



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

PARATUBERCULOSIS OVINA

SERVICIO PROFESIONAL QUE PRESENTA

PMVZ. ALBERTO MÉNDEZ AVENDAÑO

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

ASESOR: MC. JOSÉ LUIS CARLOS BEDOLLA CEDEÑO

Morelia, Mich. febrero del 2009.

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

A DIOS

Gracias por darme la oportunidad de vivir hasta esta etapa de mi vida, porque ante los obstáculos enfrentados siempre estuviste conmigo y haberme dado la oportunidad de concluir mi carrera.

A MIS PADRES

Manuel Méndez Díaz y Rosa Avendaño Montejo.

Este trabajo les dedico a mis padres por haberme apoyado durante la carrera, porque por ellos llegué hasta esta etapa de mi vida, les doy las gracias por todo el esfuerzo que hicieron y por darme el ánimo para seguir mis retos en la vida.

A MIS HERMANOS

María Isabel, Marlene, Edgar, Deysi y Mauro, quienes son mis mejores amigos, en quienes en su momento me apoyaron para salir adelante.

Y a todas las personas que de alguna manera me apoyaron para seguir adelante y lograr mi meta.

A MI ASESOR

A usted que sin pensarlo aceptó ayudarme, le agradezco por su tiempo y su conocimiento que brindo en la realización de este trabajo.

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
PARATUBERCULOSIS O ENFERMEDAD DE JOHNE	2
ETIOLOGÍA.....	3
<i>Género Mycobacterium</i>	3
Identificación	4
Historia	5
<i>MYCOBACTERIUM AVIUM</i> SUBSP. <i>PARATUBERCULOSIS</i>	7
Morfología y metabolismo	7
Micobactina	8
Cultivo	8
Resistencia y persistencia	9
EPIDEMIOLOGÍA.....	10
Hospedadores	10
Transmisión.....	11
Distribución y prevalencia	13
Pérdidas económicas	14
PATOGÉNESIS Y PATOLOGÍA.....	15
Entrada e invasión del <i>MAP</i> en el hospedador.....	16
Factores de virulencia	18
RESPUESTA INMUNE DEL HOSPEDADOR	19
SIGNOS CLÍNICOS	20

Lesiones macroscópicas	22
Lesiones microscópicas	23
DIAGNÓSTICO	24
Diagnóstico basado en las técnicas histopatológicas convencionales	25
Diagnóstico basado en la detección bacteriológica	25
Tinción y detección al microscopio	25
Aislamiento.....	26
Detección de DNA.....	27
Diagnóstico basado en la respuesta inmunológica del hospedador	27
Detección de la inmunidad celular <i>in vivo</i> : intradermorreacción	27
Prueba del IFN- γ	28
Detección de la inmunidad humoral	28
Prueba de AGID	29
Prueba de ELISA.....	29
CONTROL.....	30
TRATAMIENTO.....	31
CONCLUSIÓN	32
REFERENCIAS.....	33

INTRODUCCIÓN

La paratuberculosis o enfermedad de Johne, es una enfermedad infecciosa crónica de los rumiantes causada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*).

Afecta a rumiantes domésticos y silvestres, principalmente bovinos, ovinos, caprinos, venados, camellos y entre otros, causando en todos ellos lesiones granulomatosas en intestino y linfonodos mesentéricos que termina irremediablemente con la muerte del animal.

Desde que los individuos se infectan hasta que comienzan a mostrar signos clínicos transcurren prolongados periodos de tiempo, siendo potencialmente excretores, por lo que uno de los aspectos críticos de esta infección es su diagnóstico en el animal vivo.

Los animales suelen infectarse por la ruta fecal-oral en los primeros meses de la vida a través de pasturas contaminadas, agua o leche. También se conocen otras formas de transmisión como la intrauterina, por ingestión de leche o calostro de madres infectadas o por semen de toros infectados

Debido a la posible relación entre *M. avium* subsp. *paratuberculosis* y el desarrollo de la enfermedad de Crohn en los seres humanos, también se ha convertido la paratuberculosis de interés como una cuestión de salud pública.

El objetivo de este trabajo fue hacer una revisión de literatura sobre la paratuberculosis ovina, también conocida como enfermedad de Johne.

PARATUBERCULOSIS O ENFERMEDAD DE JOHNE

La paratuberculosis ovina también se denomina enfermedad de Johne. Se trata de una enteritis granulomatosa de curso crónico causada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*) (Bernardelli *et al.*, 2002; Raizman *et al.*, 2004; Mura *et al.*, 2006; Murphy *et al.*, 2006; Mackintosh *et al.*, 2006; Moreno *et al.*, 2007; Kruze *et al.*, 2007; Austerman *et al.*, 2007; Slana *et al.*, 2008; Robinson *et al.*, 2008; Yakes *et al.*, 2008; Möbius *et al.*, 2008; Griffiths *et al.*, 2008; Schönenbrücher *et al.*, 2008; Hughes *et al.*, 2008).

Se caracteriza por una disminución de la capacidad productiva que se induce por un proceso de mala absorción nutritiva a nivel intestinal. Esta mala absorción finalmente conduce por movilización de todas las reservas orgánicas a un estado de caquexia (Ábalos, 2001; Tejedor, 2002; Slana *et al.*, 2008; Robinson *et al.*, 2008; Yakes *et al.*, 2008).

Durante el curso de la enfermedad existe un adelgazamiento paulatino y la aparición de edemas sobre todo en la región submaxilar y pectoral así como ascitis debido a un trastorno circulatorio (Hughes *et al.*, 2007; Griffiths *et al.*, 2008).

En algunos casos, cursa con diarrea y este signo suele orientar hacia un pronóstico más desfavorable (Cirone *et al.*, 2007).

No suelen existir síntomas generales como elevación de temperatura, ni disminución del apetito, sin embargo las mucosas están anormalmente pálidas y puede aparecer caída de lana (Cirone *et al.*, 2006; Hughes *et al.*, 2007; Stabel *et al.*, 2007; Wells *et al.*, 2006).

En el ganado se caracteriza por la persistencia de la diarrea, la progresiva pérdida de peso, debilidad, y eventualmente la muerte (Möbius *et al.*, 2008; Griffiths *et al.*, 2008; Austerman *et al.*, 2007).

ETIOLOGÍA

Género *Mycobacterium*

Etimológicamente el término *Mycobacterium* procede de: *myces* = hongo y *bakterion* = pequeño bastón que significa bacterias semejantes a los hongos. Las micobacterias se encuentran incluidas dentro del orden actinomicetales dentro de la familia *Mycobacteriaceae*, que posee un único género *Mycobacterium* (Tejedor, 2002).

El agente causal de la paratuberculosis o enfermedad de Johne, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*), es una bacteria perteneciente al género *Mycobacterium* (Schönenbrücher *et al.*, 2008; Slana *et al.*, 2008; Möbius *et al.*, 2008; Stanley *et al.*, 2007; Hughes *et al.*, 2007; Herthnek *et al.*, 2006; Marsh *et al.*, 2006).

Además de micobacterias patógenas estrictas de los humanos y los animales (Semret *et al.*, 2006), como *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *M. bovis*, *M. caprae* o *Map*, también existen micobacterias patógenas oportunistas y micobacterias saprofitas ambientales. *M. avium* y *M. intracellulare* son importantes patógenos causantes de diversas enfermedades que también afectan a un amplio rango de hospedadores, entre ellos, el hombre (Sevilla, 2007; Turenne *et al.*, 2008).

Se trata generalmente de bacilos rectos o ligeramente curvados de 1-10 μ de largo y 0,2-0,6 μ de ancho, son aerobias, inmóviles y considerados Gram positivos a pesar de la escasa penetración del colorante por medio de esta técnica esto es debido a la presencia de ácidos micólicos en la compleja envoltura celular

(cápsula, la pared celular, la membrana citoplasmática), gracias a la cual poseen su característica resistencia (Tejedor, 2002; Sevilla, 2007).

Por otro lado, resultan escasamente sensibles frente a la acción de la mayor parte de los antibióticos. En contraste, algunas cepas de *M. avium* se comportan como sensibles a la penicilina (Tejedor, 2002).

Las micobacterias son microorganismos aerobios y su temperatura óptima de crecimiento se sitúa entre 30 y 45°C (Tejedor, 2002; Sevilla, 2007).

Algunas de ellas para su cultivo requieren suplementos de forma imprescindible, como la hemina, la micobactina u otros transportadores del hierro. Los medios de cultivo sintéticos suelen utilizar aminoácidos como fuente de nitrógeno y glicerol como fuente de carbono, además de sales minerales, si bien se utilizan mucho medios con huevo (entero o yema) o suero (Tejedor, 2002).

El genoma micobacteriano es rico en guanina (G) y citosina (C) (61-71%)

la clasificación taxonómica de las micobacterias, el género es el único representante de la familia *Mycobacteriaceae*, que se integra en el suborden *Corynebacterinae*, orden *Actinomycetales*, subclase *Actinobacteridae*, clase *Actinobacteria*, división *Firmacutes*, y superreino *Bacteria* (Sevilla, 2007).

Identificación

Debido a la similitud entre especies, la identificación de miembros del género es a veces dificultosa, a lo que se suma la incapacidad de los métodos microbiológicos clásicos. Los avances en métodos moleculares están facilitando este proceso, algo que resulta imprescindible a la hora de intentar controlar las infecciones causadas por estos microorganismos (Bernardelli *et al.*, 2002; Sevilla, 2007).

Los eventos evolutivos de los organismos quedan impresos en las secuencias del rARN. El análisis de estas secuencias, forma la base para la identificación de los microorganismos, La secuenciación de ciertas regiones del 16S rADN permite identificar con fiabilidad la especie a la que pertenece una bacteria en particular. Sin embargo, existen entre las micobacterias excepciones cuya secuencia es idéntica, a pesar de ser fenotípicamente diferentes (Zapata *et al.*, 2008).

Otra posibilidad con el material genético ribosómico, es la secuenciación de la región intergénica, zona muy variable aun entre grupos taxonómicos relacionados. Mediante esta técnica es posible diferenciar varios taxones intra-especie en función de las distintas secuencias que se obtienen (Tejedor, 2002; Sevilla, 2007).

Una de las técnicas más populares que se ha desarrollado es el espoligotipado que se basa en polimorfismos en un locus cromosómico caracterizado por su elevado número de repeticiones directas conservadas.

Recientemente, ha sido demostrada la utilidad de otro método denominado unidades repetitivas intercaladas micobacterianas-repeticiones en tándem de número variable, está basado en la variabilidad del número de repeticiones en tándem que al mismo tiempo conforman lo que se conoce como unidades intergénicas micobacterianas (Sevilla, 2007).

Otra posibilidad muy extendida en el tipado de micobacterias es la electroforesis en gel de campo pulsado. Se extrae todo el ADN genómico del aislamiento dentro de bloques de agarosa, se digiere con un enzima de restricción, y los fragmentos resultantes se separan en un gel de agarosa por medio de pulsos eléctricos alternos en tiempo y dirección. Esto permite separar fragmentos de gran tamaño, y se puede realizar con diferentes enzimas sobre la misma cepa, con lo que se obtienen perfiles con patrones múltiples (Sevilla, 2007; Zapata *et al.*, 2008).

HISTORIA

La paratuberculosis fue descrita por primera vez en Alemania por Johne y Frothingham (1895) en la especie bovina, en la cual la enfermedad ha sido muy bien caracterizada y está ampliamente difundida en la mayoría de los países, especialmente en rebaños lecheros (Kruze *et al.*, 2007).

En Chile, la enfermedad fue descrita por primera vez en bovinos por Grinbergs y Caorsi (1958) en la provincia de Valdivia (Kruze *et al.*, 2007; Salgado *et al.*, 2007).

Su importancia adquiere relatividad dependiendo de los avances que se hacen en el control de otras enfermedades, como brucelosis y tuberculosis (Ábalos, 2001).

En la primera descripción de la enfermedad de la paratuberculosis, el agente fue caracterizado como una micobacteria de tipo aviar (Turenne *et al.*, 2007).

Posteriormente, debido a las particularidades de la afección, pasó a considerarse como una enteritis pseudotuberculosa bovina, y la bacteria, una entidad diferenciada de la de tipo aviar y designada *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosisae Boris*. Más tarde, el microorganismo recibió la denominación de *M. paratuberculosis*. En general, la identificación de las micobacterias es dificultosa, y el desacuerdo surgido a la hora de determinar si *Map* es una especie independiente de *M. avium* o no, provocó una gran polémica en torno a su nomenclatura y situación taxonómica (Sevilla, 2007).

La paratuberculosis en pequeños rumiantes esta ampliamente distribuida en el mundo, siendo descrita por primera vez en caprinos por Twort e Ingram en Alemania (Kruze *et al.*, 2007).

En el ganado ovino, la primera descripción corresponde a Vukovic en 1908, sin embargo aparte de estas dos especies existen descripciones de la enfermedad en otros rumiantes (Tejedor, 2002; Salgado *et al.*, 2007).

Johne y Frothingham quienes establecieron esta conclusión, al observar la presencia de bacterias ácido alcohol resistente en muestras procedentes de un bovino enfermo. Koch estimó también que se trataba de un proceso distinto al de la tuberculosis eliminándose así el concepto existente hasta entonces, de clasificación como otra forma clínica de esta última enfermedad (Sevilla, 2007).

MYCOBACTERIUM AVIUM SUBESPECIE PARATUBERCULOSIS

Morfología y metabolismo

El agente causal de la paratuberculosis o enfermedad de Johne es causada por el genero *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* que se ha convertido en un problema mundial (Nielsen *et al.*, 2006; Thibault *et al.*, 2007; Stanley *et al.*, 2007; Hughes *et al.*, 2007; Schönenbrücher *et al.*, 2008; Slana *et al.*, 2008; Möbius *et al.*, 2008; Bannantine *et al.*, 2008). Es una bacteria perteneciente al género *Mycobacterium* (Sevilla, 2007).

Entre sus características más destacables se encuentran la de ser ácido alcohol resistente (Coromoto *et al.*, 2006; Tiwari *et al.*, 2006), posee un tamaño aproximado de 1-2 μm de longitud por 0,5 μm de anchura y presentar una gruesa pared lipídica que normalmente forma colonias rugosas, semejante a las del resto de las micobacterias (Tejedor, 2002; Sevilla, 2007).

Empleando el método de tinción de Ziehl—Neelsen suele adquirir una coloración uniforme, aunque a veces pueden observarse formas alargadas con fragmentos sin teñir. Así mismo, suelen aparecer agrupados formando nidos sobre todo en las preparaciones a partir de material patológico (Tejedor, 2002).

Tal y como puede observarse en extensiones de heces y tejidos, los bacilos tienden a agruparse en grumos, supuestamente debido a la disposición que adoptan al replicarse dentro de los macrófagos que infectan (Sevilla, 2007).

Los requerimientos nutricionales para el cultivo de *Map* son similares a los del resto de micobacterias. Aunque generalmente no necesiten factores de crecimiento, algunos componentes como detergentes, triglicéridos, ácidos palmítico y oleico, albúmina sérica bovina, yema de huevo o dióxido de carbono, pueden potenciarlo. Entre los minerales, los macroelementos que requieren en grandes cantidades son potasio, magnesio, azufre y fósforo. Mientras, los microelementos y oligoelementos que cabe destacar son hierro, zinc, manganeso, y molibdeno, muchas veces añadidos al medio como impurezas (Tejedor, 2002; Sevilla, 2007).

Posee una gran resistencia en el medio ambiente y pertenece al grupo de las micobacterias de crecimiento lento con requerimientos especiales (Tejedor, 2002).

Micobactina

Las micobactinas son un grupo de compuestos estrechamente relacionados entre ellos y asociados a la célula, que producen las micobacterias en condiciones limitantes de hierro, para poder transportar el metal al interior de la célula. Está demostrado que *Map* puede crecer perfectamente sin aporte exógeno de micobactina si el medio contiene suficiente hierro y otros nutrientes disponibles y que además tiene la facultad de sintetizar el sideróforo. Existen cepas de campo de paratuberculosis que son aisladas incluso con mayor facilidad en medios sintéticos sin micobactina añadida y otras de las que se ha comprobado su independencia tras sucesivos subcultivos (Sevilla, 2007).

La adición de micobactina es muy eficaz a la hora de identificar el agente en medios a base de huevo, resultando de gran utilidad a la hora de descartar otro tipo de micobacterias en estos medios, que por otro lado han demostrado ser muy sensibles para el aislamiento primario de ciertas cepas (Tejedor, 2002).

CULTIVO

El estudio de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* se ve obstaculizada por la dificultad de cultivo y manipulación del organismo en un laboratorio (Thibault *et al.*, 2007).

La principal necesidad para el crecimiento de este microorganismo, es la presencia de micobactina, para el aislamiento (Tejedor, 2002).

El cultivo es actualmente considerado como el método definitivo para la detección viable de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, sin embargo, es un organismo muy fastidioso ya que las micobacterias tienen un período largo de incubación en el cultivo hasta la fecha (Stanley *et al.*, 2007).

RESISTENCIA Y PERSISTENCIA

En comparación con otras bacterias, incluidas el resto de micobacterias, *Map* se caracteriza por su extremadamente baja actividad metabólica, lo que conlleva una velocidad de crecimiento en condiciones óptimas 24 veces inferior que la de bacterias como *Escherichia coli*, *Map* es una bacteria muy resistente a condiciones adversas (Sevilla, 2007).

La bacteria es eliminada profusamente durante la fase clínica, contamina praderas e instalaciones ganaderas, siendo muy resistente a condiciones ambientales (Álvarez *et al.*, 2006), y a desinfectantes suaves (Ábalos, 2001).

La paratuberculosis es una bacteria capaz de permanecer viable durante largos períodos de tiempo en el medio ambiente como en las aguas marinas, raíces y las superficies de las plantas, y los órganos de los animales (Mura *et al.*, 2006).

Puede permanecer viable 163 días en corrientes de agua, 270 días en charcos, 11 meses en deposiciones y suelos fertilizados, 47 meses en materia orgánica desecada (Ábalos, 2001; Sevilla, 2007).

Otro gran costo es el riesgo potencial que significa contaminar los campos ya que es posible transmitir a otros animales susceptibles, considerando que la bacteria, presente en alta o baja concentración en las heces, puede permanecer infectiva en el suelo luego de un año, protegida de la luz solar y la desecación (Bernardelli *et al.*, 2002; Merck, 2008).

La compleja pared celular de las micobacterias es relativamente resistente al agua y rica en lípidos (ácidos micólicos) que confieren el ácido-alcohol resistencia. También permanece 55 semanas en ambientes secos y sombríos, y 48 semanas en agua de presa no expuesta a luz solar (Bernardelli *et al.*, 2002; Sevilla, 2007).

Pueden recuperarse células viables después de largos períodos de congelación y es capaz de sobrevivir e incluso replicarse en el interior de protistas ambientales. Además, su resistencia le permite soportar tratamientos de esterilización aplicados a la leche y al agua destinada al consumo humano (Mura *et al.*, 2006; Sevilla, 2007).

Por el contrario, parece sensible a la luz solar, las altas temperaturas, la desecación, la elevada concentración de calcio y el hervido. También puede ser inactivado por medio de desinfectantes en suspensión acuosa como el amonio (3%), el formol (5%), compuestos cresólicos (1:32), el fenol (1:40), el bicloruro de mercurio (1:1000), el hipoclorito cálcico (1:50), el cloro, cianamida cálcica o el etanol (Sevilla, 2007).

EPIDEMIOLOGÍA

La epidemiología está ligada a las características biológicas del microorganismo de lento desarrollo, parasitismo obligado, alta resistencia ambiental, posibilidad de infección congénita (Cirone *et al.*, 2007).

Hospedadores

Se cree capaz de infectar y causar enfermedad en todos los demás rumiantes (Stanley *et al.*, 2007), (bovinos, ovinos, cabras, llamas, venados). La infección también ha sido reconocida en los omnívoros y carnívoros silvestres como conejos, zorros, comadreas (Tiwari *et al.*, 2006; Sevilla, 2007; Merck, 2008; Bannantine *et al.*, 2008), así como primates no humanos (Rhodes *et al.*, 2006).

La existencia e importancia de los reservorios silvestres no se ha determinado aún y como el rango de huéspedes posiblemente sea mucho más amplio que el conocido, si se presentaran ciclos salvajes se dificultarían aún más los programas de control (Jorge *et al.*, 2005).

Por otro lado, *Map* también ha sido implicado en la enfermedad de Crohn en los seres humanos (Chávez, 2005; Cirone *et al.*, 2006; Mura *et al.*, 2006; Jeyanathan *et al.*, 2006; Stanley *et al.*, 2007; Tanya *et al.*, 2008).

TRANSMISIÓN

Los antecedentes sobre paratuberculosis ovina a nivel internacional son escasos y mucho de lo que se sabe respecto a transmisión y respuesta inmune del huésped en estas especies se asume que es similar a la del ganado bovino, sin embargo, existen algunas diferencias importantes especialmente en relación a las características del agente etiológico, signos e histopatológica (Kruze *et al.*, 2007).

Es comúnmente transmitida por la ruta fecal-oral a través de pasturas contaminadas, agua o leche (Bernardelli *et al.*, 2002; Wells *et al.*, 2006; Griffiths *et al.*, 2008; Merck, 2008; Bannatine *et al.*, 2008).

La introducción de la enfermedad en un rebaño es a través de la ampliación o sustitución, la infección se introduce a través de la transportación de nuevos animales (Ábalos, 2001; Merck, 2008).

Los animales portadores pueden contaminar con sus heces los pastos, las aguas superficiales, ríos (Mura *et al.*, 2006), la comida y el agua, lo que provoca un alto riesgo de exposición para el resto de animales, ya sea en rumiantes domésticos o salvajes (Tiwari *et al.*, 2006).

Entre las especies no rumiantes el cerdo también puede actuar como portador. Por otro lado, en un gran número de rumiantes salvajes se ha identificado la presencia de la enfermedad. Estas especies constituirían un grupo reservorio de ciclo silvestre, sobre todo cuando se comparten pastizales con los ovinos (Tejedor, 2002).

La infección ocurre durante las etapas tempranas de vida, (Griffiths *et al.*, 2008) antes de los 4 meses de edad y tiene un período de incubación variable, ya que oscila entre 6 meses a 5 años (Chávez, 2005).

La resistencia a la infección aumenta con la edad, el ganado adulto son mucho menos propensos a infectarse (Merck, 2008).

El riesgo de infección es muy grande en explotaciones intensivas donde existe un contacto frecuente entre recién nacido y animales eliminadores (Raizman *et al.*, 2004).

En la especie ovina, la cantidad de bacterias eliminadas en heces parece estar directamente relacionada con el tipo de lesiones. De este modo, las ovejas con lesiones multibacilares excretarían los bacilos de manera constante, mientras que con otro tipo de lesiones la excreción sería intermitente (Sevilla, 2007).

La principal forma de transmisión es cuando el ternero recién nacido está expuesto en la maternidad a las hembras que tiene las ubres contaminadas con materia fecal o directamente por la ingesta de calostro o leche infectadas (Raizman *et al.*, 2004; Jorge *et al.*, 2005).

La placenta puede también suponer un vehículo de contagio en época de partos especialmente en explotaciones intensivas, por lo que se debe evitar el contacto con los recién nacidos (Tejedor, 2002; Sevilla, 2007).

Además de todas las fuentes mencionadas, *Map* también puede ser aislada de insectos, lombrices, nemátodos y amebas de vida libre, por lo que estos invertebrados también podrían tener un papel en la transmisión de la paratuberculosis, y consecuentemente, en su epidemiología (Sevilla, 2007).

El alimento almacenado, las reservas forrajeras, las fuentes de agua y los corrales pueden contaminarse directamente de los animales infectados o enfermos o indirectamente por los equipos utilizados para alimentar o distribuir el abono. Una vez que el microorganismo ingresa por la vía oral con el alimento o agua contaminado con materia fecal de animales enfermos u otra fuente de infección, se ubica en el intestino y causa inflamación con proliferación celular provocando enteritis granulomatosa (Jorge *et al.*, 2005).

La transmisión vertical prenatal ha sido suficientemente documentada y demostrada. *Map* ha sido aislada de tejidos fetales (membranas, cotiledones) y de tejidos maternos (endometrio, mucosa uterina), aunque esta posibilidad parece

ceñirse en su gran mayoría a casos de madres clínicamente enfermas (Tejedor, 2002; Sevilla, 2007).

DISTRIBUCIÓN Y PREVALENCIA

La paratuberculosis es una enfermedad de creciente prevalencia en especies ganaderas en pequeños rumiantes está ampliamente distribuida en el mundo, siendo descrita por primera vez en caprinos por Twort e Ingram en Alemania (Chávez, 2005; Kruze *et al.*, 2007).

Su prevalencia en animales productores de alimentos está aumentando a nivel mundial, causando pérdidas financieras significativas (López *et al.*, 2006).

Sin embargo, la prevalencia real de esta enfermedad puede estar enmascarada por las dificultades que plantea su diagnóstico. Las técnicas utilizadas en la detección de animales infectados en general no son especialmente sensibles, a lo que hay que añadir el largo período de latencia desde la infección hasta la aparición de síntomas, y la variabilidad del curso de la enfermedad entre animales (Sevilla, 2007).

PÉRDIDAS ECONÓMICAS

El problema de la paratuberculosis (enfermedad de Johne) plantea un problema importante económico para el sector de la carne, los productos lácteos de ovino y de las industrias en todo el mundo (Hughes *et al.*, 2007).

En virtud del carácter subclínico de la infección y de los escasos diagnósticos, la enfermedad está subestimada en nuestro país. El impacto negativo de la infección reviste importancia por su efecto sobre la economía de las explotaciones, expresada en disminución de la producción de leche, reducción del periodo de vida útil del animal y predisposición a otras patologías (Coromoto *et al.*, 2006).

En la industria láctea, la enfermedad de Johne conduce a pérdidas económicas considerables debido a una disminución en la producción de leche y la reducción de la fertilidad en animales infectados (Stanley *et al.*, 2007; Bannantine *et al.*, 2008).

El impacto económico de la paratuberculosis, las pérdidas pueden ser clasificadas como directas, indirectas o inaparentes (Ábalos, 2001; Sevilla, 2007).

Dentro de los costos directos, entrarían las pérdidas derivadas de la reducción productiva de animales clínicos y subclínicos, bien por descenso en las cantidades de leche producidas, por descenso del valor del animal en el matadero, o por el sacrificio prematuro de los mismos. Los costos derivados del control de la enfermedad, como la contratación de servicios veterinarios, la realización de pruebas diagnósticas o los generados por cambios de manejo del rebaño, también pueden clasificarse como directos (Ábalos, 2001).

Se pueden considerar costos indirectos, aquellos derivados de restricciones de acceso al mercado, los gastos de testado de animales para venta o exportación, aumento de costos de manejo y mantenimiento del estatus sanitario, etc., así como los originados por la adopción de medidas preventivas de manejo en los grupos de cría. Entre los costos inaparentes, se encuentran la pérdida de potencial genético debido al sacrificio prematuro y las restricciones en la compraventa de animales de alto valor genético. Debido tanto al desconocimiento del alcance real de la enfermedad, como a las diferencias de producción y de valoración de precios existentes entre países, no existen datos absolutamente fiables de las pérdidas que provoca la paratuberculosis (Ábalos, 2001).

En pequeños rumiantes no se cuenta con tantos estudios sobre el impacto económico de esta enfermedad. En los años 80, en Inglaterra se realizó una estimación de las pérdidas basándose en el seguimiento de un rebaño ovino con

una tasa de bajas anuales del 9%, lo que reveló unas pérdidas por sacrificio prematuro y reducción del potencial genético (Kruze *et al.*, 2007).

En explotaciones intensivas de ciervos, la paratuberculosis puede llevar a importantes pérdidas económicas por la muerte de animales. Las pérdidas que provoca en la ganadería son debidas principalmente a la muerte o desecho de los animales, así como la disminución en la productividad. Otros problemas asociados son una mayor susceptibilidad a otras infecciones, disminución en la producción de lana y costos elevados por diagnóstico (Chávez, 2005).

PATOGÉNESIS Y PATOLOGÍA

La patogénesis estudia la manera de originarse y desarrollarse una enfermedad. El agente patógeno entra en el hospedador y trata de replicarse para después ser liberado y poder diseminarse, mientras que el hospedador lucha por minimizar los daños causados y por eliminar el patógeno. Es necesario comprender con claridad la patogénesis de la enfermedad para poder llegar a prevenir la infección o tratar adecuadamente los animales infectados. En el proceso patogénico de la paratuberculosis influyen varios factores entre los que destacan los factores genéticos y el estatus inmune del hospedador (Sevilla, 2007).

En el proceso patogénico de la paratuberculosis influyen varios factores entre los que destacan los factores genéticos y el estatus inmune del hospedador.

La patología conduce a un engrosamiento del epitelio en la parte baja del intestino, causa mala absorción de nutrientes, y eventualmente la muerte de los animales afectados (Berger *et al.*, 2006).

Map es una bacteria intracelular facultativa que al infectar a especies rumiantes (Stanley *et al.*, 2007), causa la enteritis granulomatosa (Hughes *et al.*, 2008), fatal

que conocemos como paratuberculosis o enfermedad de Johne (Raizman *et al.*, 2004; Thibault *et al.*, 2007).

En el caso de la paratuberculosis, la principal fuente de infección es a partir de heces contaminadas, excretadas por animales infectados, por lo que la vía de transmisión más común es por la ingestión de agua y alimento contaminados (Tiwari *et al.*, 2006), con el bacilo, aunque también existe la infección en útero (Chávez, 2005).

La dificultad en el aislamiento de la bacteria (tiempo, cepas de cultivo complicado), el largo período de incubación de la enfermedad (ya que oscila entre 6 meses a 5 años) (Chávez, 2005), y la dificultad en reproducir las características típicas de ésta de manera experimental han obstaculizado el estudio de sus mecanismos patogénicos, con lo que el conocimiento sobre esta materia es reducido (Sevilla, 2007).

Entrada e invasión de *MAP* en el hospedador

Está ampliamente aceptado que el mecanismo natural y principal introducción de *Map* en el organismo es oral, por transmisión fecal-oral (Sevilla, 2007; Griffiths *et al.*, 2008), en animales de menos de un año (Chávez, 2005; Sevilla, 2007).

El desarrollo y la multiplicación de *Map* en la mucosa intestinal dependen de la inmunidad natural de los animales y son determinados por la capacidad de los macrófagos a reducir la multiplicación intracelular de micobacterias (Slana *et al.*, 2008).

La bacteria es capaz de diseminarse hacia sitios extraintestinales, tales como el útero, linfonodos supramamarios, ubre y órganos sexuales de machos, por lo que puede ser excretada directamente en la leche y semen (Chávez, 2005).

El motivo de que animales jóvenes sean más susceptibles a la infección que aquellos de más edad, parece residir en la extensa superficie que abarcan las placas de peyer intestinales en animales jóvenes, que va reduciéndose gradualmente con la edad, ya que ése parece ser el punto de entrada de la bacteria al organismo (Sevilla, 2007).

La infección se establece en las células M de las placas de peyer, invadiendo progresivamente la mucosa del íleon terminal, válvula ileocecal, ciego, colon proximal y ganglios mesentéricos (Ábalos, 2001; Tiwari *et al.*, 2006).

Map se localiza y reside preferentemente en fagosomas o endosomas inmaduros de los macrófagos del hospedador, con predominio de aquellos asociados a las placas de peyer ileales y yeyunales, después de traspasar las barreras de la mucosa por endocitosis (Tiwari *et al.*, 2006).

Se ha detectado la presencia de *Map* en la sangre, hígados, nódulos retrofaríngeos y mandibulares, bazos, pulmones, riñones, ubres, glándulas supramamarias, útero, testículos, epidídimo, y semen (Sevilla, 2007).

La entrada de *Map* en el organismo está mediada por las células M epiteliales que recubren las cúpulas de las placas de peyer del íleon y yeyuno y depende de la expresión de la proteína de membrana de la bacteria (Bernardelli *et al.*, 2002).

La bacteria coloniza el intestino delgado, principalmente el íleon. El microorganismo penetraría la mucosa intestinal a través de las células M del epitelio, pero evidencias recientes demuestran que en pequeños rumiantes, *Map* también lo hace a través de enterocitos. Luego, la bacteria es fagocitada por los macrófagos de la mucosa y submucosa. Allí prolifera lentamente, y se desarrolla una respuesta inmune de tipo celular temprana, caracterizada por la liberación de citoquinas proinflamatorias como gammainterferón (γ IFN) e interleuquinas 1 (IL-1)

y 6 (IL- 6), lo que induciría la aparición de células epitelioides y gigantes, causando severa inflamación del intestino (Sevilla, 2007).

Una vez que las bacterias han logrado entrar, son transportadas transcelularmente de manera libre o en leucocitos dentro de vacuolas, y posteriormente se introducen en fagosomas de macrófagos sub- e intra-epiteliales adyacentes a la placa de Peyer (Bernardelli *et al.*, 2002).

La supervivencia y replicación de *Map* dentro de los macrófagos depende del grado de activación y diferenciación de los mismos. A pesar de que los macrófagos son capaces de controlar la propagación de *Map*, grandes cantidades de la micobacteria son citotóxicas y provocan su apoptosis (Bannantine *et al.*, 2008).

Se produce una edematización de estas estructuras, adquiriendo un color pálido y aumentando de volumen, desarrollándose una hipertrofia difusa de la mucosa de yeyuno e íleon con apariencia rugosa (Ábalos, 2001).

Factores de virulencia

Se ha tratado de identificar factores de virulencia de *Map* principalmente a través de estudios sobre proteínas antigénicas de la bacteria, pues se cree que éstas son la llave de los mecanismos patogénicos, además de ser específicos (no todos) y potencialmente útiles en el desarrollo de vacunas y métodos de diagnósticos (Sevilla, 2007; Zapata *et al.*, 2008; Hughes *et al.*, 2008).

La proteína de unión a fibronectina es la responsable de la unión e internalización del *Map* en la mucosa intestinal. Las proteínas de superficie celular del *Map* son ricas en glicina son identificadas por sus dominios específicos, son importantes desde el punto de vista antigénico: proveen una variación antigénica que induce la

respuesta inmunológica del hospedero dependiente del tipo de proteína que se exprese en el *Map* (zapata *et al.*, 2008).

Respuesta inmune del hospedador

En el caso de paratuberculosis natural, tras la infección se abre una fase asintomática de dos años o más, durante la que no es posible observar una respuesta inmunológica celular ni humoral diferenciada, ni detectar la excreción de la bacteria en heces. En casos de paratuberculosis inducida experimentalmente, se ha observado la producción de anticuerpos anti-*Map* que incluso preceden a la respuesta celular inicial típica. Los estadios iniciales y subclínicos de la enfermedad se caracterizan por una alta respuesta inmune celular, mientras en estadios clínicos avanzados predomina la respuesta inmune humoral (Sevilla, 2007).

Los primeros signos de la infección son la producción de IFN y la proliferación de linfocitos en respuesta a la inoculación de antígenos micobacterianos como el derivado proteico purificado esto indica la activación de la inmunidad celular, y la excreción intermitente de la bacteria en heces (Zapata *et al.*, 2008).

Se considera que la inmunidad de protección contra *Map* viene dada por la respuesta inmune celular, con lo que esa protección depende de las interacciones entre las células T y las células presentadoras de antígeno infectadas. En la respuesta inmune celular, las células T excretan citoquinas que activan la eliminación de *Map* en los macrófagos (Stabel *et al.*, 2007; Zapata *et al.*, 2008).

Esta fase de aparente equilibrio entre patógeno y hospedador puede durar años. Al final, la respuesta celular cae y la excreción de bacterias aumenta, lo que lleva al estado clínico de la enfermedad (Ábalos, 2001).

SIGNOS CLÍNICOS

La enfermedad se caracteriza por una enteritis granulomatosa infecciosa específica (Moreno *et al.*, 2007; López *et al.*, 2006; Harris *et al.*, 2006), que se manifiesta en diarreas persistentes o recurrentes (Stabel *et al.*, 2007), que no remiten a los tratamientos y es causada por *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*, conocida comúnmente como *M. paratuberculosis* (Ábalos, 2001).

La paratuberculosis cursa principalmente en forma subclínica, tiene un largo período de incubación (Chávez, 2005; Harris *et al.*, 2006; Stanley *et al.*, 2007; Stabel *et al.*, 2007; Bannantine *et al.*, 2008), y los signos clínicos son sólo una manifestación terminal de la infección (Stabel *et al.*, 2007; Murphy *et al.*, 2006).

La infección se establece en los terneros (Stratmann *et al.*, 2006), y los primeros 30 días son los de mayor riesgo, siendo los animales mayores de 6 meses refractarios a ella. Se describe un alto riesgo post parto debido a la contaminación fecal de pezones y se recomienda la separación de animales adultos y ternero antes de las 12 horas del nacimiento (Ábalos, 2001; Coromoto *et al.*, 2006).

Los animales infectados pueden ser asintomáticos (Stabel *et al.*, 2007), y sólo el 3-10% de los animales infectados presentan signos clínicos (Hughes *et al.*, 2007).

La enfermedad presenta una fase subclínica inaparente que puede prolongarse por años. Los animales generalmente se infectan a una edad temprana, manifestándose los signos clínicos en la etapa productiva (Coromoto *et al.*, 2006).

En la fase clínica de la infección, el patógeno es eliminado en niveles más altos en las heces. Los síntomas durante la terminal, avanzada la infección celular en esta etapa de la enfermedad son diarrea crónica por ejemplo, rápida pérdida de peso, edema difuso, la reducción de la producción e infertilidad (Yakes *et al.*, 2008).

El cuadro clínico clásico de la paratuberculosis es la diarrea crónica (Hughes *et al.*, 2007; Griffiths *et al.*, 2008), siempre presente en bovinos, aparece sólo en el 10 a 20% de los casos en ovinos, cabras y ciervos donde el síntoma más evidente es la pérdida de peso, con hipoproteinemia y edema maxilar, debido al síndrome de mal absorción y atrofia muscular (Ábalos, 2001).

En los pequeños rumiantes domésticos la paratuberculosis se manifiesta, por lo general, con debilitamiento y pérdida de peso, la diarrea en los pequeños rumiantes no es frecuente, al contrario de lo que ocurre en los bovinos (Cirone *et al.*, 2007).

Está caracterizada clínicamente por diarrea, pérdida de lana, pérdida de peso, debilitamiento y finalmente la muerte; sin embargo, una gran proporción de los animales infectados presenta la condición de portadores asintomáticos (Cirone *et al.*, 2006; Hughes *et al.*, 2007; Stabel *et al.*, 2007; Wells *et al.*, 2006).

La mayoría de animales infectados en una explotación son animales subclínicos, que no muestran signos evidentes de la enfermedad (aparte de los mencionados de producción, infertilidad y mastitis, que pueden ser más o menos evidentes), aunque sí lesiones microscópicas (Yakes *et al.*, 2008).

En las especies ovinas sólo aparece en algunos casos en la fase final de la enfermedad, cuando las lesiones afectan ampliamente el intestino, y muchas veces como un sutil reblandecimiento de las heces. La caída de la producción es otro rasgo indicativo, así como el deterioro del pelo o la lana. Son característicos los edemas en papada, párpados, labios y ubres en fases terminales de la enfermedad. Otros posibles síntomas más avanzados son la formación de edemas submandibulares o en otras zonas, empalidecimiento de las mucosas, fiebre intermitente, alteración de algunos valores hemáticos y séricos, sangre en heces, anemia, caquexia extrema y atrofia muscular (Chávez, 2005).

Sólo una minoría de animales infectados presentan signos clínicos y existen factores de riesgo definidos para su establecimiento, como: producción intensiva, suelos ácidos, mala nutrición, estrés relacionado al transporte, lactancia prolongada, parto, deficiencia de elementos esenciales e inmunodepresión por agentes como el de la diarrea viral bovina. En todos los rumiantes la enfermedad clínica se caracteriza por ser afrebil, pérdida de peso progresiva hasta la emaciación, edema submandibular, mala calidad del pelaje a pesar de un buen apetito (Ábalos, 2001).

Lesiones macroscópicas

La paratuberculosis provoca lesiones macroscópicas comunes a las que se producen en otros procesos caquetizantes. En la necropsia de animales con avanzados signos clínicos puede observarse una falta muy importante de depósitos grasos que pueden mostrar atrofia de la serosa, atrofia de la masa muscular, formación de edemas, ascitis y acumulación de líquidos en otras cavidades (Tejedor, 2002; Berger *et al.*, 2006).

Las lesiones macroscópicas intestinales en ovinos no suelen ser tan evidentes como en bovinos, y a menudo no es tan aparente el típico engrosamiento de la mucosa y pared intestinales (apariencia corrugada) que se presenta en éstos últimos (Sevilla, 2007).

Cuando existen lesiones evidentes en pequeños rumiantes, por lo general se observan como engrosamiento difuso o focal (pérdida de la transparencia normal de los intestinos) (Bernardelli *et al.*, 2002; Berger *et al.*, 2006), y edema, principalmente en el íleon, ciego y colon. Los linfonódulos mesentéricos adyacentes pueden estar aumentados de tamaño, edematosos y en estados avanzados, con puntos de caseificación y calcificación. Además estarán presentes las alteraciones típicas de cualquier enfermedad consuntiva como emaciación,

ausencia de grasa corporal, deshidratación, y edema intermandibular (Sevilla, 2007).

La aparición de lesiones en otras zonas es menos frecuente. Pueden aparecer granulomas en el hígado y ganglios asociados, depleción linfoide del timo, o lesiones arterioscleróticas en corazón o aorta.

En algunos casos de ovinos el intestino puede aparecer coloreado de un tono amarillento, debido a la presencia masiva de bacilos pertenecientes a cepas pigmentadas de *Map*. Ocasionalmente se observa un color amarillento-anaranjado en las cepas ovinas pigmentadas (Bernardelli *et al.*, 2002).

Lesiones microscópicas

La lesión característica es un infiltrado celular compuesto por macrófagos, linfocitos, y células epiteloides y plasmáticas. Los macrófagos aparecen normalmente llenos de bacilos, acompañados frecuentemente de células gigantes también con numerosas bacterias en su interior. Las formas lesionales muestran una gran variabilidad, de focales a difusas, y dependen de factores como la dosis infectante, el estado inmunológico, susceptibilidad y la resistencia del hospedador (Sevilla, 2007; Liying *et al.*, 2008).

Las lesiones intestinales varían de pequeños granulomas localizados en las placas de peyer con pocas o ninguna bacteria observable con la tinción de Ziehl-Neelsen, hasta la presencia de múltiples granulomas bien organizados, con formación incluso de células gigantes, que provocan distensión de vellosidades intestinales y engrosamiento macroscópico de la mucosa intestinal, con variable cantidad de bacilos ácido alcohol resistente (Chávez, 2005).

Histológicamente, la paratuberculosis produce lesiones granulomatosas, en mucosa intestinal y linfonódulos mesentéricos. Se observan infiltraciones masivas

de bacterias ácido-alcohol-resistentes y células inflamatorias en la mucosa intestinal. Hay atrofia y fusión de las vellosidades intestinales que conducen a un síndrome de mala absorción e hipoproteinemia (Liyang *et al.*, 2008).

DIAGNÓSTICO

Sin embargo, en contraste en el caso de ganado vacuno y ovino, a menudo puede ser diagnosticada en un año y puede causar la muerte de ciervos en menores de 1 año de edad (Mackintosh *et al.*, 2006).

El costo de la prueba de la paratuberculosis es un obstáculo significativo la infección y la vigilancia de control, en particular para las industrias de los pequeños rumiantes, por el bajo valor económico de cada animal (Salgado *et al.*, 2007).

La investigación actual de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* se centra en el desarrollo de mejores herramientas de diagnóstico y vacunas para permitir la detección subclínica de los animales infectados y reducir la propagación de la enfermedad (Robinson *et al.*, 2008).

Actualmente, los métodos de diagnóstico más utilizados son aquellos basados en la detección e identificación de *Map* y los basados en la detección de la respuesta inmunológica originada en el hospedador. Los métodos clínico-epidemiológicos resultan poco específicos, y principalmente son de utilidad para asentar la sospecha. La visualización de lesiones macroscópicas relacionadas con la paratuberculosis y de los signos clínicos típicos de ésta, es un método bastante específico que sirve para establecer un diagnóstico de rebaño, pero puede ser insuficiente o simplemente impracticable para la detección de infecciones subclínicas (Sevilla, 2007).

El diagnóstico de paratuberculosis ha tenido en los últimos años grandes avances. La detección del agente mediante cultivo de deposiciones es el método definitivo de diagnóstico y aunque es lento, mediante nuevos protocolos se ha mejorado ampliamente su eficiencia. También se están desarrollando pruebas moleculares de detección de *M. paratuberculosis*, como PCR, pero que aun no tienen utilidad práctica (Ábalos, 2001).

Estas incluyen desde tinciones utilizando Zielh-Neelsen, pasando por el aislamiento, que involucra medios de cultivo mejorados y uso de micobactina , hasta pruebas de ELISA para la detección de anticuerpos y, eventualmente, la prueba de interferón gamma bovino para determinar una respuesta inmune celular (Ábalos, 2001).

El estudio de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* se ve obstaculizada por la dificultad de cultivo y manipulación del organismo en un laboratorio (Thibault *et al.*, 2007).

Diagnóstico basado en las técnicas histopatológicas convencionales

Las zonas donde más frecuentemente se asientan las lesiones son los últimos tramos del intestino delgado, y primeros del grueso, nódulos linfáticos mesentéricos y vasos linfáticos aferentes, en correspondencia con las alteraciones macroscópicas. Para detectar las alteraciones microscópicas típicas de esta enfermedad granulomatosa, se utilizan normalmente métodos rutinarios como la tinción hematoxilina-eosina, que complementada con la tinción de Ziehl-Neelsen puede revelar la presencia de los bacilos asociados a las lesiones (Sevilla, 2007).

Alternativamente el análisis post mortem, ha sido propuesto como método de diagnóstico el análisis histopatológico y bacteriológico de biopsias de ganglios o íleon (Mackintosh *et al.*, 2006).

Los métodos serológicos han mejorado; la fijación de complemento ha sido usada en bovinos, y la inmunodifusión en gel de agar es el test más eficiente en ovinos (Bernardelli *et al.*, 2002).

Diagnóstico basado en la detección bacteriológica

Tinción y detección al microscopio

Se realiza un frotis o impronta de heces o de cualquier tejido susceptible de contener las micobacterias, o bien se utilizan preparaciones de cortes histológicos. Se tiñe por medio de la técnica de Ziehl-Neelsen que se basa en la retención de la fucsina (colorante) por las bacterias ácido-alcohol resistentes, en las que a diferencia de otras bacterias, el decolorante (ácido-alcohol) no penetra, y se visualiza en el microscopio, pudiéndose observar la morfología típica de las células micobacterianas. Es útil, rápido y barato, pero tiene una baja sensibilidad y no es específico de *Map* (Sevilla, 2007).

Aislamiento

Se considera como la técnica de referencia para el diagnóstico de la paratuberculosis. El primer aislamiento de *Map* se consiguió en 1911. Desde entonces se ha tratado de mejorar la técnica del cultivo, con el objetivo de hacerlo más rápido, eficaz y sensible. Igual que en la tinción, las muestras patológicas normalmente utilizadas para el diagnóstico son heces, ganglios mesentéricos o raspados de mucosa intestinal (Sevilla, 2007; Slana *et al.*, 2008).

Cuando se trata de muestras intestinales obtenidas en la necropsia de un animal, algunos autores obtienen mejores resultados con raspados de válvula ileocecal y ganglios ileocecales o yeyunales, que con otras localizaciones (Slana *et al.*, 2008).

Generalmente el cultivo requiere un tratamiento previo de la muestra para evitar su contaminación por microorganismos que crecen más rápido que *Map*. Han sido

varios los tratamientos probados con *Map* aprovechando su elevada resistencia a ciertos agentes descontaminantes. Se han utilizado distintos compuestos corrosivos. Las muestras procedentes de pequeños rumiantes resultan más problemáticas, especialmente las ovinas. Las colonias suelen tardar más en aparecer, e incluso se habla de cepas incultivables (Sevilla, 2007).

Los medios más ampliamente utilizados para el aislamiento de *Map* son el HEY y el LJ adicionados con micobactina, y que están hechos a base de huevo. Las cepas ovinas son más difíciles de aislar que las bovinas (Ábalos, 2001).

Detección de DNA

La detección de ADN específico de un microorganismo implica su presencia en la muestra que se está analizando. Pero la técnica reina en este campo es la reacción en cadena de la polimerasa o PCR, que permite amplificar *in vitro* y de manera específica cantidades mínimas de ADN gracias a la acción de la ADN polimerasa, haciendo que puedan ser detectadas con facilidad (Sevilla, 2007; Zapata *et al.*, 2008; Bannatine *et al.*, 2008).

Gracias a este elemento genético la PCR puede ser una técnica de gran sensibilidad, ya que cada bacilo de *Map* cuenta con 14-18 copias del mismo lo que multiplica las posibilidades de detección en comparación con genes o secuencias con una única copia por genoma bacteriano. La principal ventaja que confiere la PCR sobre el cultivo es la velocidad en la obtención de resultados, además es capaz de detectar la presencia de la bacteria aun cuando no es viable en cultivo (Zapata *et al.*, 2008; Schönenbrücher *et al.*, 2008).

Diagnóstico basado en la respuesta inmunológica del hospedador

Las pruebas diagnósticas de inmunidad tratan de detectar la respuesta inmunológica que se produce en el hospedador a consecuencia de la infección (Sevilla, 2007).

Se sabe que la inmunidad celular posee un papel determinante en los mecanismos de control aunque es capaz de inducir a una respuesta humoral esta última no es crucial en los procesos de contención de la infección, sin embargo esta respuesta es de ayuda para realizar el diagnóstico de la infección sobre todo en fases avanzadas de la enfermedad (Chávez, 2005).

Detección de la inmunidad celular *in vivo*: Intradermorreacción

Se basa en la reacción inflamatoria local que se produce al inyectar intradérmicamente un antígeno en el animal infectado, como respuesta retardada de hipersensibilidad. El punto de inoculación recomendado en las especies bovina y caprina es la zona de las tablas del cuello, y en la ovina el pliegue de la cola, y el resultado se suele chequear a las 48 horas (Sevilla; 2007).

La sensibilidad de la prueba es bastante baja, y debido a las reacciones cruzadas que surgen con otras micobacterias y otros microorganismos, también se la considera de baja especificidad. Esta prueba puede dar falsos positivos en animales vacunados de paratuberculosis.

Prueba del IFN- γ

En este caso la técnica consiste en la detección de la citoquina IFN- γ que liberan los linfocitos T sensibilizados al ser estimulados con un antígeno, por medio de un ELISA con anticuerpo primario monoclonal específico (Ábalos, 2001; Sevilla, 2007).

Detección de la inmunidad humoral

Se trata de revelar la presencia de los anticuerpos que genera el sistema inmune del hospedador infectado. En la paratuberculosis actualmente se utilizan dos tipos de prueba de inmunidad humoral, la AGID y el ELISA, aunque esta última es la más extendida (Harris *et al.*, 2006).

Son técnicas rápidas, baratas, fáciles de ejecutar sin mucho equipamiento, automatizables para su uso a gran escala (ELISA), y la toma de muestras no entraña dificultades. La respuesta humoral suele ser fuerte y fácil de detectar en los estadios avanzados de paratuberculosis, por la que la sensibilidad de estas pruebas alcanza su máximo en animales con lesiones lepromatosas, con síntomas clínicos o que excretan grandes cantidades de la bacteria en sus heces.

Prueba de AGID

En un gel de agarosa se enfrenta el suero problema con un antígeno específico. Éstos difunden por el gel, y en caso de haber anticuerpos para ese antígeno, el complejo antígeno-anticuerpo precipita haciéndose visible. El antígeno utilizado normalmente para la AGID de paratuberculosis es el de la proteína protoplasmática (Sevilla, 2007).

Su baja sensibilidad se debe a la incapacidad de detectar animales con paratuberculosis subclínica, ya que detecta correctamente animales con síntomas clínicos que excretan grandes cantidades de la bacteria en las heces.

Prueba de ELISA

Existen dos tipos de ELISA, el directo, en el que se detecta un determinado antígeno por medio de anticuerpos, y el indirecto, en el que lo detectado son los anticuerpos frente a un determinado antígeno. El ELISA indirecto consiste en

capturar por unión Ag-Ac los anticuerpos presentes en un fluido biológico (suero, plasma, orina, leche) por medio de un antígeno fijado a un sustrato que sea reconocido por estos. Su revelado se realiza mediante un conjugado entre anticuerpo o proteína con afinidad específica por las inmunoglobulinas y un enzima. Su éxito radica en su bajo coste, rapidez, versatilidad, y adaptabilidad (Sevilla, 2007; Bannatine *et al.*, 2008).

La variación en la edad es un factor que puede afectar la sensibilidad de la prueba (Nielsen *et al.*; 2006).

Debido a su alta especificidad, ELISA no tiene resultados falsos positivos, lo que la hace un buen método en los comienzos de los programas de control (Bernardelli *et al.*, 2002).

CONTROL

Las medidas de control comprenden buenas prácticas sanitarias y de gestión, en los animales nuevos para identificar y eliminar los animales infectados y una vigilancia constante de los animales adultos (Raizman *et al.*, 2004; OIE, 2007; Merck, 2008).

La paratuberculosis está cada vez siendo más reconocida y que su control no se logra sólo con un diagnóstico adecuado sino con la adopción de una serie de medidas de manejo derivadas de la investigación epidemiológica de cada rebaño (Ábalos, 2001).

La medida de control en una granja se recomienda a los productores de ganado: identificación de los ganados infectados y la eliminación de la manada para evitar una mayor transmisión, la prevención de las terneras la ingestión del organismo adulto en el estiércol, la leche o el calostro, o el agua, y reducción de la

contaminación ambiental para reducir la exposición total al organismo (Raizman *et al.*, 2004).

Medir la tasa de infección del rebaño mediante pruebas serológicas, en los animales mayores a un año; Se recomienda tomar muestras de heces cada 6 meses en animales mayores de 2 años para el aislamiento de bacterias y los animales de los cuales se aíslen bacterias deberán ser eliminados (Chávez, 2005).

Enviar al rastro a todos los animales que muestren signos clínicos de paratuberculosis (Herthnek *et al.*, 2006).

Desinfectar las heces con cal hidratada al 20% (pH 11.0) para disminuir la viabilidad de la bacteria (Chávez, 2005).

La introducción de nuevos animales debería hacerse con las máximas garantías (Raizman *et al.*, 2004).

Las vías de transmisión fecal-oral (Griffiths *et al.*, 2008), y láctea deberían ser atajadas evitando o restringiendo el contacto entre madres y crías, y entre adultos y jóvenes en general, evitando el contacto de los purines con los animales, los alimentos y la bebida, realizando tratamientos efectivos del calostro y de la leche (o usar preparados artificiales), manteniendo unas buenas medidas higiénicas generales, además de eliminando o aislando los animales con sintomatología clínica (Sevilla, 2007).

Otra medida de control de la paratuberculosis que consiste en la inmunización una vez en la vida de todos los animales mayores de 2 meses, incluyendo a los que presenten signos clínicos; la vacuna estimula la inmunidad celular y controla el proceso al disminuir la tasa de eliminación bacteriana y disminuyendo por lo tanto el riesgo de infección y de reinfección así como la disminución de los casos clínicos (Chávez, 2005).

TRATAMIENTO

En general los tratamientos con fármacos en animales no son ni eficaces ni rentables, por lo que no se recomienda su uso. En el control de esta enfermedad lo más importante es llevar un manejo encaminado a evitar la introducción y la transmisión de la enfermedad en el rebaño, haciendo especial hincapié en la higiene en los partos, la separación de la reposición y de los animales infectados (Sevilla, 2007).

No hay ningún tratamiento eficaz para los animales clínicamente afectados se venden normalmente a masacre (Raizman *et al.*, 2004).

Únicamente sería aceptable para la recuperación temporal de animales de alto valor genético, teniendo en cuenta que los animales tratados pueden suponer un importante foco de contagio, pues aunque su situación clínica puede mejorar durante el suministro de los fármacos, la excreción de micobacterias en heces continúa (Sevilla, 2007).

CONCLUSIÓN

La importancia de esta enfermedad radica en las pérdidas económicas que conlleva en los rebaños de pequeños y grandes rumiantes, debidas principalmente a sacrificios, disminuciones de la producción, trastornos reproductivos y mayor incidencia de infestaciones parasitarias.

Debido a las características epidemiológicas de la enfermedad, los programas de control de paratuberculosis son complejos, de alto costo y a largo plazo, y requieren de pruebas diagnósticas eficientes para detectar el mayor número posible de animales infectados.

Si a estos aspectos se suma la falta de familiaridad de los productores con la enfermedad, la ausencia de programas de control y regulación del movimiento de animales a nivel regional y nacional, es posible esperar que la paratuberculosis continúe diseminándose.

El control de la enfermedad en los rumiantes domésticos depende de la detección oportuna y de la eliminación de los animales afectados. Esto último se ve limitado por falta de un diagnóstico adecuado.

La principal estrategia de acción sanitaria es aumentar la reposición con animales serológicamente negativos y no utilizar hijas de hembras enfermas aunque tengan serología negativa. Con esta acción se desplaza paulatinamente a los lotes donde existen enfermos clínicos y con serología positiva.

Es importante destacar que algunos investigadores consideran que la paratuberculosis se transmite al hombre en especial a los niños por el consumo de leche. Por lo que se recomienda tener precaución en el manejo de los animales enfermos y evitar el consumo de leche proveniente de animales enfermos.

REFERENCIAS

Ábalos P. 2001; Actualidad en paratuberculosis. En línea [consultado: 20 de octubre de 2008] www.tecnovet.uchile.cl/CDA/tecnovet_articulo.

Álvarez J., Lucía de J., Romero B. and Bezos J. 2006. Comparison of Four Different Culture Media for Isolation and Growth of Type II and Type I/III *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Strains Isolated from Cattle and Goats. Applied and environmental microbiology. Vol. 72(9): 5927–5932.

Austerman S., Stabel J. R. and Morriscal D. G. 2007. Skin test and gamma interferon enzyme-linked immunosorbent assay results in sheep exposed to dead *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* organisms. J Vet Diagn Invest. Vol. 19: 88–90.

Bannantine P. J., Paustian M. L., Waters W. R., Stabel J. R., and Palmer M. V., Lingling L., and Kapur V. 2008. Profiling Bovine Antibody Responses to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Infection by Using Protein Arrays. Johne's disease is responsible for severe economic losses to the. Vol. 76(2) 739–749.

Berger S., Dominik H., Bannantine J. P. and Griffin, J. F. 2006. Isolation of High-Affinity Single-Chain Antibodies against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Surface Proteins from Sheep with Johne's disease. Clinical and vaccine immunology. Vol. 13(9): 1022–1029.

Bernardelli A., Cicuta M. E., Nicola A., Roibón W. R., Boehringer S. I., Benítez M. C., Barceló MC., Alonso B., Alonso Z., Schneider M., Zumárraga M., Estéves M. J. 2002. Paratuberculosis ovina en Corrientes Argentina. En línea [Consultado: 16 de noviembre de 2008] www.unne.edu.ar/Web/cyt/cyt/2002/04-Veterinarias/V-058.pdf.

Cernicchiaro N., Wells S. J., Janagama H. and Sreevatsan S. 2008. Influence of Type of Culture Medium on Characterization of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Subtypes. *Journal of clinical microbiology*. Vol. 46(1): 145–149.

Chávez G. 2005. Control de la paratuberculosis en ovinos y caprinos. En línea [Consultado el 02 de noviembre del 2008] www.conasamexico.org/mesa4Introducción.

Coromoto A., Morela R. C., y Alberto V. 2006. Caracterización de la paratuberculosis bovina en ganado doble propósito de los llanos de Monagas, Venezuela. *Zootecnia trop*. Vol. 24(3): 321-332.

Cirone K., Morsella C., Colombo D. 2006. Viabilidad de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en la maduración de quesos caprinos y bovinos. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam*. Vol. 40(4): 507-513.

Griffiths A. T., Rioux K., and Jeroen B. 2008. Sequence Polymorphisms in a Surface PPE Protein Distinguish Types I, II, and III of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Journal of clinical microbiology*. Vol. 46(4): 1207–1212.

Harris N. B., Payeur J., Vivek K., and Sreevatsan S. 2006. Short-Sequence-Repeat Analysis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium* Isolates Collected from Animals throughout the United States Reveals Both Stability of Loci and Extensive Diversity. *Journal of clinical microbiology*. Vol. 44(8): 2970–2973.

Herthnek D. and Göran B. 2006. New PCR systems to confirm real-time PCR detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. En línea [consultado el 02 de enero del 2009] www.biomedcentral.com/1471-2180/6/87.

Hughes V., Smith S., Garcia-S., Sales j., and Stevenson K. 2007. Proteomic comparison of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* grown in vitro and isolated from clinical cases of ovine paratuberculosis. *Microbiology*. Vol. 153:196–205.

Hughes J., Denham S., Smith S., Garcia S., Sales J., Paustian L., Kevin M., and Stevenson K. 2008. Proteome-determined *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*-specific proteins: immunogenicity in ovine paratuberculosis. [Citado el 29 de octubre del 2008] <http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx>.

Jaimes G., Santillán F., Hernández C., Córdova L., Guzmán R., Arellano R., Díaz A., Renoir G., Cuéllar O. 2008. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by nested-PCR of ovine fecal samples. *Vet. Méx.* Vol. 39 (4).

Jeyanathan M., Alexander C., Turenne Y., Girard C., and Behr A. 2006; Evaluation of in Situ Methods Used to Detect *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Samples from Patients with Crohn's Disease. *Journal of clinical microbiology*. Vol. 44 (8): 2942–2950.

Jorge M. C., Traversa M. J., Schettino D. M., Fresneda K. y Mendivil I. M. 2005. Epidemiología e importancia económica de la paratuberculosis bovina. En línea [citado el 20 diciembre del 2008] www.produccion-animal.com.ar.

Kruze J., Salgado M., y Collins M. 2007. Paratuberculosis en rebaños caprinos chilenos. *Arch. Med. vet.* Vol. 39(2): 147-152.

Liyong L., Brandon L., Plattner, and Hostetter M. 2008. Live *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and a Killed-Bacterium Vaccine Induce Distinct Subcutaneous Granulomas, with Unique Cellular and Cytokine Profiles. *Clin. A. ical and vaccine immunology*. Vol. 15(5): 783–793.

López P., Sevilla A., Garrido J., Aduriz G., Guamis B., Juste R., and Sagués R. 2006. Inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Cow's Milk by Means of High Hydrostatic Pressure at Mild Temperatures. Applied and environmental microbiology, Vol. 72(6): 4446 – 4449.

Marsh B., Bannantine J., Paustian M. 2006. Genomic Comparison of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Sheep and Cattle Strains by Microarray Hybridization Journal of bacteriology. Vol. 188(6): 2290–2293.

Mackintosh C., O'Brien R., Bakker M., Kopečna M., Pavlik I., and Griffin J. 2006. Immunological and Molecular Characterization of Susceptibility in Relationship to Bacterial Strain Differences in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Infection in the Red Deer (*Cervus elaphus*). Infection and immunity. Vol. 74(6): 3530–3537.

Merck Veterinary Manual. 2008. Introducción de la paratuberculosis. En línea [consultado el 4 de noviembre del 2008], <http://www.merckvetmanual.com/mvm/index.jsp?cfile=htm/bc/55900.Htm&word=Paratuberculosis>.

Moreno B., Aduriz G., Garrido J., Sevilla I. and Juste R. 2007 Disseminated *Mycobacterium avium* subsp. *avium* infection in a pet Korean squirrel (*Sciurus vulgaris coreae*). Vet. Pathol Vol. 44 (1): 123–125.

Möbius P., Luyven G., Hotzel H., and Köhler H. 2008. High Genetic Diversity among *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Strains from German Cattle Herds Shown by Combination of IS900 Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis and Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit–Variable-Number Tandem-Repeat Typing. Journal of clinical microbiology. Vol. 46(3): 972–981.

Murphy T., Sommer s., Kabara E., Verman N., Kuelbs A., Saama P., Halgren R., and Coussens M. 2006. Gene expression profiling of monocyte-derived

macrophages following infection with *Mycobacterium avium* subspecies *avium* and *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Physiol Genomics*. Vol. 28: 67–75.

Mura M., Bull J., Evans H., Boumedine S., McMinn L., Rhodes G., Pickup R., and Taylor. 2006. Replication and Long-Term Persistence of Bovine and Human Strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* within *Acanthamoeba polyphaga*. *Applied and environmental microbiology*. Vol. 72 (1): 854–859.

Nielsen S. and Ersboll A. 2006. Age at Occurrence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Naturally Infected Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*. Vol. 89(12): 4557– 4566.

Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). 2007. Código Sanitario para los Animales. En línea [citado el 29 de noviembre del 2008] http://www.oie.int/esp/normes/mcode/es_chapitre_2.2.6.htm.

Raizman A., Wells J., Godden M., Fetrow J., Friendshuh K., Oakes J. 2004. Characterization of Minnesota dairy herds participating in a Johne's disease control program and evaluation of the program risk assessment tool. En línea [citado el 28 de oct. del 2008] www.elsevier.com/locate/prevetmed.

Robinson M., O'Brien R., Mackintosh C., and Griffin F. 2008. Differential Immune Responses of Red Deer (*Cervus elaphus*) following Experimental Challenge with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Clinical and vaccine immunology*. Vol. 15(6): 963–969.

Slana I., Paolicchi F., Janstova B., Navratilova P., Pavlik I. 2008. Detection methods for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk and milk products: a review. *Veterinary Medicine*. Vol. 53 (6): 283–306.

Stanley C., Richard J., Smith J., Glenn M., Barer M., McGowan, and Rees E. 2007. Development of a New, Combined Rapid Method Using Phage and PCR for Detection and Identification of Viable *Mycobacterium paratuberculosis* Bacteria within 48 Hours, Applied and environmental microbiology. Vol. 73(6): 1851–1857.

Salgado M., Kruze J., Collins T. 2007. Diagnosis of paratuberculosis by fecal culture and ELISA on milk and serum samples in two types of Chilean dairy goat herds. J. Vet Diagn Invest. Vol. 19: 99–102.

Schönenbrücher H., Abdulmawjoo K., Failing and Bulte M. 2008. New Triplex Real-Time PCR Assay for Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Bovine Feces. Applied and environmental microbiology. Vol. 74(9): 2751–2758.

Semret M., Turenne C., Haas P., Desmond M., Collins, and Behr A. 2006. Differentiating Host-Associated Variants of *Mycobacterium avium* by PCR for Detection of Large Sequence Polymorphisms. Journal of clinical microbiology. Vol. 44 (3): 881–887.

Sevilla A. I. 2007. Caracterización molecular detección y resistencia de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Tesis de doctorado. Vitoria-Gasteiz: Eusko Jaurlaritzaren Argitalpen Zerbitzu Nagusia. Universidad del País Vasco. 230pp.

Stratmann J., Dohmann K., Heinzmann, and Gerlach F. 2006. Peptide Mediated Capture PCR for Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Bulk Milk Samples, Applied and environmental microbiology. Vol. 72(8): 5150–5158.

Tejedor M., 2002, Estudio epidemiológico de la Paratuberculosis Ovina en la provincia de Segovia. En línea [citado el 28 de diciembre del 2008] <http://www.ucm.es/BUCM/tesis/19911996/D/2/AD2002201.pdf>.

Thibault C., Maggy G., Boschioli M., Hubbans C., Overduin P., Stevenson K., Gutierrez M., Supply P., and Biet F. 2007. New Variable-Number Tandem-Repeat Markers for Typing *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. Avium* Strains: Comparison with IS900 and IS1245 Restriction Fragment Length Polymorphism Typing. *Journal of clinical microbiology*. Vol. 45(8): 2404–2410.

Tiwari A., John A., Leeuwen V., Shawn L., McKenna, Keefe G., Barkema H. 2006. Johne's disease in Canada Part I: Clinical symptoms, pathophysiology, diagnosis, and prevalence in dairy herds. *Can Vet J*. Vol. 47: 874–882.

Turenne C., Wallace R., and Behr A. 2007. *Mycobacterium avium* in the Postgenomic era. *Clinical microbiology reviews*. Vol. 20(2): 205–229.

Turenne C., Desmond M., Collins, D., Alexander, and Marcel A. 2008. *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* and *M. avium* subsp. *avium* Are Independently Evolved Pathogenic Clones of a Much Broader Group of *M. avium* Organisms, *journal of bacteriology*. Vol. 190(7): 2479–2487.

Wells J., Michael T., Collins, Kay S., Faaberg, Wees C., Tavoranpanich S., Petrini R., James E., Collins, Cernicchiaro N., and Whitlock H. 2006; Evaluation of a Rapid Fecal PCR Test for Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Dairy Cattle. *Clinical and vaccine immunology*. Vol. 13(10): 1125–1130.

Yakes B., Lipert J., Bannantine P., and Porter D. 2008. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by a Sonicate Immunoassay Based on Surface-Enhanced Raman Scattering. *Clinical and vaccine immunology*. Vol. 15(2): 227–234.

Zapata R., Rodas G., Maldonado E. 2008. Paratuberculosis bovina: situación real de la enfermedad en la ganadería colombiana. *Rev. Colom. Cienc. Pecuaria*. Vol. 21(3).