura 13, llamadas células gigantes, en un aparente esfuerzo para matar la micobacteria..

Figura 12. Infiltrado de macrófagos y linfocitos.

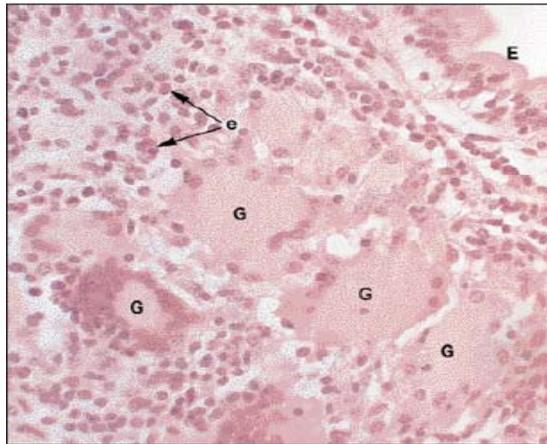


Fuente: <http://www.johnes.org/general/pathology.html#inflammation>

⁸⁷ HARRIS, Op. cit., <http://cmr.asm.org/cgi/content/full/14/3/489#SEC3_3>

⁸⁸ Johne's Information Center. Op. cit., <<http://www.johnes.org/dairy/pathology.html#early>>

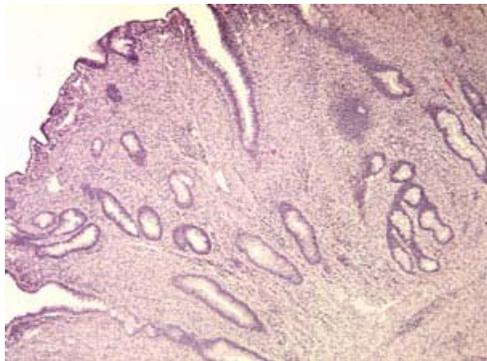
Figura 13. Fotomicrografía de una sección de intestino de una vaca con enfermedad de Johne.



Fuente: <http://www.johnes.org/handouts/files/CollinsIrishVetJournal2.pdf>

4.6.5. Estado medio-tardío de infección. La infiltración de tejidos infectados con millones de linfocitos y macrófagos (figura 14) progresa en años permitiendo un intestino denso visible. Michael Collins⁸⁹ afirma, la superficie de la mucosa llega a ser en apariencia corrugada y granular. El ileon no es demasiado delgado y flexible, y no puede ser fácilmente extendido.

Figura 14. Ileón engrosado por infiltración con macrófagos y linfocitos.



fuentes: http://www.johnes.org/general/_Path_histo_ileum_H-E.html

⁸⁹ COLLINS, Michael. Update on paratuberculosis: 2. Pathology and diagnosis. En : Irish Veterinary Journal. Vol. 56, No. 13(diciembre. 2003); p. 619 - 620.

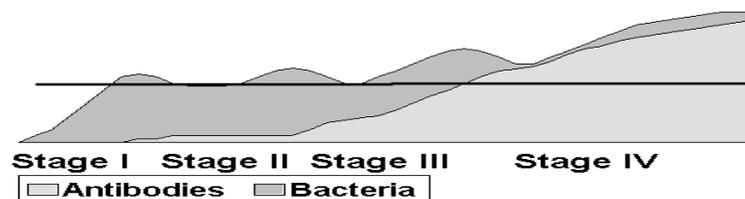
Lisa Williamson⁹⁰ precisa, la respuesta inflamatoria progresiva invade la lámina propia, causando pérdida de fluido rico en proteína en el lumen intestinal y malabsorción de nutrientes.

La superficie serosa del ileon puede continuar con vasos linfáticos engrosados y dilatados. Collins⁹¹ aporta diciendo, estos vasos claramente visibles han engrosado las paredes y están congestionadas con linfocitos, un fenómeno llamado Cordones engrosados.

Además, el M.A.P. en el ganado infectado es transportado por la linfa en los macrófagos. Los nódulos linfáticos filtran y matan las bacterias, sirviendo como la segunda línea de defensa contra la enfermedad después de la pared intestinal. Manning⁹² sostiene, como en las placas de Peyer, en los nódulos linfáticos no es alterado por los abundantes macrófagos y continúa multiplicándose.

4.6.6. Estado terminal de la infección. Manning⁹³ expone, en las últimas fases, el animal empieza a producir anticuerpos una proteína inmune que circula en la sangre, como lo podemos observar en el figura 15. Mientras protege para otras enfermedades, el anticuerpo no proporciona protección contra la multiplicación del M.A.P.

Figura 15. Presentación hipotética del M. paratuberculosis y los anticuerpos.



Fuente: <http://www.vetmed.wsu.edu/courses-jmgay/JDPArticle1.htm>

⁹⁰ WILLIAMSON, Lisa. Op. cit., <[http://lam.vet.uga.edu/LAM/LM000155.HTML#Johnes%20Disease%20\(Paratuberculosis\)](http://lam.vet.uga.edu/LAM/LM000155.HTML#Johnes%20Disease%20(Paratuberculosis))>

⁹¹ COLLINS, Op. cit., p. 620.

⁹² Johne's Information Center. Op. cit., <<http://www.johnes.org/dairy/pathology.html#mid>>

⁹³ Ibid., <<http://www.johnes.org/dairy/pathology.html#terminal>>

Y la doctora⁹⁴ Manning complementa explicando que no es conocido como ocurre la recuperación espontánea de la infección. Parece que la mayoría de las infecciones avanzan despacio e inevitablemente hasta que el animal muere de la patología inducida en el intestino. El curso de la enfermedad puede tomar tanto tiempo que algunos animales mueren de otras causas. Durante este estado de bacteremia, la respuesta mínima del tejido a estas bacterias se ve y se piensa que el sistema inmunológico del animal ha cerrado esencialmente y no es capaz de responder a la infección. En las fases terminales, normalmente después de años de desarrollo, el suficiente daño ocurrido en el intestino causan que el animal presente signos de diarrea o pérdida de peso. En esta última fase el intestino normalmente se engrosa y los nódulos linfáticos regionales están inflamados y pálidos.

Cuando el ileon se engrosa por inflamación granulomatosa, el animal desarrolla una enteropatía pérdida-proteína (protein-losing enteropathy). Collins⁹⁵ indica en su artículo, presentará diarrea, daño en la absorción de proteína, y depleción de la proteína corporal. En particular, hay una marcada hipoalbuminemia, que daña la capacidad del animal de retener líquidos dentro de la vasculatura permitiendo el edema, que puede ser más notable en la región submandibular como “quijada de botella”.

4.7. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Rebeca Arnott⁹⁶ dice, los síntomas son: una diarrea crónica que resulta en una pérdida severa de peso y eventualmente la muerte. La enfermedad tiene un largo periodo de incubación (1–15 años), así que los animales adultos, generalmente mayores de 3 años presentan los signos clínicos.

Jessep⁹⁷ expresa las características de la enfermedad:

- Largo periodo de incubación antes de presentar signos – de 12 meses a 15 años (en muchos casos, de 3-5 años). También toma un amplio tiempo

⁹⁴ Ibid ., <http://www.johnes.org/dairy/pathology.html#terminal>>

⁹⁵ COLLINS, Op. cit., p. 619 – 624.

⁹⁶ ARNOTT, Op. cit., <<http://www.agric.nsw.gov.au/reader/bjd/dai90.htm#disease>>

⁹⁷ JESSEP, Op. cit., <<http://www.agric.nsw.gov.au/reader/bjd/dai51.htm#Features>>

para que un animal infectado como ternero se presente positivo utilizando las pruebas corrientes.

- Baja en la producción de leche.
- Diarrea que puede ser aguda, crónica o intermitente.
- Pérdida de peso en ganado. (Figuras 16 y 17).
- Emaciación.
- Eventual muerte.
- Pueden presentarse varios casos por año – mayor del 4% en hatos severamente afectados.
- Puede ocurrir la disminución de la producción en un 5 al 10%

Figura 16. vaca con cuadro clínico de paratuberculosis.



Fuente: http://www.johnes.org/general/_Holstein_front.html

Figura 17. vaca con cuadro clínico de paratuberculosis.



Fuente: http://www.johnes.org/general/_Guernsey_rear.html

Cuando el ileón se engrosa por la inflamación granulomatosa, ocurre diarrea y una condición conocida como enteropatía con pérdida de proteína (es decir la absorción de proteína está deteriorada y un exceso de proteína se pierde en las heces). Michael Collins⁹⁸ menciona, la hipoalbuminemia daña la capacidad del animal para retener los fluidos dentro de la vasculatura (vasos sanguíneos) llevando a una filtración a los tejidos (edema). En el ganado bovino esto es muy notable en la región del submandibular: una condición llamada "mandíbula de botella" (figura 18).

Figura 18. Condición llamada "mandíbula de botella"



Fuente: <http://www.johnes.org/beef/pathology.html#terminal>

Debe darse énfasis a que, debido a la naturaleza lenta progresiva de la infección, no pueden verse signos de la enfermedad de Johne hasta años después de la infección inicial. El ganado afectado generalmente no tiene fiebre. Pueden confundirse los signos de esta enfermedad fácilmente con otras enfermedades. Hassen⁹⁹ menciona, el desarrollo de signos notables puede ocurrir con eventos de estrés como el parto, cambios de alimento, la reubicación, etc. Hay algunos datos que sugieren que las fases subclínicas pueden producir un declive en la rendimiento, sobre todo en la producción de leche en la última lactancia antes de ser desechado.

⁹⁸ Johne's Information Center, Op. cit., <<http://www.johnes.org/beef/pathology.html#terminal>>

⁹⁹ HASSEN, Op. cit., <<http://www.vetmed.wsu.edu/courses-jmgay/JDPArticle1.htm>>

Mercado¹⁰⁰ afirma, en las hembras provoca un descenso en la producción láctea que va del 5 al 25% en los estadíos tempranos, desde la primera lactancia y acorta su vida productiva media.

Una asociación directa entre las lesiones remotas y la infección intestinal se mostró por el aislamiento del microorganismo en el tejido renal, por la detección del antígeno(s), utilizando el método indirecto de inmunoperoxidasa, y por la característica natural del granuloma en las lesiones. Hines¹⁰¹ et al. comenta, este caso ilustra el potencial para las lesiones extra-intestinales en la infección en el ganado lechero.

Ollis¹⁰² anuncia que menos del 5% de los animales infectados desarrolla los signos clínicos. La razón es desconocida. Los animales infectados sin signos clínicos, actúan como animales portadores y son una fuente de infección al medio ambiente de la granja. Los animales menores de 2 a 3 años rara vez desarrollan signos clínicos. Animales infectados podrían presentar diarrea intermitente que luego pasa a ser frecuente. Otros animales repentinamente desarrollan diarrea, que persisten hasta la muerte. En ovejas y cabras el signo principal de la enfermedad es al pérdida de peso sin diarrea.

4.8. PATOLOGÍA CLÍNICA

Manning¹⁰³ expresa, en la figura 19 se muestra la lesión clásica de la paratuberculosis, engrosado por la respuesta granulomatosa inflamatoria crónica a las bacterias en la submucosa del intestino, el ileón se vuelve el disfuncional. Las vacas con este grado de patología tendrán la diarrea típica y estarán delgadas, pero no tendrán fiebre, estarán comiendo bien, y en general parecen sentirse bien.

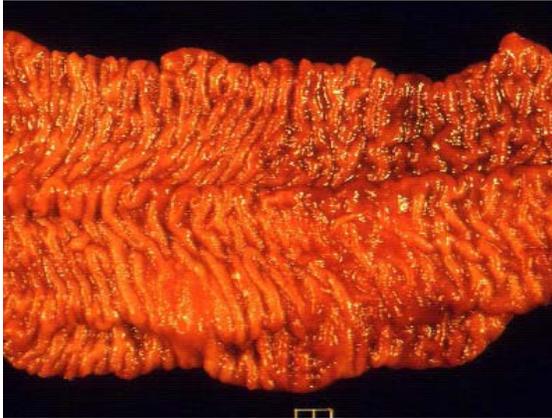
¹⁰⁰ MERCADO, Op. cit., <<http://www.unne.edu.ar/cyt/2002/04-Veterinarias/V-059.pdf>>

¹⁰¹ HINES, S.A. BUERGELT, C.D. WILSON, J.H. BLISS, E.L. Disseminated Mycobacterium paratuberculosis infection in a cow. PUBMED [online]. 15 marzo 1987. [Junio 10 de 2004]. <http://cmr.asm.org/cgi/external_ref?access_num=3553118&link_type=MED>

¹⁰² OLLIS, Op. cit., <[http://www1.agric.gov.ab.ca/\\$department/deptdocs.nsf/all/agdex742#Signs](http://www1.agric.gov.ab.ca/$department/deptdocs.nsf/all/agdex742#Signs)>

¹⁰³ Johnes Information Center. Op. cit., <http://www.johnes.org/general/_Path_heifer_13_grss_ileum.html>

Figura 19. Mucosa del ileon con paratuberculosis.



Fuente: http://www.johnes.org/general/_Path_heifer_13_grss_ileum.html

Jubb asegura, “hay que tener en cuenta que la enfermedad de Johne, en los casos avanzados, los animales se encuentran emaciados, con atrofia gelatinosa de los depósitos de grasa, edema intermandibular y efusión serosa en las cavidades del cuerpo”¹⁰⁴.

Collins¹⁰⁵ complementa diciendo que la superficie de la mucosa llega a ser de apariencia corrugada y granular. El ileón no está delgado y flexible, y no puede estirarse fácilmente. Figura 20.

Figura 20. Intestino delgado de una vaca con paratuberculosis.



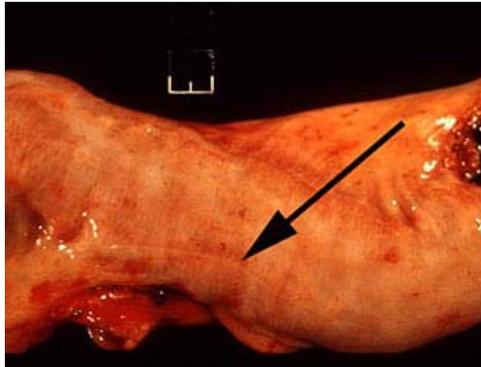
Fuente: http://www.johnes.org/dairy/_Pathgrossileum.html

¹⁰⁴ JUBB, K.V.F. KENNEDY, Peter C. Y PALMER, Níger. Patología de los animales domésticos. 3ed. Montevideo: Agropecuario hemisferio Sur S.R.L. 1990. p. 187.

¹⁰⁵ Johne’s Information Center. Op. cit., < <http://www.johnes.org/dairy/pathology.html#mid>>

La superficie del ileón de un bovino infectado puede presentar linfangitis, como se puede ver en la figura 21, donde encontramos los vasos linfáticos dilatados y aumentados de tamaño, ya que se bloquean y se llenan, lo cual se ha denominado cordones engrosados y Collins¹⁰⁶ asegura, este es un indicativo de la enfermedad de Johne.

Figura 21. Linfangitis en el ileón del bovino.



Fuente: http://www.johnes.org/general/_Path_gross_ileum_cording.html

El mismo autor¹⁰⁷ adiciona, la superficie serosa (exterior) del ileón puede continuar con vasos linfáticos engrosados y dilatados (figura 22). La fotografía mostrada aquí se tomó por el patólogo veterinario Dr. A.J. Cooley. Muestra tanto la superficie de la mucosa intestinal arrugada (interior) así como la superficie de la serosa (exterior). La flecha apunta a un vaso de la linfa dilatado.

Figura 22. Cordones engrosados.

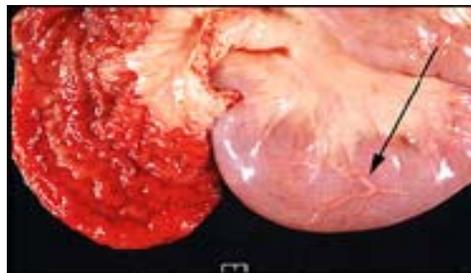


Photo by A.J. Cooley

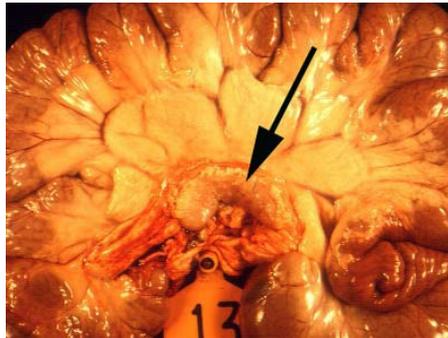
Fuente: <http://www.johnes.org/dairy/pathology.html#mid>

¹⁰⁶ Ibid., <http://www.johnes.org/general/_Path_gross_ileum_cording.html>

¹⁰⁷ Ibid., <<http://www.johnes.org/dairy/pathology.html#mid>>

“En los nódulos linfáticos también se producen lesiones específicas similares a las que aparecen en el intestino. En las etapas tempranas, el seno subcapsular está infiltrado laxamente con células epitelioides. Las infiltraciones son progresivas, formando áreas foliculares o difusas, de células epitelioides y gigantes, las cuales pueden en definitiva, reemplazar una buena parte de la corteza”¹⁰⁸, sostiene en este caso Jubb en la figura 23.

Figura 23. Nódulos linfáticos.



Fuente: http://www.johnes.org/general/_Path_heifer_gross.html

Además Jubb¹⁰⁹ complementa diciendo que los nódulos mesentéricos están siempre agrandados, en particular el ileocecal y a veces son notables y pálidos, hay muy poca distinción corticomedular, y edematosos, especialmente en la médula. Como podemos observar en la figura 24.

Figura 24. Ganglios linfáticos de bovinos con paratuberculosis.



Fuente: <http://www.exopol.com/atlas/bovino3.php?ref=326>

¹⁰⁸ JUBB, Op. cit., p. 189.

¹⁰⁹ Ibid., p. 189.

Un aumento significativo en la incidencia de lesiones caseosas en los nódulos linfáticos de cerdos en matadero, impulsó a Ruud Komijn¹¹⁰ et al. a realizar una investigación de gran escala en cinco mataderos en los Países Bajos. En total, 158.763 cerdos de 2.899 grupos experimentaron un exhaustivo examen. Por lo menos un cerdo se observó con las lesiones caseosas en los nódulos linfáticos submaxilares y mesentéricos en 154 grupos de los 2.899 examinados (5%). En total, 856 cerdos (0.5%) fueron afectados. No menos de cinco cerdos en 141 grupos de los 154 positivos (91.5%) tenía las lesiones en nódulos linfáticos.

Elizabeth Manning¹¹¹ argumenta que además del tracto gastrointestinal la mayoría de órganos generalmente aparecen normales. Cuando la enfermedad de Johne avanza, los animales presentan una pérdida marcada de peso, en las capas de grasa que rodean el riñón, el corazón e incluso la médula ósea puede estar perdida completamente.

Así mismo Michael Collins¹¹² señala, durante la fase final de esta enfermedad, el M.A.P. puede diseminarse más allá del ileón y nódulos linfáticos. Por ejemplo, el microorganismo puede aislarse por el cultivo de muestras de tejido tomadas de los órganos como el hígado, bazo, glándula mamaria y útero de ganado. Las pruebas de diagnóstico normalmente descubren altos niveles de anticuerpo y poco a ninguna respuesta de la citoquinina gamma interferón a este estado de infección.

Esto es complementado con lo que expresa Elizabeth Manning¹¹³, un hallazgo particular en algún ganado con la enfermedad de Johne es la calcificación de las placas en la pared de la aorta. La figura 25, muestra este clásico, o patonogmónico, encontrado en la enfermedad de Johne. Esta fotografía excepcional se fue donada por el patólogo veterinario y el fotógrafo Dr. A.J. Cooley.

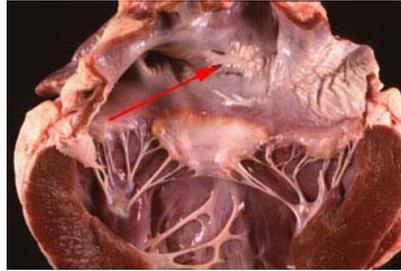
¹¹⁰ KOMIJN, Ruud E. De Haas, Petra E. W. SCHNEIDER, Margriet M. E. EGER, Tony. NIEUWENHUIJS, Jan H. M. VAN DEN HOEK, Remco J. BAKKER, Douwe. ZIJDERVELD, Fred G. Van. y SOOLINGEN, Dick van. Prevalence of Mycobacterium avium in Slaughter Pigs in The Netherlands and Comparison of IS1245 Restriction Fragment Length Polymorphism Patterns of Porcine and Human Isolates. Journal of Clinical Microbiology [online]. Mayo 1999. [Marzo 3 2004]. <<http://jcm.asm.org/cgi/content/full/37/5/1254#Top>>

¹¹¹ Johne's Information Center. Op. cit., <<http://www.johnes.org/beef/pathology.html#mid>>

¹¹² Ibid., <<http://www.johnes.org/dairy/pathology.html#terminal>>

¹¹³ Ibid., <<http://www.johnes.org/dairy/pathology.html#mid>>

Figura 25. Calcificación de las placas en la pared de la aorta



Fuente: <http://www.johnes.org/dairy/pathology.html#mid>

Michael Collins¹¹⁴ menciona, el resultado de niveles subnormales de proteínas séricas totales puede leerse por la presentación de una enteropatía con pérdida. Una proteína sérica en particular, la albúmina sérica, puede estar sumamente baja en las fases avanzadas de la enfermedad de Johne.

4.9. DIAGNOSTICO

Sevilla¹¹⁵ asegura que la primera vez que se reportó la paratuberculosis en España fue en 1973 en ovejas y en 1983 en ganado. Desde entonces ha llegado a ser evidente que esta infección no es rara y que hay un aumento en el uso de pruebas de laboratorio.

Para diagnosticar la presencia del *Mycobacterium paratuberculosis* en un animal sospechoso clínico individual, un número de pruebas de laboratorio pueden ser utilizadas incluyendo necropsia, histología, frotis fecal, cultivo fecal, pruebas DNA, PCR y serología. Thorel¹¹⁶ comenta, En un estudio se comparó los estudios utilizados para el análisis bacteriológico del *Mycobacterium paratuberculosis* de muestras fecales y órganos (nódulos linfáticos mesentéricos, válvula ileocecal o intestino). El estudio se realizó en catorce países de Europa como por ejemplo Italia, Grecia, Finlandia, Portugal, Bélgica, Francia entre otros.

¹¹⁴ Ibid., <<http://www.johnes.org/beef/pathology.html#terminal>>

¹¹⁵ SEVILLA, Op. cit., <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst7_o1.htm>

¹¹⁶ THOREL M.F. Diagnosis of *Mycobacterium paratuberculosis* in Europe. International Association for Paratuberculosis [online]. 11 – 14 junio 2002. [Mayo 11 de 2004]. <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst7_p28.htm>

Eamens¹¹⁷ afirma, las técnicas de diagnóstico no pueden darnos un éxito absoluto sobre los animales no infectados, por la naturaleza lenta y progresiva de la enfermedad, no hay pruebas que puedan detectar cada animal infectado. Mucho ganado es infectado como terneros y la enfermedad permanece latente hasta el estado adulto.

Una vez el número de microorganismos alcanza el umbral, las pruebas diagnósticas son capaces de detectarlos. En este estado temprano, aunque ocurra algún daño en vísceras el ganado no es probable que presente algún signo de la enfermedad. Estos son conocidos como casos clínicos de la enfermedad. Además el autor¹¹⁸ afirma, cuando el ganado llega a ser severamente afectado y presente signos clínicos como por ejemplo pérdida de peso, ellos pueden diseminar 100 millones de bacterias en el estiércol. Como la enfermedad progresa, llega a ser más fácil detectar los animales infectados utilizando pruebas que dependan de la diseminación de la bacteria en estiércol o anticuerpos para la bacteria en el suero. Esto significa, en los hatos donde la enfermedad esté prevalente, hay más probabilidad de que halla un número de ganado que sea detectado por pruebas serológicas. Controversialmente cuando hay uno o más parejas de animales infectados en un hato grande estos podría escapar de la detección hasta que la enfermedad haya progresado para que aparezcan positivos en las pruebas diagnósticas.

Manning y Collins¹¹⁹ apuntan, es común, el concepto erróneo que no hay ninguna prueba diagnóstica exacta para la enfermedad de Johne. Hay, de hecho, 8 pruebas disponibles: 3 métodos para descubrir la bacteria que causa la enfermedad de Johne, 4 pruebas sanguíneas para detectar anticuerpo, y 2 ensayos para inmunidad celular. Cinco de estas pruebas están comercialmente disponibles, en varias compañías, para el uso de laboratorios de diagnóstico veterinario a nivel mundial. Unos laboratorios privados tienen las pruebas que ellos mismos han desarrollado.

4.9.1. Pruebas de detección del organismo o antígeno. Tenemos las siguientes:

¹¹⁷ EAMENS, Graeme. Op. cit., <<http://www.agric.nsw.gov.au/reader/bjd/dai89.htm#diagnostic>>

¹¹⁸ Ibid., <<http://www.agric.nsw.gov.au/reader/bjd/dai89.htm#diagnostic>>

¹¹⁹ Johne's Information Center. Op. cit., <<http://www.johnes.org/general/diagnosis.html#types>>

- **PCR.** Verna¹²⁰ et al. afirman, es importante desarrollar tecnologías como la reacción en cadena polimerasa (P.C.R.) para identificar segmentos del genoma siendo ésta una metodología rápida, sensible y específica para la detección del M.A.P.

Los métodos de detección para la paratuberculosis se han desarrollado usando investigaciones combinadas de ácido nucleico con reacción en cadena de polimerasa (PCR). La primera investigación de ADN fue desarrollada para detectar al ADN del MAP en muestras fecales con falta de especificidad porque la investigación también hizo híbridos de ADN del *Mycobacterium avium*. Stabel¹²¹ comenta, más recientemente, se han desarrollado otras investigaciones de ADN específica. Una investigación esta basada en la secuencia parcial de un elemento de inserción del MAP IS900. Los estudios dirigidos para comparar el equipo prueba ADN con tres procedimientos diferentes con cultivo fecal indican que un 60% del ganado infectado detectado por cultivo fecal puede descubrirse utilizando la prueba de ADN. Por consiguiente, aunque altamente específico para *M. paratuberculosis*, el examen de ADN es incapaz de descubrir ganado infectado cuando se disemina un bajo número de organismos.

Beth Harris y Raúl Barletta¹²² comentan, el primer diagnóstico PCR comercial para la enfermedad de Johne basado en la secuencia IS900 fue desarrollado por laboratorios IDEXX. El ensayo utiliza el gen, el 16S de la secuencia RNAr y los elementos de inserción IS900 (*M. paratuberculosis*).

- **Cultivos fecales.** El aislamiento de *Mycobacterium paratuberculosis* de heces sigue el estándar de oro para detección de rutina en animales infectados individualmente, en un hato que se sospecha tiene la enfermedad, complementa Whitlock¹²³.

¹²⁰ VERNA, A, MORSELLA, C. ZUMÁRRAGA, M. GIOFFRE, A. ROMANO, M. CATALDI, A. PAOLICCHI, F. "Strains characterization by PCR and RFLP from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates of red deer with paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis [online]. 11 – 14 junio 2002. [Mayo 11 de 2004]. <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst1_p5.htm>

¹²¹ STABEL, Op. cit., <<http://jds.fass.org/cgi/reprint/81/1/283.pdf>>

¹²² HARRIS, Op. cit., <<http://cmr.asm.org/cgi/content/full/14/3/489#top>>

¹²³ BRADFORD, Op. cit., p. 901.

Para probar muestras de estiércol muchos laboratorios utilizan métodos de cultivo tradicional. El cultivo bacteriano ha sido utilizado por casi 100 años. Requiere de personas especializadas para realizar este sistema. Esta prueba es costosa. Collins y Manning¹²⁴ informan, el cultivo estándar toma al menos 16 semanas para completarse por la tasa de crecimiento extremadamente lento. Además, pocos laboratorios utilizan un sistema de cultivo llamado el sistema BACTEC. Sus principales ventajas son: detectar bajo número de M.A.P.; y puede detectar al M.A.P mas rápido que el método estándar.

Un estudio realizado por Gardner¹²⁵ et al. quienes estudiaron 29 hatos que solo eran de ganado lechero en el Valle central de California. Consideran a esta como una alternativa aparte de la prueba de ELISA para la determinación de M.A.P. En el estudio experimental, la sensibilidad del cultivo fue de un rango del 30% al 100%, fue dependiente del tamaño de la población y si las vacas estuvieron diseminando mucho o poco el microorganismo.

Y Whitlock¹²⁶ dice, La técnica de cultivo fecal utiliza la centrifugación y una doble incubación, debería detectar 50 a 100 organismos/gramo de estiércol.

- **Cultivo leche.** Existe un estudio donde la detección del MAP tiene muchos problemas por el lento crecimiento del microorganismo y por el bajo número que con frecuencia se presentan en el alimento, tales como la leche. Este test utiliza bacteriófagos específicos del huésped para reportar la presencia del MAP. Los resultados positivos son solo vistos si el MAP esta presente y aparece en placas de rápido crecimiento que también es susceptible de ser fagocitado. El estudio de Stanley¹²⁷ propone desarrollar un ensayo capaz de detectar específicamente y en forma rápida la presencia del MAP en leche. La detección en 24 horas ha sido demostrada con la recolección de varios cultivos de cepas del MAP utilizando el ensayo de amplificación fagocítica.

¹²⁴ Johnes' Information Center. Op. cit., <<http://www.johnes.org/general/diagnosis.html#standard>>

¹²⁵ GARDNER, I.A. ANDERSON, R.J. SHIN, S. WHITLOCK, R.H. Diagnostic sensitivity of pooled fecal culture for *Mycobacterium paratuberculosis* in dairy herds. International Association for Paratuberculosis [online]. 11 – 14 junio 2002. [Mayo 11 de 2004]. <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst4_o5.htm>

¹²⁶ BRADFORD, Op. cit., p. 900.

¹²⁷ STANLEY, E.C. MOLE, R.J. Rapid detection of viable *Mycobacterium paratuberculosis* in milk using phage amplification. International Association for Paratuberculosis [online]. 11 – 14 junio 2002. [Mayo 11 de 2004]. <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst4_p7.htm>

- **Raspado de mucosa rectal.** La doctora Amelia Bernardelli¹²⁸ asegura, este método de diagnóstico es de fácil realización y se usa rutinariamente, aunque solamente el 25% de los animales infectados dan reacción positiva.

En un estudio donde se realizó la tinción para diagnosticar animales subclínicos, lograron obtener una sensibilidad de 36.4%, lo cual Zimmer¹²⁹ et al. concluyeron que no es fiable para diagnosticar la enfermedad de Johne.

“En los exámenes de raspado de mucosa rectal, los organismos ácido-resistentes individuales son ignorados (probablemente sean saprófitos incidentales) y sólo se le da importancia a los grupos de uno o más organismos de tamaño típico”¹³⁰, lo menciona Jubb. Y complementa expresando, puede ser válido objetar que estos microorganismos hayan sido ingeridos y que sean eliminados en las heces aún cuando con certeza sean *mycobacterium paratuberculosis*, solo se puede confiar en los frotis positivos cuando los animales se encuentran enfermos típicamente y se hayan eliminado otras causas de diarrea crónica por los medios apropiados.

4.9.2. Pruebas de diagnóstico – anticuerpo. Beth Harris¹³¹ dice, la detección de anticuerpos serológicos es una buena evidencia cuando el animal está infectado. Existen tres técnicas que son de común uso: fijación de complemento (FC), inmunodifusión en agar gel (AGID), y ELISA.

- **La prueba de inmunodifusión en Agar gel (AGID).** Esta prueba fue desarrollada en la Universidad de Minnesota. Es un test sencillo y no requiere de un equipo especial. El AGID puede ser utilizado en una gran variedad de especies animales aunque ha sido más utilizada para ganado. Raras veces presenta errores cuando es positivo (alta especificidad). Sin embargo, Manning¹³² comenta que tiene una baja sensibilidad en ganado y su uso es principalmente restringido

¹²⁸ BERNARDELLI, Op. cit., <<http://www.aavid.org.ar/paratub.pdf>>

¹²⁹ ZIMMER, K. DRAGER, K.G. KLAWONN, W. HESS, R.G. Contribution to the diagnosis of Johne's disease in cattle. Comparative studies on the validity of Ziehl-Neelsen staining, faecal culture and a commercially available DNA-Probe test in detecting Mycobacterium paratuberculosis in faeces from cattle. PUBMED [online]. Marzo 1999. [Octubre 27 2003]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=10216457>

¹³⁰ JUBB, Op. cit., p. 189.

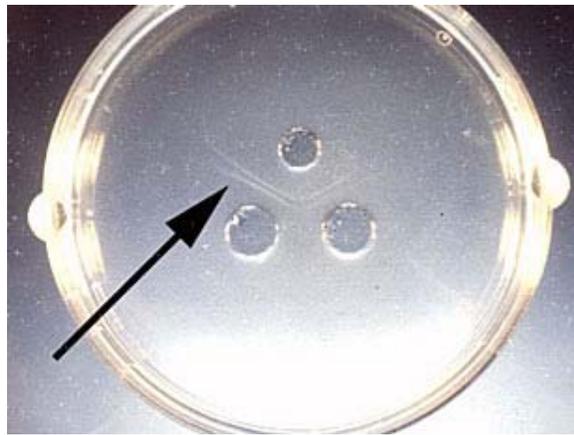
¹³¹ HARRIS, Op. cit., <http://cmr.asm.org/cgi/content/full/14/3/489#SEC4_5>

¹³² Johne's Information Center. Op. cit., <<http://www.johnes.org/general/diagnosis.html#agid>>

para confirmación de un diagnóstico: como por ejemplo, para verificar un diagnóstico en animales con signos clínicos de la enfermedad, si está presentando pérdida de peso y/o diarrea. La sensibilidad para este método es de un 26.8%.

De acuerdo con los diferentes autores se indican distintos valores referentes a la sensibilidad del método. La doctora Bernardelli¹³³ informa, sería del 55% para los animales verdaderamente positivos, 45% para los falsos negativos, 44% para los falsos positivos y 56% para los verdaderamente negativos. En la figura 26 podemos observar la prueba serológica.

Figura 26. Prueba serológica AGID para la enfermedad de Johne.



Fuente: <http://www.johnes.org/general/diagnosis.html#agid>

- **Prueba Serológica ELISA.** Es una prueba para detectar anticuerpos. Es más sensible que la fijación de complemento o el AGID en ganado. Es altamente específica y es casi tan sensible como el cultivo fecal en la detección de animales infectados. Manning¹³⁴ dice, esta diseñado para probar un amplio número de muestra en forma rápida y a bajo costo. Otra ventaja, produce resultados numéricos que son medidos por la cantidad de anticuerpos en el suero. La sensibilidad para esta enfermedad, se reporta en un 45.8%.

¹³³ BERNARDELLI, Op. cit., <<http://www.aavld.org.ar/paratub.pdf>>

¹³⁴ Johne's Information Center. Op. cit., <<http://www.johnes.org/general/diagnosis.html#elisa>>

Datos encontrados en estudios de Paolicchi¹³⁵ et al. quienes comenta que en la provincia de Buenos Aires Argentina entre los años 1992 y 2002 se utilizaron técnicas serológicas como la de ELISA donde la sensibilidad fué del 66% y una especificidad del 98%.

“Esta prueba tiene una alta especificidad, superior al 99%, correspondiendo al porcentaje de animales libres de la enfermedad que resultan negativos, lo cual significa que se presentan muy pocos falsos positivos”¹³⁶, argumentado por la doctora Pilar Fernández en su artículo.

Una interpretación de la prueba de ELISA realizada por Wells¹³⁷ en Minnesota y Pennsylvania, dieron resultados que indicaron la especificidad en hatos lecheros no infectados donde se presentó una variedad del 97% en un grupo de cuatro hatos y el 72% en otro de 3 hatos.

Un estudio hecho que tuvo como objetivo determinar las causas y la cantidad de variación en resultados con cultivo fecal y kinetics ELISA (KELA) en vacas. Van Shaik¹³⁸ et al. obtuvieron con el modelo KELA, presentó en las vacas de segunda o más lactancias, un incremento en los valores de KELA, comparado con las novillas.

Ahora, Pilar Fernández¹³⁹, nos comenta:

¹³⁵ PAOLICCHI, Op. cit., <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst7_p1.htm>

¹³⁶ FERNÁNDEZ, Pilar. Diagnostico a través de test de ELISA. e-cooprinsem [online]. 31 diciembre 2002. [Mayo 14 de 2004]. <http://www.e-cooprinsem.cl/softagri/Cooprinforma63/Articulo_6_2.htm>

¹³⁷ WELLS, S.J. GODDEN, S. WHITLOCK, R.H. COLLINS, J. Interpretation of the serum ELISA for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* fecal shedding in dairy cattle herds. International Association for Paratuberculosis [online]. 11 – 14 junio 2002. [Mayo 11 de 2004]. <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst7_o24.htm>

¹³⁸ VAN SCHAİK, G.ROSSITER, C.R. STEHMAN, S.M. SHIN, S.J. SCHUKKEN, Y.H. A longitudinal study to investigate variation in ELISA and fecal culture results for *M. paratuberculosis* in commercial dairy herds in New York State. International Association for Paratuberculosis [online]. 11 – 14 junio 2002. [Mayo 11 de 2004]. <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst7_o21.htm>

¹³⁹ FERNÁNDEZ, Op. cit., <http://www.e-cooprinsem.cl/softagri/Cooprinforma63/Articulo_6_2.htm>

“En un ambiente de baja prevalencia, (p.e.1%) hay solo una probabilidad de 15%-16% que un resultado positivo de Elisa (S/P>0,25) sea correcto y una probabilidad de 99% que un resultado negativo de Elisa sea correcto. En una situación de alta prevalencia, (p.e 30%) hay entre un 88% a 90% de probabilidad que un resultado positivo de Elisa (S/P>0,25) sea correcto y entre 75% a 85% de probabilidad que un resultado negativo de Elisa sea correcto”.

Desafortunadamente, el ganado podría ser expuesto a una variedad de antígenos micobacteriales en el medio ambiente, los anticuerpos detectados por ELISA no son completamente específicos para la infección de Johne. Los animales con altos títulos de anticuerpos de ELISA tienen gran probabilidad de ser infectados, así lo contribuye Whitlock¹⁴⁰.

El propósito de un estudio fué estimar la sensibilidad y especificidad del cultivo fecal y ELISA para grupos de animales específicos por medio de estratificación por características de las vacas y definiciones alternativas de la enfermedad. La probabilidad de ser positivo-ELISA fué determinado para grupos de vacas por partos y estado de lactancia. Nielsen¹⁴¹ encontró, la probabilidad de ser positivo-ELISA fue de 2 a 4 veces mayor en la segunda y mas lactancias que en la primera. Concluyendo que las vacas con dos o más partos tienen mayor probabilidad.

En alguna serie de pruebas realizadas por Galvin y Jubb¹⁴², el número de animales positivos detectados para ELISA fué entre el 20 y 30% del número total de animales de los cuales llegaron a ser positivos o desarrollaron la enfermedad clínica luego del test. Tomando un informe, el número de reactivos que habrían ocurrido en animales que fueron desechados o sacrificados, la sensibilidad se estima que sea del 10 al 15%.

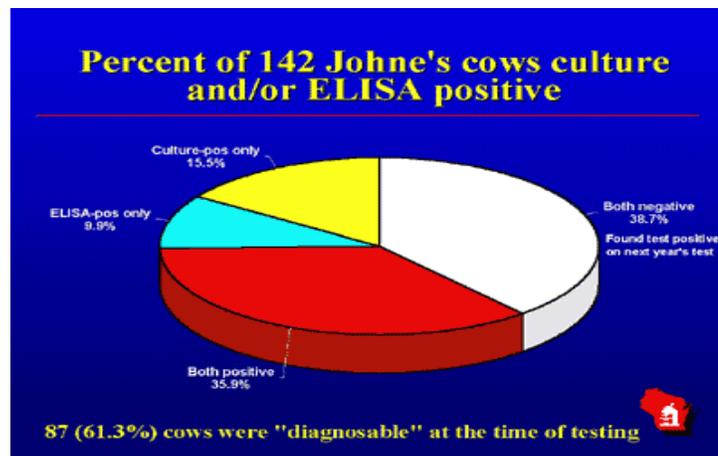
¹⁴⁰ BRADFORD, Op. cit., p. 900.

¹⁴¹ NIELSEN, S.S. Optimisation of the sensitivity of ELISA and faecal culture for paratuberculosis: Selection of population or correction by population characteristics?. International Association for Paratuberculosis [online]. 11 – 14 junio 2002. [Mayo 11 de 2004]. <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst7_o23.htm>

¹⁴² JUBB, T.F. GALVIN, J.W. Testing to control Johne's disease in dairy herds in Victoria. International Association for Paratuberculosis [online]. 11 – 14 junio 2002. [Mayo 11 de 2004]. <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst7_o28.htm>

El figura 27, presenta los resultados para las dos pruebas más sensibles aplicadas a 142 vacas. 35.9% de ellas fueron positivas tanto al cultivo fecal y a la prueba de ELISA, el 15.5% fueron positivas solo al cultivo fecal, el 9.9% fueron solo a ELISA, y el 38.9% fueron negativas a ambas pruebas.

Figura 27. Porcentaje de 142 vacas con enfermedad de Johne.



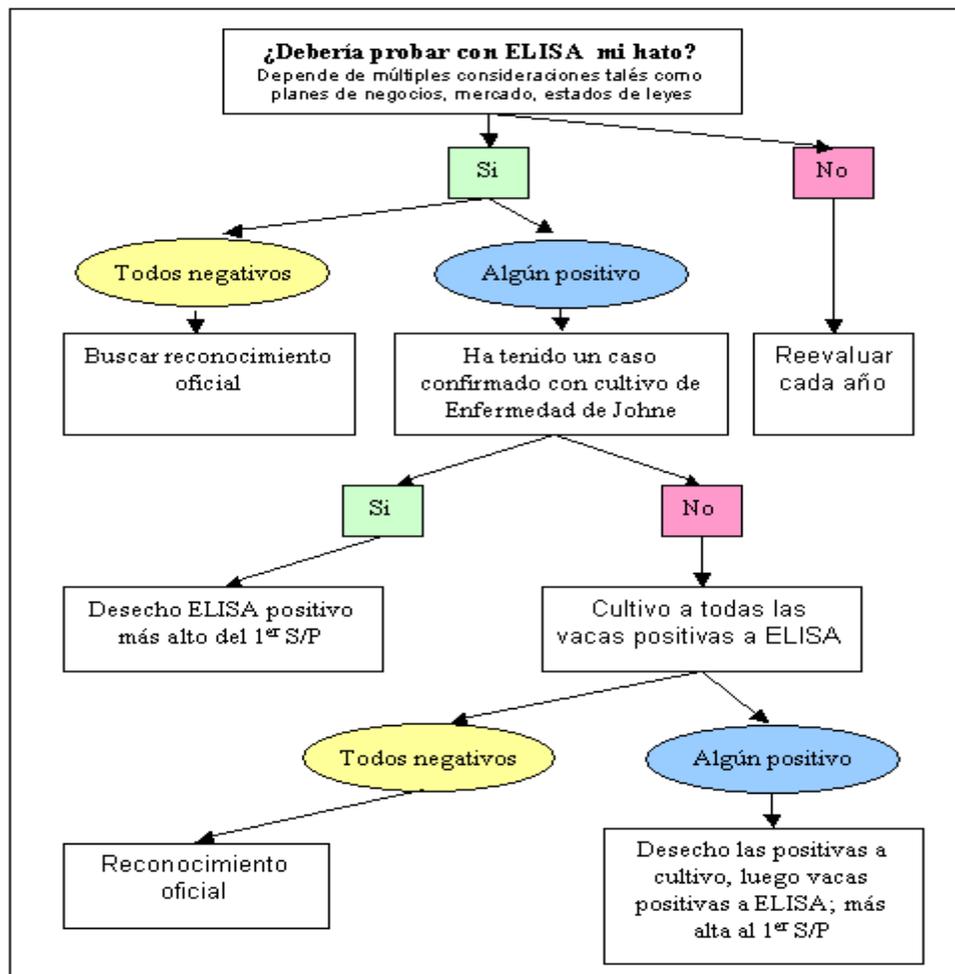
Fuente: <http://www.johnes.org/dairy/diagnosis.html#top>

Si se utiliza al mismo tiempo las dos pruebas y si se considera que las vacas sean infectadas y se presenten positivas en algún test, se podría diagnosticar la enfermedad en un 61.3% de las vacas. La figura 27, representa la sensibilidad máxima que se podría conseguir utilizando las dos pruebas más sensibles disponibles en el momento. Elizabeth Manning¹⁴³ relata que los datos mostrados en la misma figura ilustran una lección importante. Si un cultivo fecal se hace a una vaca positiva a ELISA y da negativo, necesariamente no significa que la vaca no tiene la enfermedad de Johne. Esto puede significar, el animal no diseminó ningún microorganismo aquel día ó los 3 gramos de muestra colectados de las libras de estiércol en aquel día no ocurrió contacto con este microorganismo. En estos 87 casos diagnosticados de la enfermedad de Johne el cultivo fue falso-negativo para 14 (16.1%) de las vacas infectadas en el día de prueba.

La figura 28 presenta, como se debería utilizar la prueba de acuerdo a como se presenta el caso y teniendo esto, tomar alguna decisión para obtener como esta el Ganado.

¹⁴³ Johne's Information Center. Op. cit., <<http://www.johnes.org/dairy/diagnosis.html#top>>

Figura 28. Diagrama de la prueba de ELISA.



Fuente: <http://www.johnes.org/dairy/diagnosis.html#top>

Es importante considerar, el reconocimiento de la fuerte inmunidad celular-mediada en los estados subclínicos de infección ha llevado al desarrollo de un ensayo para medir la liberación del interferón IFN- γ por células que se han estimulado en cultivo con los antígenos micobacteriales. Stabel¹⁴⁴ declara, la cantidad de IFN- γ liberado, se cuantifica consecuentemente con un ELISA que utiliza un anticuerpo monoclonal enzima-ligado de IFN- γ bovino. La ventaja de esta prueba es su capacidad de descubrir los animales infectados subclínicamente en un hato, permitiendo a productores que lleven a cabo medidas más estrictas para evitar la diseminación de la infección al resto de la manada.

¹⁴⁴ STABEL, Op. cit., <<http://jds.fass.org/cgi/reprint/81/1/283.pdf>>

- **Prueba de fijación de complemento.** La OIE¹⁴⁵ aporta diciendo, esta prueba ha sido el test estándar utilizado por muchos años. Trabaja bien en animales clínicamente sospechosos, pero no tiene suficiente especificidad para permitir su uso en la población general para propósitos de control. Sin embargo, con frecuencia es pedido por países que importan ganado. Una variedad de procedimientos de esta prueba son utilizadas internacionalmente.
- **Las pruebas de inmunidad celular mediada.** La respuesta inmuno celular mediada se considera la primera y más importante respuesta de animales para la infección con la micobacteria. Una manera duradera de medir las respuestas inmunocelular mediada es la prueba de piel: la inyección de cantidades diminutas de extractos de micobacteria bajo la piel y la observación de la inflamación 2 a 3 días en el sitio de inyección. Manning¹⁴⁶ explica, la prueba de piel ha sido valiosa para diagnosticar la tuberculosis, otra enfermedad micobacterial, en los humanos y animales. No obstante los primeros estudios indicaron que la prueba de piel no trabajó bien para el diagnóstico de la enfermedad de Johnne. Los investigadores quienes han reevaluado esta pregunta sugieren que la prueba de piel pueda ser de hecho valiosa. Más estudios se necesitan para probar este hallazgo. Una prueba de laboratorio nueva, más sofisticada, para la inmunidad celular a la micobacteria fué desarrollada por Paul Wood en CSIRO Australia. Esta prueba se hace en las muestras sanguíneas y medidas por un químico llamado interferón gamma liberado de las células blancas sanguíneas.

La técnica es realizada por inoculación de 0.1 ml de Tuberculina DPP(Derivado Proteico Purificado) Aviar(0.5 mg/ml, 25.000 U.I.) ó Johnina(0.5 mg/ml) en el tercio medio del cuello bovino. El espesor de la piel es determinado previamente con un calibre, repitiéndose la lectura a las 72 horas posteriores a la inyección. Un incremento mayor de 3 mm es considerado positivo. La doctora Bernardelli¹⁴⁷ complementa exclamando, esta prueba ha sido empleada para la estimación de los anticuerpos humorales. La prueba tiene valor limitado, su utilización en un rodeo indica la sensibilización de los animales al MAP o al complejo *Mycobacterium avium* y por ello deberá ser utilizado solamente como un test preliminar a la iniciación de un programa de control.

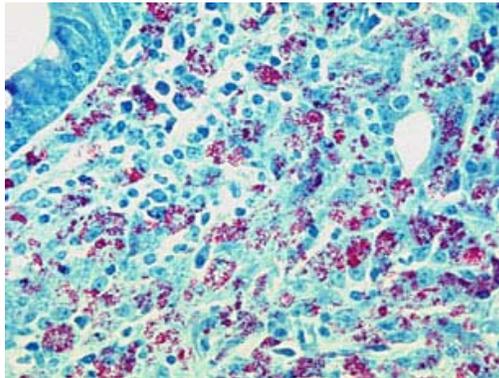
¹⁴⁵ Office International des Epizooties. PARATUBERCULOSIS (Johnne's disease). Office International des Epizooties [online]. 22 abril 2002. [Julio 14 de 2004]. <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00043.htm>

¹⁴⁶ Johnne's Information Center. Op. cit., <<http://www.johnes.org/general/diagnosis.html#skin>>

¹⁴⁷ BERNARDELLI, Op. cit., <<http://www.aavid.org.ar/paratub.pdf>>

4.9.3. Histopatología. Whitlock¹⁴⁸ señala, la examinación histopatológica de muestras de biopsias del ileon terminal y nódulos linfáticos ileoceco-cólicos a menudo ofrecen el diagnóstico definitivo de la enfermedad en poco tiempo (48 a 72 horas). La biopsia rectal, también ha sido reportada sensible en animales con signos clínicos. La examinación microscópica del tejido con prueba Ziehl – Nielsen (figura 29), método Kinyoung's o Auramine-O, suministra un resultado exacto del estado de infección.

Figura 29. Tinción ácido resistente en ileon.



Fuente: http://www.johnes.org/general/_Acid-fast_ileum.html

Este es una fotomicrografía de una sección de histopatología del ileon bovino con tinción Ziehl Neelsen. El uso de la tinción especial permite que la micobacteria sea vista en su crecimiento en grupos dentro de los macrófagos. Mirando la bacteria ácido resistente junto con la reacción típica de la célula del huésped, la inflamación granulomatosa difusa, es diagnóstico de paratuberculosis. Aquí el autor¹⁴⁹ nos muestra una imagen de esta tinción.

Machackova¹⁵⁰ explica, durante la inspección de paratuberculosis en ganado, ovejas, cabras y rumiantes salvajes, las muestras de tejido de intestino delgado y nódulos linfáticos correspondiente a 307 animales examinados por microscopia con Ziehl Nielsen, fueron positivos. En 251 cabezas de ganado se aisló el

¹⁴⁸ BRADFORD, Op. cit., p. 900.

¹⁴⁹ Johnes Information Center. Op. cit., <http://www.johnes.org/general/_Acid-fast_ileum.html>

¹⁵⁰ MACHACKOVA, M. LAMKA, J. YAYO AYELE W. PARMOVA, I. SVASTOVA, P. AMEMORI, T. PAVLIK, I. Infection of ruminants by uncultivable strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the Czech Republic. International Association for Paratuberculosis [online]. 11 – 14 junio 2002. [Mayo 11 de 2004]. <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst4_o1.htm>

Mycobacterium paratuberculosis de 250 animales (99.6%) en 1.5 a 3 meses de incubación. Contrario, del resto de animales, 34 (60.7%) fueron positivos al *M. paratuberculosis* en 2 y 3 meses de incubación y en 4 y 9 meses de incubación.

4.10. TRATAMIENTO

Un estudio realizado por Belloli¹⁵¹ et al. donde inocularon oralmente M.A.P. a terneros con pocos días de vida, realizaron la asociación de rifampicina (RMP)+ clofazimina (CFA) y rifampicina (RMP) + estreptomina (SM) + piracinamida (PZA). Estos fármacos fueron administrados diariamente en la leche, por un periodo de 7 meses, empezando el día después de la inoculación experimental. La asociación RMP+SM+PZA previno la colonización y se evitó la infección, mientras la RMP+CFA solo fue capaz de retrasar la excreción de *M. paratuberculosis* en las heces.

Los mismos autores¹⁵² del anterior estudio realizaron en dos terneros inoculados por vía endovenosa con M.A.P. y consecuentemente diseminaron la infección después de la 10^a a la 17^a semana, los cuales fueron tratados por vía oral con una combinación de rifampicina, estreptomina y piracinamida en dosis de 30, 25, 50 mg/Kg/día respectivamente, por un periodo de 7 meses en la semana 33 post inoculación. Los cultivos fecales hechos semanalmente durante la duración de la terapia y 6 meses después, fueron negativos en el cultivo fecal de tejidos realizado en el matadero.

De acuerdo a Beth Harris¹⁵³ estima que los tratamientos más usados para la enfermedad de Johne son la Clofazimina, o la Isoniazida y ya sea Rifabutina o Etambutol. Seguido de una dosis diaria de Isoniazida para la duración de la vida del animal. Aunque la Isoniazida es prescrita para el tratamiento de las infecciones con *M. tuberculosis* y *M. bovis* en ganado, ambos son resistentes a la Isoniazida in vitro y además no puede ser efectivo in vivo.

¹⁵¹ BELLOLI, A. ARRIGONI, N. VACIRCA, G. PROVERBIO, D. GREPPI, G. AGOSTI, A. POZZA, O. Efficacy of two associations of antituberculous drugs in calves experimentally infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. International Association for Paratuberculosis [online]. 1992. [Mayo 11 de 2004]. <<http://www.paratuberculosis.org/proc3/page508.htm>>

¹⁵² BELLOLI, A. ARRIGONI, N. VACIRCA, G. PROVERBIO, D. GREPPI, G. AGOSTI, A. POZZA, O. First results of paratuberculosis therapy in calves experimentally infected by intravenous route. International Association for Paratuberculosis [online]. 1995. [Mayo 11 de 2004]. <<http://www.paratuberculosis.org/proc4/page144.htm>>

¹⁵³ HARRIS, Op. cit., <http://cmr.asm.org/cgi/content/full/14/3/489#SEC5_4>

Mientras que J.R. Stabel¹⁵⁴ efectuó un tratamiento de 60 días en cabras con paratuberculosis, quien utilizó una combinación de estreptomicina, rifampicina, y levamisol, encontró una notable mejoría en la ganancia de peso corporal, la proteína de suero total y la globulina. Y como dato importante que la diseminación fecal del microorganismo no fue observado después del tratamiento, ni en los tejidos post-mortem.

Un interesante estudio realizado por Chiodini¹⁵⁵ et al. quienes infectaron ratones de BALB/c vía intraperitoneal con *Mycobacterium paratuberculosis* y, después de permitir la infección durante 30 días, se trató con el Rifabutina a 0, 12.5, 25, y 50 mg/kg de peso del cuerpo. La Rifabutina se administró en agua de bebida bajo condiciones de suspensión de agua, por lo que la dosis diaria entera se administró en un periodo de una hora. Se sacrificaron los animales a intervalos quincenales de tiempo de tratamiento, cero a 180 días. Los bazos e hígados de cada animal fueron examinados por la cultivo bacteriológico cuantitativo e histopatología. La infección, evaluada por las cuentas bacterianas, sólo estaba reducido en animales que recibieron 50 mg de Rifabutina por el kg. La Rifabutina puede ser una droga quimioterapéutica apropiada para el tratamiento a largo plazo de la infección del *M. paratuberculosis* y debe ser considerada en cualquier régimen farmacológico.

4.11. MANEJO Y CONTROL

Collins¹⁵⁶ expresa, los programas de control son principalmente construidos sobre los conocimiento en epidemiología de la enfermedad de Johne en el ganado lechero y la valoración de los factores de riesgo. En otros términos, los programas de control son principalmente teóricos. Faltan ensayos de campo para probar el éxito de tales programas o para evaluar qué técnicas son más rentables, debido a la falta de fondo para la investigación.

Los hatos infectados deben ser considerados para matadero o para la venta. Esto hace que el hato determine tan pronto como sea posible su estado real. En muchos casos esto tomará algún tiempo debido a su largo y variable periodo de incubación, además las pruebas disponibles no son precisas. Esto significa, una amplia y complicada investigación donde se requiere determinar tanto los hatos

¹⁵⁴ STABEL, Op. cit., <<http://jds.fass.org/cgi/reprint/81/1/283.pdf>>

¹⁵⁵ CHIODINI, R.J. KREEGER, J.M. y THAYER, W.R. Use of rifabutin in treatment of systemic *Mycobacterium paratuberculosis* infection in mice. PUBMED [online]. Agosto 1993. [Junio 10 de 2004]. <<http://cmr.asm.org/cgi/ijlink?linkType=ABST&journalCode=aac&resid=37/8/1645>>

¹⁵⁶ Johne's Information Center. Op. cit., <<http://www.johnes.org/beef/epidemiology.html#top>>

infectados como los no infectados. Tim¹⁵⁷ agrega, las pruebas que pueden realizarse son la serológica, muestra fecal, a animales sospechosos en matadero. El propietario del ganado y el veterinario deben trabajar para confirmar si esta presente la infección.

Duane Rice y Douglas Rogers¹⁵⁸ hacen una lista para realizar un buen plan de control donde las acciones específicas incluyen:

1. Identificar y eliminar los animales infectados con *M. paratuberculosis*.
2. Ser consciente que el M.A.P. puede transmitirse de una vaca embarazada infectada al ternero (feto) en el útero.
3. La vaca tenga su parto separadamente, mientras se use sólo calostro y/o se ordeñe las vacas no infectadas.
4. Ser consciente de mantener las prácticas de higiene.
5. Que el ganado joven no padezca en pasturas usadas por los adultos.
6. Considerar la inseminación artificial para minimizar la diseminación de la enfermedad.
7. El agua de suministro sólo de los tanques limpios y cercas fuera de los estanques.
8. No extender el estiércol en pasturas usadas como alimento.
9. Sólo comprar el ganado de hatos conocidos para estar libre de M.A.P. y otras enfermedades (solo para los Estados Unidos).
10. Quitar los terneros del hato cuando se conocen que son de vacas infectadas.
11. Llamar a el veterinario temprano, si la diarrea es persistente. Excluya otras enfermedades y discutir las pruebas de diagnóstico disponibles.
12. Evaluar otras especies de animales en el hato; ovejas y cabras pueden ser una fuente de contagio (pero esto, no ha sido probado).

Según Tim¹⁵⁹ en su artículo, Bovine Johne's 'Suspect' herds, comenta que en Australia, un hato puede ser considerado sospechoso de la enfermedad basándose en los siguientes puntos:

1. Un animal puede ser encontrado sospechoso de la enfermedad y ser investigado como posible fuente de infección. Si el animal infectado fue

¹⁵⁷ JESSEP, Tim. Bovine Johne's 'Suspect' herds. NSW Agriculture [online]. Julio de 2001. [Marzo 19 de 2004]. <<http://www.agric.nsw.gov.au/reader/bjd/dai49.htm#Introduction>>

¹⁵⁸ RICE, Op. cit., <<http://ianrpubs.unl.edu/animaldisease/g977.htm#PREV&ERAD>>

¹⁵⁹ JESSEP, Op. cit., <<http://www.agric.nsw.gov.au/reader/bjd/dai49.htm#Suspect>>

introducido como adulto, la propiedad de origen es muy posible que sea considerada como fuente de infección.

2. Un hato puede ser considerado infectado y sus movimientos deben ser investigados, si a otras propiedades llega un animal infectado puede ser considerada esta “sospechosa”.
3. Los propietarios están obligados a notificar su “Rural Lands Protection Board”(Australia), de algún animal que puede presentar signos de la enfermedad a menos que el veterinario esté completamente seguro de la otra condición, el hato puede considerarse sospechoso hasta que el problema haya sido bien diagnosticado.
4. Donde uno o más grupos pequeños para la venta fueron reactivos a un test, esta situación es considerada sospechosa hasta que los cultivos fecales o los post-mortem hayan sido completos. Puede ocurrir falsos positivos para pruebas serológicas, un animal reactivo no es clasificado como “infectado” a menos de que se hagan pruebas suplementarias que confirmen la infección.
5. Ocasionalmente, un hato podría ser considerado sospechoso por la posibilidad de la vía de propagación en el medio ambiente.

Las medidas de manejo apropiadas para el programa de control en Holanda, con el fin de prevenir nuevas infecciones realizando pruebas serológicas en ELISA en animales mayores de 24 meses, cultivo fecal en animales mayores de 6 meses, y un ensayo gamma interferón en ganado joven mayor de 6 meses. Al mismo tiempo se recomendó eliminar todos los animales con prueba positiva de manera rápida y realizar todas las medidas preventivas requeridas para el manejo. Este método ha sido realizado en 14 hatos de ganado lechero con una baja prevalencia del *mycobacterium paratuberculosis* (<10% positivos al cultivo). Los hatos fueron examinados dos veces durante el primer año y se continuó otros tres años con pruebas anuales para estimar los resultados del programa. Después de cuatro años solo tres de los 13 hatos repitieron pruebas negativas. En cuatro hatos se detectó animales con cultivos positivos. En los cuatro hatos con cultivo negativo las pruebas fueron alternadas con pruebas de hatos con cultivos positivos, así lo reporta Kallis¹⁶⁰ et al.

Eamens¹⁶¹ recomienda, con una combinación de pruebas, nosotros podemos detectar un amplio número de animales infectados. Esto podría ser hecho con el uso de pruebas al mismo tiempo o, para disminuir los costos, alternando pruebas

¹⁶⁰ KALLIS, C.H.J. COLLINS, M.T. HESSELINK, J. W. BARKEMA, H.W. Rapid eradication of paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis [online]. 11 – 14 junio 2002. [Mayo 11 de 2004]. <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst7_o27.htm>

¹⁶¹ EAMENS, Op. cit., <<http://www.agric.nsw.gov.au/reader/bjd/dai89.htm#tests>>

a través del tiempo. Por ejemplo, podemos detectar más animales infectados si alternamos pruebas serológicas un año y al siguiente con cultivo fecal, en vez de utilizar solo la prueba serológica. El test de ELISA mide los niveles de anticuerpos serológicos y da un resultado numérico. Los animales que están por encima de un puntaje particular son clasificados como “positivo”, y los que están por debajo de ese puntaje son negativos.

Es importante tener en cuenta planes de control como por ejemplo los realizados en Victoria una ciudad de Australia, quienes utilizaron pruebas como la de ELISA. Donde se encontró un declive en la prevalencia del 1.7% a 1.0% en siete años y un declive en los casos clínicos del 0.4% a menos del 0.01%, así lo precisan Galvin¹⁶² y Jubb.

Teniendo en cuenta que el calostro maternal infectado con *M. paratuberculosis* contribuye en la transmisión de la enfermedad de Johne en granjas de producción de leche y la pasteurización no es una opción viable, porque reduce las IgG calostrales y no elimina el microorganismo. Y sabiendo que las fuentes de IgG exógenas son la leche, calostro, sangre y los huevos, ingredientes en los suplementos de calostro disponibles en el mercado y los productos corrientes suministran insuficientes IgG para reemplazar el calostro maternal, Quigley¹⁶³ et al. realizaron un estudio, con el objetivo de desarrollar una fracción altamente concentrada de suero bovino para el uso de un Reemplazador de Calostro (RC). El suero bovino fue recolectado de mataderos bajo la supervisión del gobierno. La fracción que resultó fué secada, mezclada con ingrediente incluyendo lactosa, suero de leche, proteína concentrada de suero de leche, grasa, vitaminas y minerales para producir un RC. Cinco experimentos se realizaron, utilizando un total de 238 terneros alimentados con calostro maternal o RC. La toma de IgG de calostro maternal o RC alcanzó de 100g a 253g en uno o dos de los terneros alimentados a la 1, 8 y 12 horas de edad. El plasma principal con IgG a las 24 horas de edad alcanzó de 5,5 a 14,1 y 13,8 a 17,8 g/L en terneros alimentados con RC y calostro maternal, respectivamente. En experimentos donde los terneros consumieron >120 g de IgG de RC, el plasma con IgG en las 24 horas de edad fue >10 g/L en el 75 a 88% de los terneros. Los terneros de 56 días (determinados en un estudio) no se diferenciaron de los terneros alimentados con calostro maternal y fué >95%. Un RC que contiene Ig concentrada es una alternativa viable para programas de control de la enfermedad de Johne.

¹⁶² JUBB, Op. cit., <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst7_o28.htm>

¹⁶³ QUIGLEY, Op. cit., <[15http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst7_o17.htm](http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst7_o17.htm)>

4.11.1. Vacunación. Stabel¹⁶⁴ explica, los beneficios de la vacunación no pueden distinguirse de las mejoras concomitantes de las practicas de manejo, como la ubicación del animal, la separación del estiércol, y las prácticas generales de higiene. La vacuna se ha usado ampliamente en Europa y América Latina con el beneficios demostrables. Las preparaciones de la vacuna para paratuberculosis, generalmente comprenden suspensiones de células completas o preparaciones sonicadas del ADN de la bacteria que puede ser una manera eficaz de lograr la protección. El sitio de inyección de la vacuna es indicado en la figura 30.

Figura 30. Sitio de inyección de la vacuna.



Fuente: http://www.johnes.org/general/_Vaccinationsite.html

Juste¹⁶⁵ et al. comentan, la vacunación es el método más viejo de control para la paratuberculosis, utilizado en todo el mundo, pero no ha sido reconocido. Su uso en ganado en Francia por Valleé y Rinjard en los primeros años del siglo 20 reportó un éxito. Por los años sesenta, el grupo de Moredun llevó a cabo una serie de experimentos en oveja. Después, un nuevo trabajo en las cabras en Noruega demostró que la vacunación es un método de control práctico muy eficaz. A pesar de todas estas evidencias de vacunación, no se acepta ampliamente como una opción para el control de la paratuberculosis. La razón es el riesgo de la misma inyección para los practicantes. El inconveniente principal para la vacunación es

¹⁶⁴ STABEL, Op. cit., <<http://jds.fass.org/cgi/reprint/81/1/283.pdf>>

¹⁶⁵ JUSTE, R.A. GEIJO, M.V. SEVILLA, I. ADURIZ, G. Control of paratuberculosis by vaccination. International Association for Paratuberculosis [online]. 11 – 14 junio 2002. [Mayo 11 de 2004]. <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst7_i1.htm>

que no protege completamente de la infección, y por consiguiente la vacuna sola no puede llevar a la erradicación.

4.12. PARATUBERCULOSIS Y ENFERMEDAD DE CROHN

De acuerdo a Scott¹⁶⁶, la enfermedad de Crohn es una enfermedad inflamatoria del intestino delgado con algunos síntomas clínicos como pérdida de peso, dolor abdominal, diarrea o constipación, vómito y malestar general. Varias bacterias han sido implicadas como agentes etiológicos de la enfermedad de Crohn tales como *Klebsiela*, *Chlamydia*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Bacteoides fragilis*, *Listeria monocytogenes*, *Brucella abortus*, *Yersinia enterocolitica* y especies de *Mycobacterium*.

Hansen y Rossiter¹⁶⁷ expresan, un debate se ha desarrollado en los últimos 15 años sobre si el MAP juega un papel o no en la enfermedad de Crohn (CD). La afección es más típica en los jóvenes, desde la adolescencia a los 35 años y se estima que un cuarto de medio millón de personas sufren CD. La causa aún no se ha descubierto, pero se cree que implica múltiples factores incluyendo predisposición genética, más la exposición a algún factor infeccioso o medio ambiental. Se agrega que es consecuencia de una sobre-respuesta del sistema inmune intestinal a algún estímulo. El MAP, otros agentes infecciosos y componentes alérgicos o bacteriales del sistema normal intestinal, sale la hipótesis de que son factores potenciales en el inicio o prolongación en la respuesta inmune inflamatoria de la enfermedad. Los fármacos anti-inflamatorios son utilizados para reducir la inflamación. Sin embargo no hay cura.

Sechi¹⁶⁸ considera, a pesar de su primera correlación con el *M. paratuberculosis* en 1913, todavía no se establece su papel en la enfermedad de Crohn

La enfermedad de Crohn es un desorden sistémico donde su principal manifestación clínica patológica es la inflamación del intestino. Aunque la

¹⁶⁶ WELLS, Scott. Enfermedad de Crohn. Laboratorio Médico Veterinario Ltda. [online]. 2 agosto 2003. [Abril 8 2004]. <<http://www.lmvltada.com>>

¹⁶⁷ HASEN, Op. cit., <<http://www.vetmed.wsu.edu/courses-jmgay/JDPArticle1.htm>>

¹⁶⁸ SECHI, L.A. MANUELA, M. FRANCESCO, T. AMELIA, L. GIOVANNI, F. STEFANIA, Z. *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in biopsies from patients with Crohn's disease by in situ hybridization. International Association for Paratuberculosis [online]. 11 – 14 junio 2002. [Mayo 11 de 2004]. <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst6_p7.htm>

presencia en humanos tiene bajos precedentes por muchos años, la enfermedad de Crohn realmente empezó a aparecer al éste de Europa y Norte América a mediados de 1940. Hermon-Taylor¹⁶⁹, así complementa.

Scott Wells¹⁷⁰ comenta en su artículo, Chiodini reportó en 1984, el primer aislamiento de M.A.P. en tres de once pacientes con enfermedad de Crohn. Los aislamientos de los microorganismos de estos pacientes causaron enfermedad de Johne en cabras cuando se inocularon vía oral. Recientemente con el desarrollo de PCR y la identificación específica de la secuencia del ADN (IS900) de *M. paratuberculosis*, la asociación de entre enfermedad de Crohn y la paratuberculosis se ha explorado mas ampliamente. El estudio de Sanderson en 1992, encontró un 65% de pacientes con enfermedad de Crohn positivos a IS900 comparado con 4% (1/23) de pacientes con colitis ulcerativa y 13%.de pacientes control (5/40). Hay suficiente evidencia para probar o no probar que el *M. paratuberculosis* es un patógeno para humanos. Si se comprueba, hay un enorme impacto sobre la salud humana debido a la prevalencia en fincas y agua.

Las fuentes potenciales de *M. Paratuberculosis* al humano, incluyen contacto directo con animales que lo eliminan, consumo de leche y productos lácteos pasteurizados o no pasteurizados, carnes mal cocidas, y agua contaminada. McDonnald¹⁷¹ reporta, el estudio de Millar 1996, obtuvo resultados positivos a PCR IS900 en muestras de leche pasteurizada de venta en supermercados de Inglaterra y Gales. 7% de las muestras de leche (22/312) fueron positivas para *M. paratuberculosis*. Otro estudio de Stabel en 1997, reportó que este microorganismo sobrevive la pasteurización, pero, no la ultrapasteurización utilizando un pasteurizador de laboratorio simulando un flujo turbulento de leche.

Hay que tener en cuenta que Stabel¹⁷² anuncia, las vacas con paratuberculosis clínica disemina microorganismos viables en la leche en concentraciones bajas (50 cfu/50 ml de leche) Además, en el Reino Unido, Millar et al. recientemente demostraron la presencia de ADN de *M. paratuberculosis* en muestras de leche

¹⁶⁹ HERMON-TAYLOR, J. *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis (MAP) and its relation to Crohn's disease. International Association for Paratuberculosis [online]. 11 – 14 junio 2002. [Mayo 11 de 2004]. <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst6_i1.htm>

¹⁷⁰ WELLS, Op. cit., <<http://www.lmvitda.com>>

¹⁷¹ McDONALD W.L. O'RILEY, K. SCHROEN, C.J. CONDRON, R.J. Heat inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. International Association for Paratuberculosis [online]. 11 – 14 junio 2002. [Mayo 11 de 2004]. <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst6_o5.htm>

¹⁷² STABEL, Op. cit., <<http://jds.fass.org/cgi/reprint/81/1/283.pdf>>

obtenidas de los mercados. Los resultados de este estudio han sido favorablemente polémicos y hacen pensar que las técnicas de pasteurización actual no pueden ser adecuadas para matar al *M. paratuberculosis* en la leche cruda. Sin embargo el National Animal Disease Centern utilizando un pasteurizador de laboratorio han demostrado que la leche cruda inoculada con M.A.P. vivo (104 o 106 cfu/ml) a 72°C en 15 segundos mató eficazmente todas las bacterias.

En un estudio de Hamilton¹⁷³ señala, utilizando ratones gnotobióticos inoculados con *M. paratuberculosis* de un aislado de humano (cepa Linda; ATCC 43015) en un intento de investigar la patogénesis de paratuberculosis intestinal. Los ratones desarrollaron una infección intestinal de bajo nivel persistente pero no soportaron la multiplicación bacilar progresiva. Las observaciones sugieren que la presencia de un sistema inmunológico celular intacto sea importante para limitar la multiplicación intestinal del *M. paratuberculosis*. Los resultados de este estudio pueden ser relevantes a nuestra comprensión de la patogénesis de la enfermedad de Johne en los rumiantes y de enfermedades inflamatorias del intestino en humanos que tienen un etiología micobacterial (por ejemplo, algunos casos de enfermedad de Crohn y enteritis por *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracelular* en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida).

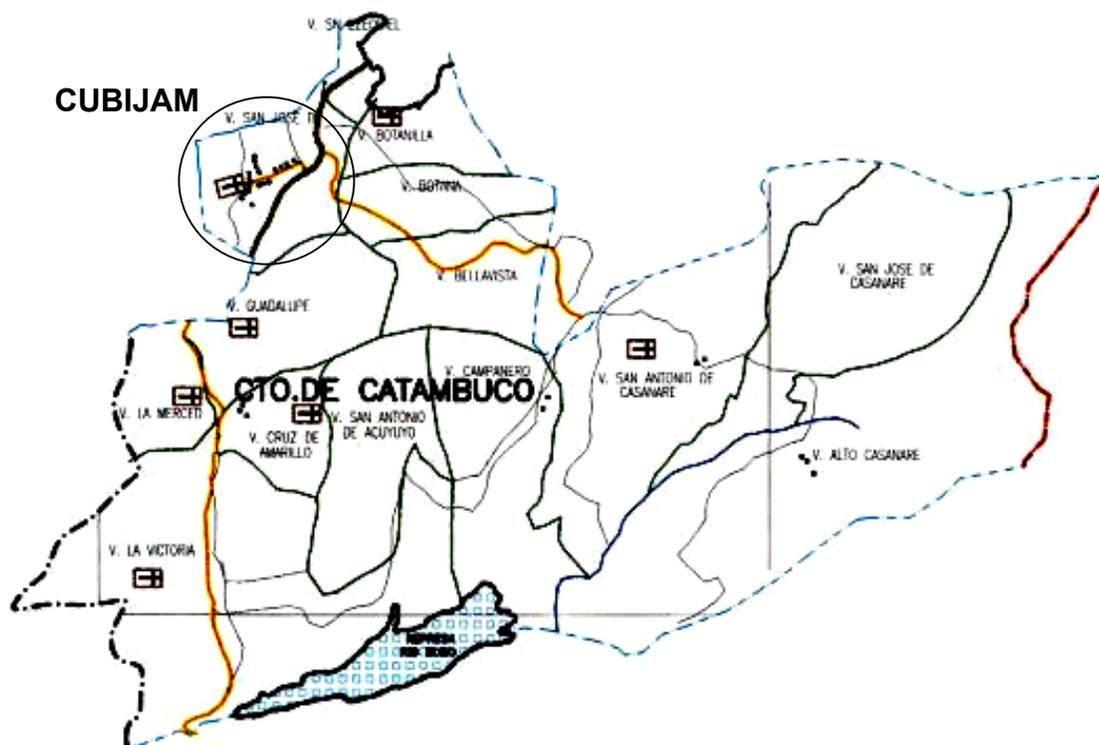
¹⁷³ HAMILTON, H.L. FOLLETT, D.M. SIEGFRIED, L.M. CZUPRYNSKI, C.J. Intestinal multiplication of *Mycobacterium paratuberculosis* in athymic nude gnotobiotic mice. PUBMED [online]. Enero 1989. [Junio 10 de 2004].
<http://cmr.asm.org/cgi/external_ref?access_num=2909488&link_type=MED>

5. DISEÑO METODOLÓGICO

La finca que se muestreó, esta ubicada en la vereda de Cubijam, corregimiento de Catambuco, municipio de Pasto, departamento de Nariño, en el kilómetro 12 vía al Sur, formando parte de las estribaciones del volcán Galeras. Son tierras onduladas con inclinaciones, de gran fertilidad.

Se encuentra a 2800 metros sobre el nivel del mar, con una temperatura promedio de 12 grados centígrados, predominando el clima frío, como lo reporta la alcaldía municipal¹⁷⁴.

Figura 31. Corregimiento de Catambuco.



Fuente: <http://www.alcaldiadepasto.gov.co/>

¹⁷⁴ ALCALDÍA MUNICIPAL. Plan de Ordenamiento Territorial 197-2000. San Juan de Pasto, Colombia, Editor, 1997. p 350.

5.1. POBLACIÓN Y MUESTRA

Se seleccionaron muestras de mucosa rectal y suero sanguíneo, ubicada en Catambuco corregimiento de Pasto. El número de animales es de 365 dentro de los cuales 43 están entre los 4 a 7 años de edad. Las muestras (n=30) se obtuvieron tomando como referencia una prevalencia del 50% debido a que no existe una prevalencia en la región, según la fórmula de muestreo variable aleatoria binomial, con un nivel de confianza del 95% y con un error de estimación absoluta de 10%.

$$n_o = \frac{Z^2 \cdot P \cdot q}{d^2} = \frac{(1,96)^2 \times 0,5 \times 0,5}{(0,1)^2} = 96,04$$

$$n = \frac{n_o}{1 + \frac{n_o - 1}{N}}$$

$$n = \frac{96,04}{1 + \frac{96,04 - 1}{43}}$$

$$n = \frac{96,04}{1 + 2.210326}$$

$$n = 29.916835$$

$$n = 30 \text{ muestras}$$

Donde:

$$Z = 1,96$$

$$P = 0,5$$

$$q = 1 - P$$

d = Error de estimación absoluta

N = Población a muestrear

n = Número de muestras

5.2. DISEÑO ESTADISTICO

Con los resultados obtenidos se utilizó la formula descrita por Thrusfield¹⁷⁵ para encontrar el porcentaje de casos positivos.

¹⁷⁵ THRUSFIELD, Michael. Epidemiología Veterinaria, Zaragoza: Acribia. 1990. p. 42.

$P = (\text{Número de positivos} / \text{número total de muestra}) \times 100$

Posteriormente se utilizó la fórmula de Blaha¹⁷⁶ para encontrar el límite de confianza para la prevalencia observada:

$$L.C = \frac{Z(a \frac{1}{2}) \times P \times q}{n}$$

Donde:

L.C. = límite de confianza

$Z(a \frac{1}{2})$ = límite de confianza establecido (1,96)

P = prevalencia

$q = 1 - P$

n = total de animales muestreados

5.3. VARIABLE A EVALUAR

Después de obtener la prevalencia con la prueba de Ziehl Neelsen y la prevalencia con la prueba de ELISA, se analizó los dos resultados y se determina la comparación de las mismas.

Prevalencia (Número de casos detectados): la prevalencia es un índice importante en la epidemiología y ampliamente utilizada, entre otras cosas, para determinar las necesidades médicas y sociales.

La prevalencia en un momento significa la prevalencia global de la enfermedad en un momento preciso, a pesar de que la prevalencia puede ser definida simplemente como el número de animales afectados, generalmente se expresa en términos del número de animales enfermos en relación con el número de animales existentes en la población en riesgo de tener la enfermedad.

¹⁷⁶ BLAHA, Thomas. Epidemiología Especial Veterinaria. Zaragoza: Acribia. 1995. p. 530.

Para ello se utilizó la fórmula de prevalencia que se expresa generalmente en forma de tasas:

$$\text{Tasa de prevalencia} = \frac{\text{Muestras positivas a M. A. P}}{\text{Número de muestras analizadas}} \times 100$$

5.4. TÉCNICAS PARA LA RECOLECCION Y ANÁLISIS DE LA INFORMACION

5.4.1. Toma de muestra. EL trabajo se realizó en el municipio de Pasto, en el corregimiento de Catambuco, donde se hizo un muestreo de 30 hembras bovinas entre 4 y 7 años.

5.4.2. Procedimiento de campo. se hizo una buena fijación del animal, en seguida se introdujo la mano por el ano, con una manga obstétrica, luego con una tapa de gaseosa se hizo un raspado de mucosa en la parte dorsal del recto, la muestra se colocó en un tubo de ensayo, se rotuló adecuadamente cada muestra y se transportó en refrigeración. Posteriormente, se llevó al laboratorio de la Clínica Carlos Martínez de la Universidad de Nariño, donde se efectuó el la técnica de Ácido Alcohol Resistente “Ziehl Neelsen”.

Por venopunción se obtuvo sangre de la vena coccígea media o de la yugular, dependiendo del caso, se almacenó en un tubo de ensayo sin anticoagulante y se rotuló adecuadamente cada muestra. En el laboratorio se extrajo el suero sanguíneo, para ser congelado y mandado al laboratorio médico veterinario Quios, en Bogota donde se realizó la prueba de ELISA.

5.4.3. Procedimiento de laboratorio. Las técnicas que se realizaron en este estudio fueron: Tinción de Ziehl Neelsen, en raspado de mucosa rectal, y, prueba de ELISA en suero sanguíneo.

- **Técnica de Ácido Alcohol Resistente “Ziehl Neelsen”.** Consiste en los siguientes puntos:

1. Fijar los extendidos al calor.
2. Cubrir la superficie del portaobjeto con fucsina fenicada, previamente filtrada.

3. Calentar suavemente 2 ó 3 veces sucesivas con la llama de un hisopo de algodón embebido en alcohol, pasándolo por debajo de los portaobjetos, hasta que se observe emisión de vapores. Se debe cuidar que el calentamiento sea suave y que no se produzca la ebullición del colorante. Si el volumen del colorante disminuye por evaporación, agregar más hasta cubrir el extendido. El tiempo mínimo de coloración con fucsina es de cinco minutos.
4. Cubrir la totalidad de la superficie del portaobjetos con alcohol ácido. Dejar 2 minutos como máximo.
5. Cubrir la totalidad de la superficie del portaobjetos con solución de azul de metileno, la que se dejará no menos de 30 segundos.
6. Lavar con agua corriente a baja presión.
7. Dejar secar a temperatura ambiente sobre papel absorbente limpio.

El examen microscópico del extendido se realizó con un microscopio equipado, con objetivo de inmersión (100X) y ocular 8X a 10X. Se colocó una gota de aceite de cedro entre el portaobjetos y el objetivo, dejándola caer sobre el portaobjetos sin apoyar el gotero. De lo contrario se corre el riesgo de transportar bacilos suspendidos en el aceite de un preparado a otro. Al enfocar un preparado positivo los bacilos se observaron en formas alargadas y redondeadas en acúmulos, coloreados en rojo brillante sobre un fondo azul.

La observación del extendido coloreado del material biológico investigado, se efectuó siempre de la misma manera. Por ejemplo, una vez enfocado el preparado se recorrió del extremo izquierdo al derecho, siguiendo una línea recta. La observación cuidadosa de cada campo, demandó entre diez a quince minutos.

Las placas se interpretaron de la siguiente manera: la presencia de globias se consideró positivo, y la ausencia, negativo.

• **Técnica de ELISA.** El Protocolo general para el método de ELISA intercalado:

1. Una vez descongeladas las muestras de suero sanguíneo bovino, sospechoso a paratuberculosis, se lleva al vortex para homogenizar el suero.
2. En una bandeja multiposito se realizan las diluciones de suero sanguíneo bovino, donde se coloca una pequeña cantidad de la muestra.
3. La microplaca de polietileno del kit de Elisa, contiene en el fondo del poso el antígeno a paratuberculosis.

4. Luego se pasan las muestras de la bandeja multiposos a la microplaca.
5. La microplaca se coloca en cámara húmeda, y esta a su vez se sella herméticamente, lo anterior tiene como fin que no se evaporen los posos por la temperatura.
6. Posteriormente se lleva la cámara húmeda a la incubadora, durante una hora a una temperatura de 21 grados centígrados.
7. Pasado el periodo de incubación se procede a llevar la microplaca a lavador de placas, el cual ha sido previamente programado.
8. El siguiente paso, consiste en agregar conjugado a cada uno de los posos, este conjugado es una inmunoglobulina IgG monoclonal, que en uno de sus extremos contiene una peroxidasa, la cual tiene una especificidad contra inmunoglobulinas bovinas.
9. La microplaca se introduce de nuevo a la cámara húmeda, y esta es llevada a la incubadora a una temperatura de 21 °C durante 30 minutos.
10. Pasado el periodo de incubación se lava las placas, esto con el fin de evitar falsos positivos.
11. A continuación se agrega el sustrato específico para la enzima que actúa en el conjugado, el sustrato permite detectar la cantidad de anticuerpos contra *Mycobacterium paratuberculosis*.
12. Luego se incuba en cámara húmeda a 21 °C durante 20 minutos.
13. Una vez terminada la incubación, se agrega solución deparada.
14. El color azul de la reacción, es directamente proporcional al título de anticuerpos que existen en la muestra.
15. La enzima, reacciona con el sustrato modificando su color, lo cual, puede cuantificarse mediante el cambio de la densidad óptica. Se realiza la medición en el lector de placas a 450 nm. Y los resultados se imprimen.

6. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1. PREVALENCIA DE *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*, MEDIANTE TINCIÓN DE ZIEHL NEELSEN EN RASPADO DE MUCOSA RECTAL, EN VACAS DE 4 A 7 AÑOS, EN LA FINCA UBICADA EN CATAMBUCO, PASTO, NARIÑO, COLOMBIA.

Una vez procesada las muestras y obtenidos los resultados se aplicó la fórmula para determinar la prevalencia, encontrándose los siguientes valores:

6.1.1. Total de población evaluada

$$P = \frac{3}{30} \times 100$$

$$P = 10 \%$$

Dando como resultado una prevalencia del 10 %.

Posteriormente se estableció el límite de confianza:

$$L.C. = \frac{1.96 \times (0.1 \times 0.9)}{30}$$

$$L.C. = \frac{1.26 \times (0.09)}{30}$$

$$L.C. = \frac{0.1764}{30}$$

$$L.C. = 0.00588$$

La prevalencia en el total de la población evaluada se encuentra entre el 9.42% y 10.58% de vacas que son positivas a la presencia de globias en raspado de mucosa rectal con tinción de Ziehl Neelsen.

6.2. PREVALENCIA DE *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*, MEDIANTE LA PRUEBA SEROLOGICA ELISA, EN VACAS DE 4 A 7 AÑOS, EN LA FINCA UBICADA EN CATAMBUCO, PASTO, NARIÑO, COLOMBIA.

Una vez procesada las muestras y obtenidos los resultados se aplicó la formula para determinar la prevalencia, encontrándose los siguientes valores:

6.2.1. Total de población evaluada

$$P = \frac{4}{30} \times 100$$

$$P = 13.33 \%$$

Dando como resultado una prevalencia del 13.33 %.

Posteriormente se estableció el límite de confianza:

$$L.C. = \frac{1.96 \times (0.133 \times 0.867)}{30}$$

$$L.C. = \frac{1.96 \times (0.115311)}{30}$$

$$L.C. = \frac{0.2260096}{30}$$

$$L.C. = 0.0075337$$

La prevalencia en el total de la población evaluada se encuentra entre el 12.58% y 14.05% de vacas que son positivas a la prueba serológica ELISA.

6.3. CARACTERÍSTICAS AL EXAMEN CLÍNICO.

A Los 30 animales muestreados en el hato lechero ubicado en el corregimiento de Catambuco, se les realizó un examen clínico general, enfocado principalmente al

hallazgo de cualquier síntoma relacionado con la paratuberculosis, como se indica en la tabla 3.

Tabla 3. Examen Clínico.

Nº	Animal	Presencia de síntomas de PTBC	OBSERVACIONES	RESULTADOS	
				ZIEHL NEELSEN	ELISA
1	TATIANA	NO		NEGATIVO	NEGATIVO
2	VERONIKA	NO		NEGATIVO	NEGATIVO
3	MELINA	NO		NEGATIVO	NEGATIVO
4	CAROLA	NO		NEGATIVO	NEGATIVO
5	PIRINOLA	NO		NEGATIVO	NEGATIVO
6	NEGRA	NO		NEGATIVO	NEGATIVO
7	CLARA	NO		NEGATIVO	NEGATIVO
8	ROSITA	NO	No presentó síntomas.	NEGATIVO	POSITIVO
9	MAZURCA	NO		NEGATIVO	NEGATIVO
10	PEPA	NO		NEGATIVO	NEGATIVO
11	BOTICA	NO		NEGATIVO	NEGATIVO
12	LOLA	NO		NEGATIVO	NEGATIVO
13	AZULENA	NO		NEGATIVO	NEGATIVO
14	NADIA	SI	El animal presentó diarrea, emaciación.	POSITIVO	POSITIVO
15	GABRIELA	SI	El animal presentó diarrea, emaciación.	POSITIVO	POSITIVO
16	FANTÁSTICA	NO		NEGATIVO	NEGATIVO
17	YAZMIN	NO		NEGATIVO	NEGATIVO
18	TOSCA	NO		NEGATIVO	NEGATIVO
19	TOROMBOLA	NO		NEGATIVO	NEGATIVO
20	SABANERA	NO		NEGATIVO	NEGATIVO
21	TERESA	NO		NEGATIVO	NEGATIVO
22	MONARCA	NO		NEGATIVO	NEGATIVO
23	CELESTE	NO		NEGATIVO	NEGATIVO
24	TEODORA	NO		NEGATIVO	NEGATIVO
25	BLANCA	SI	Presentó diarrea crónica, emaciación.	POSITIVO	POSITIVO
26	COCHIS	NO		NEGATIVO	NEGATIVO
27	FADUINA	NO		NEGATIVO	NEGATIVO
28	TRANSITO	NO		NEGATIVO	NEGATIVO
29	GITANA	NO		NEGATIVO	NEGATIVO
30	RUBY	NO		NEGATIVO	NEGATIVO

Por estadística descriptiva se concluye:

- Los animales con cuadro clínico, positivos a paratuberculosis fue del 10%.
- Los animales con cuadro subclínico, positivos a paratuberculosis fue del 3.3%

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1. CONCLUSIONES

- La prevalencia del *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* determinada por la presencia de globias, por el método de Ziehl Neelsen, con un margen de error del 5% y una confiabilidad del 95%; se encuentra entre el 9.42% y 10.58% para las vacas de 4 a 7 años, del hato lechero analizado, ubicado en el corregimiento de Catambuco.
- La prevalencia del *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* determinada por la prueba de ELISA, con un margen de error del 5% y una confiabilidad del 95%; se encuentra entre el 12.58% y 14.05% para las vacas de 4 a 7 años, del hato lechero estudiado, ubicado en el corregimiento de Catambuco.
- El porcentaje de prevalencia para la prueba de Ziehl Neelsen, con una sensibilidad de 36.4%¹⁷⁷, se encuentra entre el 9.42% y 10.58%, mediante procedimientos estadísticos, es posible determinar, la variabilidad de los resultados obtenidos en poblaciones más grandes, así por ejemplo, en un hato de 100 animales, de 9 a 10 vacas tendrán la posibilidad de ser detectadas.
- Para la prueba ELISA, con una sensibilidad de 42.3%¹⁷⁸, la prevalencia encontrada oscila entre los porcentajes de 12.58% y 14.05%, siguiendo los parámetros de análisis aplicados a la prueba de Ziehl Neelsen, se puede afirmar que, por ejemplo en un hato de 100 vacas, 12 a 14 vacas tendrán la posibilidad de ser detectadas.

¹⁷⁷ ZIMMER, Op. cit.,
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=10216457>

¹⁷⁸ Ibid.,
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=10216457>

- Por lo anterior se concluye, que al hacer diferenciación entre prevalencias de las dos pruebas: Ziehl Neelsen y ELISA para detectar enfermedad de Johne, 3 ó 4 animales dentro de una población de 100 vacas muestreadas, no serían detectadas por la prueba de Ziehl Neelsen, pero si por la prueba ELISA.
- El porcentaje de animales subclínicos (sin sintomatología) es de 3.3%, el cual fue detectado por la prueba de ELISA y no por Ziehl Neelsen, siendo esta característica una ventaja determinante de la prueba inmunológica de ELISA, ya que da oportunidad a detectar vacas positivas de manera temprana.
- La prueba de Ziehl Neelsen es muy confiable frente a casos clínicos de paratuberculosis, como lo confirmó la prueba serológica ELISA en 3 animales.
- La prueba de ELISA, es una prueba de tamizaje y los datos se corroboraron con el raspado de mucosa rectal.

7.2. RECOMENDACIONES

- Instaurar la prueba inmunológica de ELISA, para detección de paratuberculosis, por presentar ventajas como por ejemplo, tener una buena sensibilidad, un bajo costo y por ser una prueba rápida, así se logrará crear conciencia sobre el uso adecuado de las mejores técnicas de laboratorio para dar un certero diagnóstico de la enfermedad a un costo razonable y lo mas precozmente posible.
- La técnica de Ziehl Neelsen, en casos de diarrea no se debe dejar como última opción, cabe resaltar que 2 casos de diarrea estaban en sus estados iniciales y la prueba los dió positivos, siendo confirmado el diagnóstico con ELISA. En nuestro medio no se puede desechar esta prueba a nivel clínico y debería ser de rutina en problemas diarreicos, sin necesidad de esperar un proceso crónico.
- Los animales infectados con Paratuberculosis son considerados animales de desecho y no se deben vender a otras fincas. Ya que el periodo de incubación del agente causal, se caracteriza por ser largo y variable, permitiendo que otros animales puedan adquirir la enfermedad; por tanto se recomienda en caso de detectar vacas positivas destinarlas a matadero

inmediatamente. Y continuar realizando las pruebas de ELISA, a un intervalo de 6 meses a un año, hasta observarse tres pruebas negativas o mas.

- Dentro de la medidas del manejo animal ante la enfermedad, se recomienda que las terneras se separen de las vacas, inmediatamente después del nacimiento y sean alimentadas con calostro de vacas que han obtenido pruebas negativas a la paratuberculosis o implementar el uso de lactorreemplazadores.
- Como estrategia agresiva, en el caso de las vacas que se presentaron positivas a las dos pruebas, se recomienda eliminar las crías de estos animales, ya que la paratuberculosis puede ser transmitida por vía intrauterina.
- Realizar investigaciones anexas relacionadas con las pérdidas sanitarias, productivas y el impacto económico en los hatos con paratuberculosis. Así mismo realizar comparaciones de todas las pruebas diagnóstica, como son : PCR, cultivo fecal, AGID, histopatología, ELISA.
- Se recomienda realizar un estudio, con la prueba de ELISA, en bovinos jóvenes para encontrar animales subclínicos.
- Realizar conferencias a los profesionales y propietarios del agro, para que ellos conozcan verdaderamente la enfermedad, abarcando temas como etiología, epidemiología, mecanismo de infección, patogenia, tratamiento y control. La paratuberculosis debe interesar a los productores en general, para tomar medidas básicas de control y al mismo tiempo continuar con estudios que ayuden a confirmar la enfermedad como un problema que afecta la producción lechera.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ALCALDÍA MUNICIPAL. Plan de Ordenamiento Territorial 197-2000. San Juan de Pasto, Colombia, Editar, 1997. 350 p.

ALLEN, S. SOTOS, J. SYLTE, M. J. Y CZUPRYNSKI, C. J. Use of Hoechst 33342 Staining To Detect Apoptotic Changes in Bovine Mononuclear Phagocytes Infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology [online]. Estados Unidos: Marzo de 2001 [Enero 25 de 2004]. <<http://cdli.asm.org/cgi/content/full/8/2/460#Top>>.

ARNOTT, Rebeca. Bovine Johne's disease — common questions and answers. NSW Agriculture [online]. Australia: Julio 27 de 2001. [Junio 25 de 2004]. <<http://www.agric.nsw.gov.au/reader/nsw-agriculture>>.

BANNANTINE, John P. y STABEL, Judith R. Killing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* within macrophages. BioMed Central Microbiology [online]. 30 enero de 2002. [Abril 8 de 2004]. <<http://www.biomedcentral.com/1471-2180/2/2#IDALCWQS>>.

Bases de la respuesta inmunitaria. Asociación española de pediatría [online]. España: 7 marzo 2004. [Febrero 12 de 2004]. <<http://www.aeped.es/vacunas/pav/modulo1/03.html>>.

BEARD P. M. DANIELS, M. J. HENDERSON, D. PIRIE, A. RUDGE, K. BUXTON, D. RHIND, S. GREIG, A. HUTCHINGS, M. R. MCKENDRICK, I. STEVENSON, K. Y SHARP, J. M. Paratuberculosis Infection of Nonruminant Wildlife in Scotland. Journal of Clinical Microbiology [online]. Abril de 2001. [Marzo 3 2004]. <<http://jcm.asm.org/cgi/content/full/39/4/1517?view=full&pmid=11283080#Top>>.

BELLOLI, A. ARRIGONI, N. VACIRCA, G. PROVERBIO, D. GREPPI, G. AGOSTI, A. POZZA, O. Efficacy of two associations of antituberculous drugs in calves experimentally infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. International Association for Paratuberculosis [online]. 1992. [Mayo 11 de 2004]. <<http://www.paratuberculosis.org/proc3/page508.htm>>.

_____ First results of paratuberculosis therapy in calves experimentally infected by intravenous route. International Association for Paratuberculosis [online]. 1995. [Mayo 11 de 2004]. <<http://www.paratuberculosis.org/proc4/page144.htm>>.

BERNARDELLI, Amelia. y RODRÍGUEZ Toledo, Jorge. Manual de Procedimiento Técnico - Diagnóstico de Paratuberculosis. Asociación Argentina de Veterinaria de Laboratorio de Diagnóstico [online]. 2000. [Marzo 19 de 2004]. <<http://www.aavld.org.ar/paratub.pdf>>.

BLAHA, Thomas. Epidemiología Especial Veterinaria. Zaragoza: Acribia. 1995. 530 p.

BLOOD, D. C., y STUDDERT, Virginia P. Diccionario de veterinaria. España: McGraw-Hill – Interamericana. 1993. 1 – 1296 p.

BLOOD, D.C. y RADOSTITS, O.M. Medicina veterinaria. 7ed. México: McGraw Hill interamericana. 1992. vol 1. 777 – 784 p.

BRADFORD, P. Smith y WHITLOCK, Robert. Large animal internal medicine. 2ed. St. Louis: Mosby, 1996. p. 899 – 904.

BUERGELT, C. D. LAYTON, A. W. GINN, P. E. TAYLOR, M. J. KING, M. HABECKER, P.L. MAULDIN, E. WHITLOCK, R. ROSSITER C. Y COLLINS, M. T. The Pathology of Spontaneous Paratuberculosis in the North American Bison (*Bison bison*). Veterinary pathology [online]. 2002. [Junio 23 de 2004]. <<http://www.vetpathology.org/cgi/content/full/37/5/428#top>>.

CANONNE-HERGAUX, F. GRUENHEID, S. GOVONI, G. GROS, P. The Nramp1 protein and its role in resistance to infection and macrophage function. PUBMED [online]. Julio 1999. [Junio 10 de 2004]. <http://cmr.asm.org/cgi/external_ref?access_num=10417735&link_type=MED>.

CHAFFER, M. Y GRINBERG. The effect of sub-clinical Johne's disease on milk production, fertility and milk quality in Israel. International Association for Paratuberculosis [online]. 11 – 14 junio 2002. [Mayo 11 de 2004]. <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst7_o7.htm>.

CHIODINI, R.J. KREEGER, J.M. y THAYER, W.R. Use of rifabutin in treatment of systemic Mycobacterium paratuberculosis infection in mice. PUBMED [online]. Agosto 1993. [Junio 10 de 2004]. <<http://cmr.asm.org/cgi/ijlink?linkType=ABST&journalCode=aac&resid=37/8/1645>>

COCITO, C. GILOT, P.COENE, M. KESEL, M. de. POUPART, P. Y VANNUFEL, P. Paratuberculosis. PUBMED [online]. Julio 1994. [Junio 10 de 2004]. <<http://cmr.asm.org/cgi/ijlink?linkType=ABST&journalCode=cmr&resid=7/3/328>>.

COLLINS, Michael. Update on paratuberculosis: 2. Pathology and diagnosis. En : Irish Veterinary Journal. Vol. 56, No. 13(diciembre. 2003); 619 – 624 p.

EAMENS, Graeme. Testing for bovine Johne's disease. NSW Agriculture [online]. Julio de 2001. [Marzo 19 de 2004]. <<http://www.agric.nsw.gov.au/reader/bjd/dai89.htm#difficult>>.

FAWCETT, A.R. GODDARD, P.J. MCKELVEY, W.A. BUXTON, D. REID, H.W. GREIG, A. Macdonald, A.J. Johne's disease in a herd of farmed red deer. PUBMED [online]. 1 abril 1995. [Junio 10 de 2004]. <http://cmr.asm.org/cgi/external_ref?access_num=7661952&link_type=MED>.

FERNÁNDEZ, Pilar. Diagnostico a través de test de ELISA. e-cooprinsem [online]. 31 diciembre 2002. [Mayo 14 de 2004]. <http://www.e-cooprinsem.cl/softagri/Cooprinforma63/Articulo_6_2.htm>.

FERREIRA, R. FONSECA, L.S. LILENBAUM, W. Detection of Anti- *Mycobacterium paratuberculosis* antibodies in Brazilian herds. International Association for Paratuberculosis [online]. 11 – 14 junio 2002. [Mayo 11 de 2004]. <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst7_p7.htm>.

FREDRIKSEN, B. y JARP, J. Factors affecting the herd level of antibodies against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy. International Association for Paratuberculosis [online]. 11 – 14 junio 2002. [Mayo 11 de 2004]. <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst7_p22.htm>.

GARDNER, I.A. ANDERSON, R.J. SHIN, S. WHITLOCK, R.H. Diagnostic sensitivity of pooled fecal culture for *Mycobacterium paratuberculosis* in dairy herds. International Association for Paratuberculosis [online]. 11 – 14 junio 2002. [Mayo 11 de 2004]. <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst4_o5.htm>.

GARRY, Franklyn. WELLS, Scott. OTT, Stephen y HANSEN, Don. Who can afford a \$200 loss per cow? OR *Johne's disease* - What do I need to know?. Animal and Plant Health Inspection Service [online]. Marzo 1999. [Enero 16 2004]. <http://www.aphis.usda.gov/vs/ceah/cahm/Dairy_Cattle/johnsart.htm>.

HAMILTON, H.L. FOLLETT, D.M. SIEGFRIED, L.M. CZUPRYNSKI, C.J. Intestinal multiplication of *Mycobacterium paratuberculosis* in athymic nude gnotobiotic mice. PUBMED [online]. Enero 1989. [Junio 10 de 2004]. <http://cmr.asm.org/cgi/external_ref?access_num=2909488&link_type=MED>.

HANSEN, Don y ROSSITER, Christine. Clinical Description and Epidemiology of Johne's Disease in Cattle. Vetmed [online]. Estados Unidos: 13 marzo 2004. [marzo 3 de 2004]. <<http://www.vetmed.wsu.edu/courses-jmgay/JDPArticle1.htm>>.

HARRIS, Beth N., BARLETTA Raúl G. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. PUBMED [online]. Julio 1999. [Junio 10 de 2004]. <<http://cmr.asm.org/cgi/content/full/14/3/489#top>>.

HERMON-TAYLOR, J. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) and its relation to Crohn's disease. International Association for Paratuberculosis [online]. 11 – 14 junio 2002. [Mayo 11 de 2004]. <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst6_i1.htm>.

HINES, S.A. BUERGELT, C.D. WILSON, J.H. BLISS, E.L. Disseminated *Mycobacterium paratuberculosis* infection in a cow. PUBMED [online]. 15 marzo 1987. [Junio 10 de 2004]. <http://cmr.asm.org/cgi/external_ref?access_num=3553118&link_type=MED>.

HOMUTH, Matthias. VALENTIN-WEIGAND, Peter. ROHDE, M. y GERLACH, Gerald-F. Identification and Characterization of a Novel Extracellular Ferric Reductase from *Mycobacterium paratuberculosis*. Infection and Immunity [online]. Febrero 1998. [Marzo 19 de 2004]. <<http://iai.asm.org/cgi/content/full/66/2/710#Top>>.

HUTCHINGS, MR. y DANIELS, MJ. HENDERSON, D. GREIG, A. Potential wildlife to ruminant transmission routes for *M. a. Paratuberculosis*". International Association for Paratuberculosis [online]. 11 – 14 junio 2002. [Mayo 11 de 2004]. <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst7_o13.htm>.

JESSEP, Tim. Bovine Johne's 'Suspect' herds. NSW Agriculture [online]. Julio de 2001. [Marzo 19 de 2004]. <<http://www.agric.nsw.gov.au/reader/bjd/dai49.htm#Introduction>>.

_____. Johne's disease in cattle herds. NSW Agriculture [online]. Julio de 2001. [Marzo 19 de 2004]. <<http://www.agric.nsw.gov.au/reader/bjd/dai51.htm#Survival>>.

Johne's Information Center. [online]. Universidad de Wisconsin – Colegio de Medicina Veterinaria / Estados Unidos. 10 diciembre 2003. <<http://www.johnes.org/index.shtml>>.

JUBB, K.V.F. KENNEDY, Peter C. Y PALMER, Níger. Patología de los animales domésticos. 3ed. Montevideo: Agropecuario hemisferio Sur S.R.L. 1990. 186 p.

JUBB, T.F. GALVIN, J.W. Testing to control Johne's disease in dairy herds in Victoria. International Association for Paratuberculosis [online]. 11 – 14 junio 2002. [Mayo 11 de 2004]. <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst7_o28.htm>.

JUSTE, R.A. GEIJO, M.V. SEVILLA, I. ADURIZ, G. Control of paratuberculosis by vaccination. International Association for Paratuberculosis [online]. 11 – 14 junio 2002. [Mayo 11 de 2004]. <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst7_i1.htm>.

KALLIS, C.H.J. COLLINS, M.T. HESSELINK, J. W. BARKEMA, H.W. Rapid eradication of paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis [online]. 11 – 14 junio 2002. [Mayo 11 de 2004]. <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst7_o27.htm>.

KATAYAMA, N. KAMATA, G.S. YOKOMIZO, G.Y. Influence of ultraviolet-B (UV-B) on viability of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. International Association for Paratuberculosis [online]. 11 – 14 junio 2002. [Mayo 11 de 2004]. <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst7_p21.htm>.

KOMIJJN, Ruud E. De Haas, Petra E. W. SCHNEIDER, Margriet M. E. EGER, Tony. NIEUWENHUIJS, Jan H. M. VAN DEN HOEK, Remco J. BAKKER, Douwe. ZIJDERVELD, Fred G. Van. y SOOLINGEN, Dick van. Prevalence of *Mycobacterium avium* in Slaughter Pigs in The Netherlands and Comparison of IS1245 Restriction Fragment Length Polymorphism Patterns of Porcine and Human Isolates. Journal of Clinical Microbiology [online]. Mayo 1999. [Marzo 3 2004]. <<http://jcm.asm.org/cgi/content/full/37/5/1254#Top>>.

LUGTON, I. Mucosa-associated lymphoid tissues as sites for uptake, carriage and excretion of tubercle bacilli and other pathogenic mycobacteria. PUBMED [online]. Agosto 1999. [Junio 10 de 2004]. <http://cmr.asm.org/cgi/external_ref?access_num=10457205&link_type=MED>.

MACHACKOVA, M. LAMKA, J. YAYO AYELE W. PARMOVA, I. SVASTOVA, P. AMEMORI, T. PAVLIK, I. Infection of ruminants by uncultivable strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the Czech Republic. International Association for Paratuberculosis [online]. 11 – 14 junio 2002. [Mayo 11 de 2004]. <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst4_o1.htm>.

McDONALD W.L. O'RILEY, K. SCHROEN, C.J. CONDRON, R.J. Heat inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. International Association for Paratuberculosis [online]. 11 – 14 junio 2002. [Mayo 11 de 2004]. <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst6_o5.htm>.

MERCADO, Martinis. CICUTA, Daniela. BOEHRINGER, María E. PAOLICCHI, Silvia I. MORSELLA, Fernando. ROIBÓN, Claudia. BENITEZ, Walter R. BARCELÓ, Maria.C. MIRANDA, A. O. Paratuberculosis en ganado lechero de Corrientes. Facultad de Ciencias Veterinarias – UNNE [online]. [Junio 23 de 2004]. <<http://www.unne.edu.ar/cyt/2002/04-Veterinarias/V-059.pdf>>.

MOMOTANI, E. WHIPPLE, D. L. THIERMANN, A. B. Y CHEVILLE, N. F. Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches in calves. PUBMED [online]. 1988. [Junio 10 de 2004].

<<http://cmr.asm.org/cgi/ijlink?linkType=ABST&journalCode=vetpath&resid=25/2/131>>.

MOWAT, A.M. HUTTON, A.K. GARSIDE, P. STEEL, M. A role for interleukin-1 alpha in immunologically mediated intestinal pathology. PUBMED [online]. Septiembre 1993. [Junio 10 de 2004]. <http://cmr.asm.org/cgi/external_ref?access_num=8244450&link_type=MED>.

NICOLET, Jacques. Compendio de bacteriología medica veterinaria. Zaragoza: Acribia. 1985. 275 p.

NIELSEN, S.S. Optimisation of the sensitivity of ELISA and faecal culture for paratuberculosis: Selection of population or correction by population characteristics?. International Association for Paratuberculosis [online]. 11 – 14 junio 2002. [Mayo 11 de 2004]. <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst7_o23.htm>.

Office International des Epizooties. PARATUBERCULOSIS (Johne's disease). Office International des Epizooties [online]. 22 abril 2002. [Julio 14 de 2004]. <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00043.htm>.

OLLIS, G. W. Johne's Disease. NSW Agriculture [online]. 17 Mayo 2001. [Marzo 19 de 2004]. <[http://www1.agric.gov.ab.ca/\\$department/deptdocs.nsf/all/agdex742#Cause](http://www1.agric.gov.ab.ca/$department/deptdocs.nsf/all/agdex742#Cause)>.

PAOLICCHI, F. MORSELLA, C. VERNA, A. SPATH, E. MARTINIS, D. ZUMARRAGA, M. GIOFREE, A. CATALDI, A. ROMANO, M. Diagnosis, epidemiology, and Program of Control of Paratuberculosis in bovine herds of Argentina. International Association for Paratuberculosis [online]. 11 – 14 junio 2002. [Mayo 11 de 2004]. <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst7_p1.htm>.

PAVLÍK, I. YAYO AYELE, W. FISCHER, O. MATLOVA, L. SVASTOVA, P. BARTOS, M. MACHACKOVA, M. ALEXA, M. LAMKA, J. Role of the external environment, plants and non-vertebrates for the spread of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. International Association for Paratuberculosis [online]. 11 – 14 junio 2002. [Mayo 11 de 2004]. <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst7_o12.htm>.

PIAGGIO, J. NÚÑEZ, A. GIL, A. Johne's disease serological prevalence in Uruguayan dairy cows. International Association for Paratuberculosis [online]. 11 – 14 junio 2002. [Mayo 11 de 2004]. <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst7_p3.htm>.

QUIGLEY, JD. KOST, CJ. WOLFE, TA. Absorption of IgG in calves fed colostrum replacer products derived from bovine. International Association for

Paratuberculosis [online]. 11 – 14 junio 2002. [Mayo 11 de 2004]. <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst7_o17.htm>.

RAMÍREZ, Nicolás V. GAVIRIA, Gerardo B. RESTREPO, Luis Fernando. GÓMEZ Catalina. Diagnóstico epidemiológico referente a varias patologías de bovinos en tres haciendas de la Universidad de Antioquia. Universidad de Antioquia [online]. Enero - Mayo 2001. [Junio 23 de 2004]. <http://kogi.udea.edu.co/articulos/Med_Bovina/proyecto%20diagn%F3stico.pdf>.

RICE, Duane N. y ROGERS Douglas G. Johnes disease (Paratuberculosis). NebGuide [online]. Abril 1990. [Agosto 1 2004]. <<http://ianrpubs.unl.edu/animaldisease/g977.htm#top>>.

RODRÍGUEZ DEL ÁNGEL, Jaime. Métodos de investigación pecuaria. España: Tillas. 1997. p. 32 – 34.

ROUSSEL, A.J. THOMPSON J.A. LIBAL, M.C. STEWART, E.M. Prevalence and risk factors for paratuberculosis among beef cattle in the state of Texas, USA. International Association for Paratuberculosis [online]. 11 – 14 junio 2002. [Mayo 11 de 2004]. <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst7_o5.htm>.

SCHROEN, C.J. Factors affecting the survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in soil. International Association for Paratuberculosis [online]. 11 – 14 junio 2002. [Mayo 11 de 2004]. <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst1_o5.htm>.

SECHI, L.A. MANUELA, M. FRANCESCO, T. AMELIA, L. GIOVANNI, F. STEFANIA, Z. *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in biopsies from patients with Crohn's disease by in situ hybridization. International Association for Paratuberculosis [online]. 11 – 14 junio 2002. [Mayo 11 de 2004]. <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst6_p7.htm>.

SECOTT, T.E. LIN, T.L. WU, C.C. Fibronectin Attachment Protein Homologue Mediates Fibronectin Binding by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Infection and Immunity [online]. Abril 2001. [Marzo 19 de 2004]. <<http://iai.asm.org/cgi/content/full/69/4/2075#Top>>.

SEVILLA, I. ADURIZ, G. GARRIDO, JM y GEIJO MV. A preliminary survey on the prevalence of paratuberculosis in dairy cattle in Spain by bulk milk PCR. International Association for Paratuberculosis [online]. 11 – 14 junio 2002. [Mayo 11 de 2004]. <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst7_o1.htm>.

SIGURDARDÓTTIR, Ó. G. PRESS, C. M. y EVENSEN. Ø. Uptake of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* through the Distal Small Intestinal Mucosa in Goats: An Ultrastructural Study. Veterinary pathology [online]. 2001. [Junio 23 de 2004]. <<http://www.vetpathology.org/cgi/content/full/38/2/184#top>>.

STABEL, J. R.. Johne's Disease: A Hidden Threat!. National Animal Disease Center [online]. 30 Septiembre 1997. [Julio 31 de 2004]. <<http://jds.fass.org/cgi/reprint/81/1/283.pdf>>.

STANLEY, E.C. MOLE, R.J. Rapid detection of viable *Mycobacterium paratuberculosis* in milk using phage amplification. International Association for Paratuberculosis [online]. 11 – 14 junio 2002. [Mayo 11 de 2004]. <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst4_p7.htm>.

SWEENEY R.W. Transmission of paratuberculosis. PUBMED [online]. Julio 1996. [Junio 10 de 2004]. <http://cmr.asm.org/cgi/external_ref?access_num=8828107&link_type=MED>.

THOREL M.F. Diagnosis of *Mycobacterium paratuberculosis* in Europe. International Association for Paratuberculosis [online]. 11 – 14 junio 2002. [Mayo 11 de 2004]. <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst7_p28.htm>.

THOREL, M.F. KRICHEVSKY, M. Y LEVY-FREBAULT, V.V. Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. PUBMED [online]. 1990. [Junio 10 de 2004]. <<http://cmr.asm.org/cgi/ijlink?linkType=ABST&journalCode=ijs&resid=40/3/254>>.

THRUSFIELD, Michael. Epidemiología Veterinaria, Zaragoza: Acribia. 1990. 42 p.

VADILLO, Santiago. PÍRIZ, Segundo. MATEOS, Emilio. Manual de Microbiología Veterinaria. 1ed. Madrid: McGraw Hill-Interamericana. 2002. 507 – 518 p.

VAN SCHAİK, G.ROSSITER, C.R. STEHMAN, S.M. SHIN, S.J. SCHUKKEN, Y.H. A longitudinal study to investigate variation in ELISA and fecal culture results for *M. paratuberculosis* in commercial dairy herds in New York State. International Association for Paratuberculosis [online]. 11 – 14 junio 2002. [Mayo 11 de 2004]. <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst7_o21.htm>.

VERNA, A, MORSELLA, C. ZUMÁRRAGA, M. GIOFFRE, A. ROMANO, M. CATALDI, A. PAOLICCHI, F. Strains characterization by PCR and RFLP from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates of red deer with paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis [online]. 11 – 14 junio 2002. [Mayo 11 de 2004]. <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst1_p5.htm>.

WEISS, Douglas J. EVANSON, Oral A. MORITZ, Andreas, DENG, Ming Qi. y ABRAHAMSEN, Mitchell S. Differential Responses of Bovine Macrophages to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp.

Avium. Infection and Immunity [online]. Octubre 2002. [Marzo 19 de 2004]. <<http://iai.asm.org/cgi/content/full/70/10/5556#top>>.

WELLS, S.J. GODDEN, S. WHITLOCK, R.H. COLLINS, J. Interpretation of the serum ELISA for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* fecal shedding in dairy cattle herds. International Association for Paratuberculosis [online]. 11 – 14 junio 2002. [Mayo 11 de 2004]. <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst7_o24.htm>.

WELLS, Scott. Enfermedad de Crohn. Laboratorio Médico Veterinario Ltda. [online]. 2 agosto 2003. [Abril 8 2004]. <<http://www.lmvltda.com>>.

WILLIAMSON, Lisa. Adult Ruminant Diarrhea. Vet [online]. [23 enero 2004]. <[http://lam.vet.uga.edu/LAM/LM000155.HTML#Johnes%20Disease%20\(Paratuberculosis\)](http://lam.vet.uga.edu/LAM/LM000155.HTML#Johnes%20Disease%20(Paratuberculosis))>.

ZIMMER, K. DRAGER, K.G. KLAWONN, W. HESS, R.G. Contribution to the diagnosis of Johne's disease in cattle. Comparative studies on the validity of Ziehl-Neelsen staining, faecal culture and a commercially available DNA-Probe test in detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in faeces from cattle. PUBMED [online]. Marzo 1999. [Octubre 27 2003]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=10216457>.