



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**DETECCIÓN DE *MYCOBACTERIUM AVIUM* SUBSP. *PARATUBERCULOSIS* EN
CAPRINOS DE LA REGIÓN METROPOLITANA**

XIMENA ALEJANDRA GUTIÉRREZ DUPRAT

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina Preventiva

PROFESOR GUÍA: Dr. PEDRO ÁBALOS

Santiago, Chile

2005

INDICE

Páginas

Agradecimientos.....	1
Resumen.....	2
Summary.....	3
Introducción.....	4-5
Revisión Bibliografía	
1. Definición general de la enfermedad.....	6
2. Característica de la bacteria.....	6-9
3. Epidemiología.....	9-10
4. Transmisión.....	10-13
5. Patogénesis.....	13-15
6. Signos clínicos.....	15-16
7. Histopatología.....	16-17
8. Patología.....	17-18
9. Zoonosis.....	18-20
10. Diagnóstico.....	20-25
11. Vacunación.....	25-26
12. Control.....	26-27
Hipótesis	28
Objetivos	28
Material y Método	
1.- Población objetivo para el muestreo.....	29
2.- Obtención de las muestras.....	29-30
3.- Método de cultivo.....	30
3.21.- Medio de cultivo.....	30
3.22.- Procesamiento de las muestras.....	30-31
3.23.- Siembra del cultivo.....	31
3.24.- Identificación de las cepas.....	31
Resultados	32-34
Discusión	35-38
Conclusiones	39
Bibliografía	40-50
Anexo 1.....	51
Anexo 2.....	52-53
Anexo 3.....	54-55
Anexo 3.....	54-55

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a todas aquellas personas que hicieron posible la realización de este estudio en especial al Dr. Juan Lazo Quezada, experto capriota, que me ayudó en su mayoría a la obtención de las muestras, también al Dr. Richard Arancibia, ya que ambos con amabilidad me permitieron visitar sus rebaños a cargo y por supuesto a los productores que accedieron a ello.

Agradezco también al Dr. Abalos por haberme permitido realizar este estudio, por su paciencia, acogida y sus siempre buenos deseos y palabras de aliento en momentos difíciles.

Y por último y no menos importante quiero agradecer la gentileza y buena disposición en todo momento del Sr. Patricio Toledo D. Y al Sr. Humberto Antilef que siempre tuvieron una muy buena disposición frente a mis peticiones creando un ambiente agradable de trabajo.

RESUMEN

La Paratuberculosis es una enfermedad infecto contagiosa crónica con un largo período de incubación causada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), que afecta principalmente a los rumiantes, generando diarrea en algunas especies, caquexia y debilitamiento progresivo y como consecuencia, pérdidas económicas en los rebaños. También infecta a animales silvestres que actuarían como posibles reservorios y se le asocia un posible potencial zoonótico, habiendo sido aislada la bacteria en algunos pacientes con la Enfermedad de Crohn, siendo el posible vehículo de infección la leche, ya que esta bacteria resistiría la pasteurización.

En este estudio se trata de detectar la presencia de *Mycobacterium paratuberculosis* desde heces de caprinos de la región Metropolitana.

Se realizaron cultivos bacteriológicos para *M. paratuberculosis* según recomendaciones del Australian Standard Diagnostic Techniques (ASDT) y con las modificaciones que permiten una mejor eficiencia en la recuperación de la bacteria. El medio de cultivo para aislamiento primario es el medio de Herrold con yema de huevo (HEYM) más mycobactina J.

Se tuvo acceso a 10 rebaños donde se seleccionaron el número de animales en múltiples de cinco, tratando de abarcar el 25% de la población de cada rebaño. Se recolectaron muestras directamente desde el recto, tomando 1 a 2 heces de cada caprino, que se depositaron en bolsas de plástico estéril agrupándose en "pools" de cinco animales. Para tener una mayor probabilidad de detectar rebaños caprinos infectados con MAP, se consideraron hembras mayores de un año, y en lo posible animales que hayan presentado signos de diarrea, debilitamiento, pérdida de peso progresiva, disminución de la producción láctea, etc. Se comprobó la presencia de MAP desde heces de caprinos de la Región Metropolitana en 3 rebaños de los 10 muestreados, encontrándose un 18% de los "pools" positivos a MAP. El medio HEYM más la adición de mycobactina J demostró claramente ser muy efectiva para el aislamiento del MAP a partir de muestras de heces de animales que ya estaban diseminando el microorganismo.

SUMMARY

Paratuberculosis is a chronic contagious infectious disease with a long incubation period caused by *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* (MAP) that affects domestic and wild ruminants causing a granulomatous enteritis with progressive, severe weight loss, debilitation and profuse diarrhea in some species with great economic impact in flocks. Also it affects wild animals that would act like possible reservoirs. In Humans, is considered to be a potential etiologic agent in cases of Crohn's disease. The dairy products constitute the vehicle for human exposure to MAP which could resist pasteurization. The definitive method of diagnosis is the culture of the organism from fecal specimens. MAP can be differentiated from other mycobacteria by its characteristics in culture, slow growth and dependence of mycobactina. This study was to detect and to isolate to the *Mycobacterium paratuberculosis* from feces of goat of the Metropolitan Region. Bacteriological cultures for MAP were made according to recommendations of Australian Standard Diagnostic Techniques (ASDT) and with modifications proposed by Whitlock and Rosenberger (1990) that allow one better efficiency in the recovery of the bacteria. The culture for primary isolation was made in Herrold's egg yolk medium (HEYM) with addition of mycobactina J, in tubes of agar. In each flock the number of animals in multiples of five was selected, trying to include 25% of the population of each flock. Samples were collected directly from rectum, taking 1 to 2 feces from each goat one, that were deposited in sterile plastic bags and properly identified. A pool of feces from every 5 animal were taken and this was the sample processed. To have a better probability of detecting infected goat flocks with MAP, animals that presented greater risk of being infected, old females and animals that have developed diarrhea, weakening, progressive loss of weight, diminution of the milky production were selected. The MAP presence was verified from feces of goat of the Metropolitan Region in 3 flocks of the 10, being a 18% of "pools" positive to MAP. The HEYM plus the addition of mycobactina J demonstrated clearly to be very effective for the isolation of the MAP from animal feces samples.

INTRODUCCIÓN

La paratuberculosis es una enfermedad de ocurrencia mundial y puede causar pérdidas económicas debido a su alta morbilidad, reducción en la producción de leche, incremento de reemplazos prematuros y costo de los procedimientos de diagnóstico y medidas de control.

También es conocida como enfermedad de Johne, en honor a su descubridor. Es una enfermedad infecciosa de carácter crónico que afecta el sistema digestivo de los rumiantes generando debilitamiento, caquexia y diarrea en algunas especies. Infecta principalmente a rumiantes domésticos como bovinos, ovinos, caprinos y camélidos, aunque también afecta a algunos de vida silvestre como ciervos, alces y bisontes. El agente etiológico se ha descrito en otros animales domésticos y salvajes, incluyendo los primates. A pesar que no es clasificada como un agente zoonótico ha sido identificada en biopsias de tejido intestinal de pacientes humanos con la Enfermedad de Crohn y en un paciente con SIDA.

La enfermedad es producida por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), bacteria que tiene propiedades biológicas que la hacen resistente a los agentes físicos y químicos del medio ambiente y que también tiene la particularidad de resistir la pasteurización. Por ello es que esta siendo sujeto de debate en la comunidad médica, científica y en la industria lechera ya que se ha sugerido que la leche sería el posible vehículo de transmisión del microorganismo a los seres humanos.

En el ganado caprino, al cual se enfocará el presente estudio, la enfermedad se manifiesta con una pérdida de peso progresiva siendo muy rara la presencia de diarrea. Todos los animales son más susceptibles de contraer la infección en los primeros meses de vida, siendo la principal vía de transmisión las heces de animales infectados y también a través de la leche y el calostro. Los signos clínicos se manifiestan en la vida adulta, luego de un período de incubación de 2 a 4 años. El diagnóstico de la enfermedad clínica no suele ser problemático, ya que la mycobacteria se elimina por las heces en cantidades tan grandes que la hacen fácilmente detectable, no así en su fase subclínica.

Para el aislamiento de la bacteria se requiere la descontaminación de las muestras, además de un medio especial con mycobactina J y una incubación de ocho semanas o más, lo que la diferenciaría de las otras mycobacterias. Este es un procedimiento largo, laborioso, demandante de mucho tiempo y de fácil contaminación, siendo esto el único problema como método de diagnóstico.

En Chile, la enfermedad en el bovino fue descrita en 1958, en el sur del país y posteriormente son escasos los trabajos nacionales en la materia. En el año 2002 fue aislado el agente en el ganado caprino de la IV Región por el Laboratorio de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

El interés es ahora poder detectar la infección en el ganado caprino de la Región Metropolitana, por la importancia que está cobrando la enfermedad a nivel mundial y sobre todo su ocurrencia en el ganado caprino, especie en la que existe escasa información y que cada vez se posiciona mejor en el mercado a través de sus productos lácteos y cárnicos. Además, se probará un método que facilite su diagnóstico.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Definición general de la enfermedad

La paratuberculosis fue descrita por primera vez en el ganado bovino en 1895, por Johne y Frothingham como una enteritis crónica del ganado. En ese momento se asumió que por ser un bacilo ácido alcohol resistente, era una forma modificada del *Mycobacterium tuberculosis* o *Mycobacterium avium*, es decir que la enfermedad era una forma intestinal de la tuberculosis (Valentin-Weigand y Goethe, 1999; Harris y Barletta, 2001). Tomó 11 años hasta que Bang diferenció esta enfermedad intestinal de la tuberculosis y otros seis años más para que Twort e Ingram describieran la microbiología exacta de la bacteria y cumplieran a cabalidad los postulados de Köch. Recientemente ha sido reclasificada como *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) debido a la cercana relación genética con *Mycobacterium avium* subsp. *avium* (MAP) (Cocito *et al.*, 1994; Valentin-Weigand y Goethe, 1999; Harris y Barletta, 2001; Yayo Ayele *et al.*, 2001), pero se le nombra corrientemente como *Mycobacterium paratuberculosis* y a la enfermedad también se le conoce como enfermedad de Johne.

La paratuberculosis es una infección de importancia económica y epidemiológica en el ganado doméstico y de vida silvestre que afecta primariamente al tracto digestivo. La infección conlleva a un debilitamiento gradual que finaliza con la muerte. En el ganado caprino la enfermedad fue descrita en 1912 por Twort e Ingram (Cocito *et al.*, 1994; Tafti y Rashidi, 2000), destacándose que la diarrea, que es un signo cardinal en el ganado bovino, es poco común en los caprinos (Smith y Sherman, 1994).

2. Característica de la bacteria

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* pertenece específicamente a la familia Mycobacteriaceae, taxonómicamente se agrupa junto a *Corynebacterium*, *Nocardia* y *Rhodococcus*. Es un bacilo, gram positivo (+) y ácido alcohol resistente, de crecimiento lento y un patógeno intracelular facultativo (Cocito *et al.*, 1994; Grant *et al.*, 1996; Tafti y Rashidi, 2000; Collins, 2003a) ya que depende de sus huéspedes para la obtención de hierro, que es utilizado en

su crecimiento y multiplicación (Kennedy y Benedictus, 2001).

Está rodeado por una pared celular tripartita compleja y rica en lípidos y polisacáridos, característica de esta familia bacteriana que la capacita de resistir por largo tiempo en el medio ambiente, dándole poca permeabilidad a ciertos antibióticos (Valentine-Weigand y Goethe, 1999; Manning y Collins, 2001; Kennedy y Benedictus, 2001; Schoren *et al.*, 2002; Fus *et al.*, 2003).

Tiene similitudes genéticas tanto de ADN como de secuencias ribosomales, con *Mycobacterium avium* subsp. *avium* establecidas por estudios de hibridación de ADN, la secuencia de inserción IS900 lo diferencia de esta última y de otras mycobacterias, además por diferencias fenotípicas como son la tasa de crecimiento, las características de cultivo y su dependencia de mycobactina, además de su patogenicidad, tipo de animales infectados y el sitio de infección (Yoshimura y Graham, 1988; Collins, 1997; Harris y Barletta, 2001; Bannantine, 2003).

Es una bacteria pequeña (0,5 x 1,0 µm) comparado con otras mycobacterias y tiende a agruparse, tanto dentro de los macrófagos como en estado libre a nivel de la mucosa intestinal (Smith y Sherman, 1994). El único lugar donde puede multiplicarse es al interior de los macrófagos y puede persistir por un tiempo prolongado en las heces pero sin poder multiplicarse (Tooker *et al.*, 2002; Collins, 2003a).

En cultivos, forma colonias rugosas e incoloras, necesitando de medios especiales como el agar Herrold con yema de huevo para aislamiento primario (Kennedy y Benedictus, 2001; Collins, 2003a), agar Watson-Reid o Middlebrook para mantención y producción de cultivos. Toma usualmente, 8-12 semanas observar un crecimiento visible. Un tiempo largo comparado con el crecimiento de otras mycobacterias, especialmente atípicas (Stephens, 1993; Cocito *et al.*, 1994; Eriks *et al.*, 1996; Valentin-Weigand y Goethe, 1999; Kennedy y Benedictus, 2001; Collins, 2003a) . Una característica especie específica de MAP es su crecimiento dependiente de mycobactina J, un sideróforo necesario para la obtención de hierro desde el entorno en aislamientos (Stephens, 1993; Cocito *et al.*, 1994; Eriks *et al.*, 1996; Valentin-Weigand y Goethe, 1999; Kennedy y Benedictus, 2001).

Los mecanismos por lo que la mycobacteria causa la enfermedad aún no están claros, según Tooker *et al.* (2002), esto puede ocurrir porque: 1) la mycobacteria puede interferir con la expresión proteica del huésped deteniendo la maduración de sus vesículas; 2) puede interferir de una manera directa con la expresión proteica encargada de la activación de macrófagos o 3) al ingresar al interior de ellos puede abolir su activación mediante la utilización de receptores por mecanismo desconocidos. Los cambios patológicos ocurren por la acción tóxica de los componentes de la pared celular y por la respuesta inmunológica del huésped frente al MAP (Collins, 2003a).

La etiología de la paratuberculosis se conoce por décadas, lo que ha costado esfuerzo conocer es la patogénesis y la epidemiología de la enfermedad. Debido a la carencia de métodos sensibles capaces de diferenciar las distintas variedades o cepas del MAP. Las características fenotípicas y genéticas como son la morfología y pigmentación de la colonia, reacciones bioquímicas y componentes de la pared celular, son criterios confiables para tipificar muchos otros microorganismos pero inadecuadas para tipificar las distintas cepas del MAP (Bauerfeind *et al.*, 1996)

Para diferenciar las distintas cepas del MAP se ha utilizado la secuencia de inserción específica llamada IS900 aplicada en el análisis de polimorfismo en los fragmentos de restricción (RFLP), estableciéndose diferencias entre cepas, clasificando tres patrones distintos llamados C (cattle), S (sheep) e I (intermediate). Uno de los grupos ha sido aislado exclusivamente en ovejas y cabras, el otro detectado comúnmente en los bovinos pero que también se ha aislado en caprinos y ovinos, cada uno de ellos tiene características fenotípicas y genéticas propias, siendo la técnica utilizada una herramienta epidemiológica para conocer la distribución de estas cepas, posible origen de infección e infecciones interespecie tanto entre animales domésticos como salvajes (Collins *et al.*, 1990; Bauerfeind *et al.*, 1996; Francois *et al.*, 1997; Whittington *et al.*, 2000a; Whittington y Sergeant, 2001; Collins *et al.*, 2002; Chaves-Gris *et al.*, 2004). Este es un método sensible y es el único capaz de distinguir las distintas variedades del MAP, lo que explicaría porque la enfermedad se presenta en forma distinta entre rebaños. Lo que falta determinar es si este polimorfismo

encontrado en las variedades del MAP es la única característica asociada a las diferencias de patogenicidad y antigenicidad (Whipple *et al.*, 1990).

3. Epidemiología

Esta bacteria es la más resistente dentro de su familia, a factores físicos y químicos (Manning y Collins, 2001; Schoren *et al.*, 2002). Persiste en la paja de los corrales y en el estiércol mantenido sobre las pasturas por más de 1 año. Los desinfectantes eficaces frente a la bacteria incluyen compuestos cresólicos diluidos 1:64 y sodio orthophenylphenato diluido 1:200 (Smith y Sherman, 1994).

Los factores físicos que pueden influenciar a su sobrevivencia en el medio ambiente incluyen la temperatura, el pH, exposición a la luz ultravioleta (UV) y la humedad, tal que altas temperaturas, ambientes secos, suelos alcalinos y grandes tiempos de exposición a la luz UV y a la humedad podrían afectar su sobrevivencia (Schorén *et al.*, 2002; Whittington *et al.*, 2004)

La enfermedad de Johne se establece en el ganado doméstico o silvestre tales como bovinos, ovinos, caprinos, camélidos, ciervos, renos (Collins, 1997; Cocito *et al.*, 1994; Beard *et al.*, 2001; Yayo Ayele *et al.*, 2001) y bisontes (Burgelt *et al.*, 2000; Collins, 2003a), el agente además se multiplica en caballos y mulas teniendo el rol de propagadores asintomáticos (Cocito *et al.*, 1994; Manning *et al.*, 2003; Collins, 2003a) .

También se reportó susceptibilidad racial en el ganado bovino por ejemplo siendo más susceptibles la raza Limousin, Shorthorn y en los ovinos Shetland (Manning y Collins, 2001). También se habla de que existe una mayor patogenicidad en las hembras en relación a los machos de un mismo rebaño (Gezon *et al.*, 1988; Tafti y Rashidi, 2000).

Aparte de las especies ruminantes, se han documentado algunos casos de infección en conejos y también se ha encontrado lesiones típicas de la enfermedad de Johne en carnívoros (zorros y armiños), lo que junto con el aislamiento de la mycobacteria desde los tejidos de estos animales, indica una nueva clase de reservorio. Los carnívoros, se cree, han adquirido la infección por el consumo de conejos infectados (Manning y Collins, 2001; Beard *et al.*, 2001; Whittington y

Sergeant, 2001; Collins, 2003a, b). Reportes médicos han detectado componentes genéticos del MAP en humanos con la enfermedad de Crohn y aislamiento de componentes vivos del organismo (Collins, 2003a, b).

La paratuberculosis es una enfermedad de regiones templadas con ocurrencias esporádicas en ambientes tropicales y primariamente como resultado de importación de ganado desde áreas enzoóticas. Hoy se ha visto que la enfermedad tiene una distribución mundial. La prevalencia en el ganado caprino no esta bien documentada presumiblemente por la variedad que existe entre los países de las condiciones epidemiológicas y de manejo, la infectividad y otros factores. Por ejemplo, en Noruega, donde las cabras son mantenidas con manejo intensivo, la prevalencia serológica descrita es de un 53%, después de la introducción de programas de vacunación. En la India, generalmente con rebaños pequeños y un manejo más extensivo, estudios de necropsia han indicado una prevalencia de solo 5.2% (Smith y Sherman, 1994). El conocimiento de la prevalencia de la enfermedad de Johne en cualquier lugar o tiempo se ve dificultada debido a la imposibilidad de detectar todos los casos subclínicos. Por la misma razón, las tasas de ataque y de casos fatales son desconocidas (Stephens, 1993). Por su carácter progresivo es necesario repetir pruebas que detecten la enfermedad, ya que en las fases posteriores de ella estas se vuelven más efectivas como métodos de diagnóstico y así no subestimar la prevalencia dentro de los rebaños, entendiendo la patogénesis y la epidemiología del MAP se pueden desarrollar medidas estratégicas de diagnóstico, control y erradicación (Whittington y Sergeant, 2001) .

4. Transmisión

La transmisión del MAP ocurre preferentemente en el período neonatal a través de la ingesta de heces infectadas, por contaminación fecal de la ubre o de los pastos (Moser, 1982; Stephens, 1993; Cocito *et al.*, 1994; Harris y Barletta, 2001; Yayo Ayele *et al.*, 2001). Estudios realizados por Whan *et al.*, (2001) y Whan *et al.*, (2002), determinaron la resistencia del MAP a la cloración del agua siendo considerada también como posible ruta de transmisión. Resiste además hasta 17 meses en agua con pH neutro y disminuye su sobrevivencia en pH que fluctúan de los 5 a 8

(Manning y Collins, 2001). El organismo se propaga desde el estiércol de los adultos infectados que están en su estado subclínico o clínico eliminando la bacteria, a los animales jóvenes susceptibles que la ingieren, particularmente cuando existe sobrepoblación y malas condiciones sanitarias (Moser, 1982; Smith y Sherman, 1994).

Existe una resistencia relacionada a la edad. Los neonatos son considerados los más susceptibles debido a su inmadurez inmunitaria celular y a su inhabilidad de hacer frente a patógenos intracelulares como el MAP, particularmente cuando sus propias madres son propagadoras activas por las heces. No obstante, la resistencia relacionada a la edad no es absoluta y es probable que los adultos también corran riesgo de infectarse si se mantiene la sobrepoblación, la contaminación del entorno, exposición prolongada y altas dosis del microorganismo y otros factores estresantes (Smith y Sherman, 1994; Sweeney, 1996; Manning y Collins, 2001; Whittington y Sergeant, 2001; Collins, 2003a). Según Collins (2003a), en los pequeños rumiantes y en los ciervos los reportes clínicos sugieren que tanto a jóvenes como adultos, los infecta de la misma manera .

También se ha reconocido una transmisión congénita en aquellos casos que la hembra está cursando estados avanzados de la enfermedad y también la excreción del MAP por la leche tanto en casos asintomáticos como clínicos (Moser, 1982; Sweeney *et al.*, 1992; Stephens, 1993; Cocito *et al.*, 1994; Kennedy y Benedictus, 2001; Yayo Ayele *et al.*, 2001; Buergelt, 2003; Collins, 2003a; Manning *et al.*, 2003) También se ha aislado el agente a través del semen siendo una posible vía de contaminación a las hembras o a los fetos (Sweeney *et al.*, 1992; Manning y Collins, 2001; Yayo Ayele *et al.*, 2001).

La infección se disemina en los estados finales de la enfermedad a la sangre y a una variedad de órganos internos como nódulos linfáticos, hígado, riñón, bazo, útero, glándula mamaria y epidídimo (Sweeney *et al.*, 1992 ; Collins, 1997).

La transmisión de la enfermedad entre especies ocurre, pero está poco estudiada (Stephens, 1993), según Holstad *et al.* (2002), la paratuberculosis fue diagnosticada en dos vacas

de un mismo plantel aislándose la misma bacteria con el mismo patrón de RFLP en caprinos de planteles vecinos, este hallazgo indicaría que la misma variedad de MAP infectó tanto a cabras como vacas en ciudades de Noruega.

También se infectó experimentalmente cabritos con MAP obtenido de cabras y ovejas para evaluar las lesiones anatomopatológicas y la respuesta inmunológica celular y humoral concluyéndose que la infección del MAP dentro de la misma especie y diferentes especies es posible (Chávez-Gris *et al.*, 2002).

Los animales en el rebaño bovino infectado se agrupan de acuerdo al estado de la infección por diferentes criterios entre estos:

1. No infectados; 2. subclínicos; 3. asintomático; 4. animales clínicamente afectados.

Otros dividen a los animales en un rebaño infectado en 4 estados: (1) infección silente (jóvenes y adultos); (2) enfermedad subclínica (adultos); (3) enfermedad clínica y (4) enfermedad clínica avanzada (Pavlik *et al.*, 2000; Yayo Ayele *et al.*, 2001).

Según Cocito *et al.* (1994), la enfermedad progresa a través de tres estados clínicos:

<u>Estado</u>	<u>Propagación de la mycobacteria</u>	<u>Reacción Inmunológica</u>		<u>Signos clínicos</u>
		<u>Humoral</u>	<u>Celular</u>	
I	No detectable	Baja	Alta	Ausente
II	Medianamente detectable	Mediana	Mediana	Ausente
III	Altamente detectable	Alta	Baja	Presente

En el estado I, el proceso infeccioso se desarrolla sin una propagación de la bacteria.

En el estado II, la concentración de la mycobacteria en la mucosa y lumen intestinal aumenta progresivamente.

El estado III, estado terminal de la enfermedad se caracteriza por una diarrea crónica intratable con signos de infección generalizada, emaciación, disminución en la producción de leche,

edema difuso, anemia e infertilidad. El animal muere en un estado de caquexia.

5. Patogénesis

La mucosa del tracto gastrointestinal tiene un sistema inmunológico local , uno de sus componentes son las placas de Peyer, asociación de folículos linfoides dentro del epitelio (FAE). El FAE tiene la habilidad de transportar macromoléculas y microorganismo al interior de la mucosa intestinal, además contiene células altamente especializadas entre ellas las células de membrana (Células M), que son importantes en la presentación y transporte de antígenos a células inmunocompetentes (Sigudardóttir *et al.*, 2001) .

La inmunidad de todas las infecciones por mycobacterias es dependiente de la respuesta inmunológica celular. El desarrollo de una inmunidad frente a organismos intracelulares facultativos como el MAP involucran, en general, la acción cooperativa de linfocitos T como inductor específico de macrófagos. La infección se establece luego de la ingestión de la bacteria, ella penetra la mucosa intestinal a través del sistema linfático por las células M, seguido de una fagocitosis por los macrófagos residentes (Cocito *et al.*, 1994; Lugton, 1999; Sigudardóttir *et al.*, 2001; Harris y Barletta, 2001) . Los macrófagos una vez activados sensibilizan los linfocitos T "helper" (TH1 y TH2) que activan a su vez la respuesta inmunológica. Los linfocitos T reclutan y juntan a los fagocitos mononucleares para la formación de granulomas y la activación de macrófagos para mejorar la actividad bactericida. Dentro de los linfocitos T y fagocitos mononucleares existen subpoblaciones que están interconectadas para formar circuitos reguladores que determinan la calidad, magnitud y duración de la respuesta inmunológica. Esta es controlada directamente por mediadores solubles o comúnmente señales conocidas como interleuquinas, linfoquinas y/o citoquinas. Durante la fase inicial o tuberculoide, los TH1 se caracterizan por la producción de estas citoquinas del tipo INF- gama, IL-2 y TNF -alfa necesarias para el desarrollo de un granuloma pequeño capaz de contener la infección y maximizar la actividad bactericida. Esta fase subclínica puede durar meses a años, donde el bacilo permanece contenido dentro de los macrófagos y granulomas microscópicos. Las células T de memoria son las responsables de

controlar la diseminación de la bacteria y minimizar el daño tisular (Chiodini, 1996; Manning y Collins, 2001; Sigudardóttir *et al.*, 2001; Khalifeh y Stabel, 2004).

Las manifestaciones de la respuesta inmunológica celular son de tipo IV o hipersensibilidad retardada, con la formación de granulomas, muerte y eliminación bacteriana que representa el final de la interacción celular. Cuando los animales comienzan con signos clínicos no específicos se entra a la fase lepromatosa de la infección o de predominio TH2. Los TH2 estimulan la producción de otras citoquinas y una respuesta inmunológica humoral. Esta respuesta humoral no es protectora y no detiene el progreso de la infección ni de la enfermedad solo nos asegura que estamos en estados avanzados, pudiendo existir una relación directa entre la carga de mycobacterias, presencia y cantidad de inmunoglobulinas y a manifestaciones patológicas. Además la inmunidad humoral contribuye a la formación de complejos inmunes que inducen glomerulonefritis causa común de muerte en la fase lepromatosa y ocasionalmente pueden ocurrir infartos renales en estados más avanzados. Concluyendo, la presencia de anticuerpos en la paratuberculosis es un signo desfavorable (Chiodini, 1996; Manning y Collins, 2001; Sigudardóttir *et al.*, 2001). Por otra parte, la influencia de las células inflamatorias hace que la pared intestinal se engruese hasta hacerse afuncional, generando un síndrome de mala absorción y pérdida de proteínas. La elevación de TNF-alfa contribuye a la emaciación a través de la estimulación del catabolismo de los tejidos (Manning y Collins, 2001).

Hasta esta fase el MAP puede diseminarse entre y más allá del tracto intestinal, con una infiltración de macrófagos en distintos órganos como hígado, riñón, glándula mamaria y otros. En esta fase de la enfermedad usualmente los animales enfermos mueren en semanas (Van Metre *et al.*, 2000; Manning y Collins, 2001).

Los caprinos infectados portan la infección en un estado latente en la lamina propia del intestino y en los nódulos linfáticos mesentéricos, por un período variable.

En algunos casos, los animales infectados comienzan a propagar o diseminar el organismo por las heces, producto de situaciones estresantes. Concurrentemente o al tiempo después

comienzan a mostrar los signos clínicos (Smith y Sherman, 1994).

6. Signos clínicos

Lo que caracteriza a la paratuberculosis es lo prolongado del período de incubación y de los estados subclínicos y clínicos de la enfermedad (Pavlik *et al.*, 2000). También existe una relación inversa entre la dosis de ingesta de la bacteria y el período de incubación, es decir a mayor dosis menor es el período de incubación, no obstante de todas maneras el período de incubación es prolongado (Whittington y Sergeant, 2001). El factor clave que contribuye al momento en que se desarrolle la fase clínica de la enfermedad es probablemente la edad del animal al momento de la infección. No obstante, existe un rango de factores que pueden acelerar o precipitar la fase clínica de la infección, incluyendo sistemas intensivos de producción, nutrición pobre, estrés relacionado al transporte, lactancia y partos, inmunosupresión por agentes infecciosos o por déficit de oligoelementos esenciales (Kennedy y Benedictus, 2001). Debido al carácter crónico e insidioso de la paratuberculosis los signos clínicos se presentan solo en algunos individuos, evidenciándose en aquellos más gravemente afectados. La enfermedad en el ganado bovino se presenta con una inflamación crónica con hiperplasia e intensa infiltración histocítica en la lámina propia traduciéndose como una diarrea crónica, profusa, acuosa y pérdida de peso (Moser, 1982; Cocito *et al.*, 1994; Smith y Sherman, 1994; Van Metre *et al.*, 2000), los signos clínicos más consistentes en los pequeños rumiantes es una disminución en la producción de leche que puede estar precedida por una pérdida de peso que se extiende desde semanas a meses (Moser, 1982; Smith y Sherman, 1994; Stehman y Shulaw, 1996; Van Metre *et al.*, 2000; De Juan *et al.*, 2002). Esta pérdida de peso ocurre entre los 2 a 7 años de edad (Van Metre *et al.*, 2000).

No obstante, signos de diarrea pudieran existir en los estados finales de la enfermedad afectando sólo un 10 a 20% de los animales. Esto se puede explicar porque la enfermedad afecta primariamente el tracto gastrointestinal alto y en los estados finales al colon por lo que no llega a provocar degeneraciones tan severas en la capacidad de absorción del intestino para producir una diarrea evidente (Moser, 1982; Smith y Sherman, 1994; Stehman y Shulaw, 1996; Van Metre *et*

al., 2000; Corpa *et al.*, 2000; Catton, 2002).

En el caso que existiera diarrea esta sería de apariencia acuosa o simplemente heces agrupadas y blandas. Afectando a animales que mantienen un buen apetito y afebriles, ya en etapas avanzadas podríamos evidenciar anorexia, debilidad, deshidratación y letargia terminando en una dramática emaciación (Gezon *et al.*, 1988; Smith y Sherman, 1994; Van Metre *et al.*, 2000; Catton, 2002). También es común encontrar el pelo áspero y la piel escamosa (Smith y Sherman, 1994).

Podemos sospechar de la enfermedad en animales que sufren una pérdida de peso manteniendo una buena nutrición, control parasitario y salud dental. El diagnóstico diferencial incluyen por tanto la desnutrición (macronutrientes o micronutrientes), enfermedades dentales, parasitismo gastrointestinales, linfadenitis caseosa, neumonías crónicas, artritis encefalitis virales, scrapie, enfermedades crónicas que afecten el hígado o el riñón (Stehman, 1996; Stehman y Shulaw, 1996; Manning *et al.*, 2003)

7. Histopatología

Tafti y Rashidi (2000), clasificaron las lesiones microscópicas como suaves, moderadas y severas. La forma suave son lesiones focales en la parte superior de la lamina propia de las vellosidades del ileon infiltrados con macrófagos epiteloideos, eosinófilos y numerosos bacilos ácido alcohol resistentes. En la forma moderada, las lesiones se caracterizan por infiltración y agregación de macrófagos epiteloideos, algunos linfocitos, eosinófilos y células plasmáticas en la parte superior de la lamina propia de el íleon y eventualmente en toda la lamina. La forma severa, se caracteriza por infiltración y agregación de algunos macrófagos epiteloideos, pocas células gigantes y numerosos linfocitos, células plasmáticas, eosinófilos y muy pocos neutrófilos en la submucosa, mucosa e incluso en la túnica muscular y la serosa.

Toda esta acumulación celular que es progresiva, se traduce en una compresión de las glándulas de las criptas y atrofia de las vellosidades intestinales (Stephens, 1993; Tafti y Rashidi, 2000; Catton, 2002).

En el ganado ovino, Pérez *et al.* (1997), clasificaron las lesiones de los casos subclínicos y clínicos según la fase en la patogénesis de la infección en que se encontraban. Los casos que corresponden a la forma tuberculoide de la infección se caracterizan por lesiones paucibacilares limitadas al tejido linfoide, son lesiones focales con pequeños granulomas, en cuyo interior hay linfocitos y una escasa cantidad de macrófagos con núcleos bien definidos y alargados, encontrándose a nivel de válvula ileocecal asociadas a una respuesta inmunológica celular. La forma multibacilar o lepromatosa, muy similar en los bovinos, se caracteriza histológicamente por una enteritis granulomatosa donde predominan macrófagos y bacilos ácidos alcohol resistentes intracelulares distribuidos difusamente a lo largo de la mucosa duodenal y del yeyuno asociadas a una respuesta inmunológica humoral. En la submucosa se evidencia, macrófagos, linfocitos, células plasmáticas infiltradas y focos necróticos con o sin calcificación, lo que contribuye al engrosamiento del intestino. Caseificación y calcificación puede ocurrir en el 25% de casos en los pequeños rumiantes, en la mucosa y submucosa, en la superficie peritoneal del intestino, vasos linfáticos y nódulos linfáticos (Gezon *et al.*, 1988; Stephens, 1993).

Macroscópicamente no se pueden diferenciar claramente aunque en caprinos con lesiones difusas muestran severa emaciación. El íleon y la pared del yeyuno está ensanchado y corrugado (Corpa *et al.*, 2000). La significancia clínica de ambas no es conocida, quizás una diferencia sea la facilidad en el diagnóstico (Pérez *et al.*, 1996; Corpa *et al.*, 2000; Catton, 2002).

8. Patología

Se pueden presentar un amplio rango de lesiones patológicas, dependiendo del estado de la infección en el momento de la necropsia y de las especies en cuestión. Las lesiones típicas en el bovino son una mucosa engrosada con desarrollo de rugosidades transversas en la porción del íleon, con alargados y edematosos nódulos linfáticos (Stephens, 1993; Manning y Collins, 2001).

En los caprinos la enfermedad se caracteriza por una inflamación granulomatosa del tracto intestinal, primariamente de la porción distal del intestino delgado que se traduce en un ligero engrosamiento focal o difuso de la mucosa, nódulos caseificados y calcificados en intestino,

nódulos linfáticos, que además están pálidos, edematosos y aumentados tres veces su tamaño normal, válvula ileocecal y posiblemente el hígado (Williams *et al.*, 1983; Gezon *et al.*, 1988; Smith y Sherman, 1994; Corpa *et al.*, 2000; Tafti y Rashidi, 2000; Catton, 2002). Los vasos linfáticos se visualizan como cordones gruesos que van desde el intestino hacia los nódulos linfáticos mesentéricos. Muchas veces la linfangitis es el único reconocimiento de cambios macroscópicos (Stephens, 1993 ; Sigudardóttir *et al.*, 2001). Aunque existe una controversia en la literatura cual sección del intestino es la más afectada Corpa *et al.* (2000), dice que el yeyuno es el más afectado, Smith y Sherman (1994) y Stehman (1996) dicen que es el íleon .

No obstante a medida que avanza la enfermedad, las lesiones se distribuyen a lo largo del tracto intestinal, hígado, bazo y pulmón con necrosis focal y mineralización, la que es rara en los bovinos. También se ha detectado amiloidosis en el hígado, riñón, y/o glándula suprarrenal (Gezon *et al.*, 1988; Smith y Sherman, 1994), lesiones en pulmones son raras e incluyen la formación de granulomas, pared alveolar engrosada por la infiltración de macrófagos y linfocitos, neumonía intersticial y fibrosis (Gezon *et al.*, 1988).

8. Zoonosis

A pesar de que el MAP no está clasificado como un agente zoonótico, ha sido identificado en biopsias de tejido intestinal en alguna proporción de pacientes con la enfermedad de Crohn. El tener un rol causal en la enfermedad de Crohn o simplemente ser una complicación de la infección, hace que el MAP sea hoy en día sujeto de debate entre la comunidad médica y científica. La leche ha sido sugerida como un posible vehículo de transmisión de este organismo para los humanos, debido que la bacteria ha sido detectada en la leche de animales clínicamente y subclínicamente infectados y que podría tener cierto grado de resistencia a los procedimientos de pasteurización (63°C en 30 minutos), HTST (altas temperaturas en corto tiempo 73° C por 15 a 25 segundos) (Grant *et al.*, 1996; Collins, 1997; Stabel *et al.*, 1997; Stabel *et al.*, 2001; Grant *et al.*, 2001; Yayo Ayele *et al.*, 2001; Gao *et al.*, 2002; Grant, 2003), incluso es capaz de sobrevivir hasta 90°C en 15 segundos, siendo el patógeno más resistente al calor en los alimentos (Grant *et al.*, 1998; Greger,

2001). Más aún, se ha reportado la infección por MAP en un paciente con SIDA (Richter *et al.*, 2002).

En un estudio realizado al 8% de la población caprina de Suiza por Muehlherr *et al.* (2003), mostró la presencia del MAP en estanques de leche mediante el método de PCR detectando la secuencia de inserción IS900. En Inglaterra dependiendo la época del año, se encontró que más del 25% de los cartones de leche contenían el MAP. Esta variación estacional coincidió con los periodos en que los pacientes que padecen la enfermedad de Crohn sufrían recidivas. Se ha tratado de aislar el MAP a través de la leche pero no ha resultado ya que la leche en los bovinos presenta un caldo de microorganismos con crecimiento excesivo y de rápida multiplicación. Es por ello que surge la pregunta que si las muestras positivas a pruebas de ADN es indicativo que la bacteria está viva o muerta (Greger, 2001).

La posible conexión entre el MAP y la enfermedad de Crohn está basada en reportes de aislamientos esporádicos de el organismo en tejidos de pacientes con Crohn (intestino y nódulos linfáticos) y la detección por la secuencia de inserción IS900 de ADN (Sanderson *et al.*, 1992; Sung y Collins, 2000; Sechi *et al.*, 2004), pero esto no significa necesariamente que sea responsable de la enfermedad de Crohn. La enfermedad de Crohn es una enfermedad crónica granulomatosa que afecta al intestino delgado y grueso en humanos. Tiene distribución mundial y afecta aproximadamente a una de cada 2.000 personas, aunque estas cifras van en aumento. Normalmente aparece en gente joven, de 20 a 35 años y provoca síntomas de diarrea crónica, dolor abdominal, pérdida de peso progresiva, debilitamiento y pérdida de calidad de vida. Las causas todavía no han sido demostradas, pero la similitud de los síntomas y lesiones han hecho sospechar que pueda ser causada por MAP (Kennedy y Benedictus, 2001; Collins, 2004). Se ha considerado que tiene un origen inmunológico pero las evidencias han sugerido que también existiría un componente infeccioso siendo el mejor candidato el MAP (Greenstein, 2003). Hasta el año 1984, se había aislado solo en tres pacientes con Crohn, se aisló un organismo fastidioso,

dependiente de mycobactina que requiere 18 meses de incubación para un aislamiento primario, la morfología de las colonias fueron rugosas, esto sugirió que podía ser una subespecie o un biovariante del MAP (Chiodini *et al.*, 1984). Otra posible evidencia es la respuesta positiva de los pacientes de Crohn al tratamiento con rifabutina y macrólidos, empleados en el tratamiento de la tuberculosis intestinal. Por otro lado, otra posible vía de transmisión es a través de la carne, que puede contaminarse durante su procesamiento, o debido a que en las fases terminales de la paratuberculosis sucede una diseminación sistémica de la bacteria; pero en este último caso la caquexia que sufre el animal hace que su carne no sea apta para el consumo. Otra posible fuente de infección para las personas podría ser el agua de bebida contaminada, ya que los tratamientos de purificación y cloración no son capaces de destruir el MAP (Kennedy y Benedictus, 2001; Harris y Barletta, 2001; Whan *et al.*, 2001; Whan *et al.*, 2002; Collins, 2003b; Greenstein, 2003).

Las personas en contacto con animales infectados también estarían en riesgo de contraer la enfermedad. Pese a todo esto, se ha sugerido que en el desarrollo de la enfermedad de Crohn también existe un componente genético (Anónimo, 2000). Todavía no se puede decir efectivamente que es producido por el MAP pues para ello deben cumplirse los postulados de Koch.

9. Diagnóstico

Mientras las características de infección del MAP en las distintas especies de rumiantes son similares, la presentación clínica y la interpretación de diagnósticos son diferentes entre ellos. Esto puede deberse a las distintas variedades del MAP encontradas en los huéspedes y la distinta respuesta frente a la infección (Collins, 1990; Stehman y Shulaw, 1996; Stehman, 1996) . También las técnicas de diagnóstico utilizadas se verán influenciadas por el estado de la enfermedad, la respuesta del huésped y la prevalencia en el rebaño. En los estados subclínicos de la enfermedad se complica el diagnóstico porque todavía no existe una evidente multiplicación bacteriana y la respuesta inmunológica es baja pudiendo ser incluso nula (Anónimo, 2000).

El diagnóstico de la enfermedad de Johne se puede realizar mediante la identificación de:

- 1) el agente causal de la enfermedad (MAP) mediante:
 - cultivo bacteriológico desde heces y de tejidos,
 - tinción directa de muestras de mucosa intestinal o fecales,
 - histopatología,
 - pruebas que detecten su ADN.
- 2) la respuesta inmunológica producto de la infección, mediante detección de anticuerpos o de citoquinas como reflejo de una respuesta celular (OIE, 2000; Van Metre *et al.*, 2000; Nielsen *et al.*, 2001).
- 3) los signos clínicos y patológicos (Van Metre *et al.*, 2000; Nielsen *et al.*, 2001)

1) El diagnóstico definitivo de la infección se realiza mediante el cultivo bacteriológico, siendo este muy específico, pero presentando ciertas dificultades como son el largo tiempo de cultivo el que no es menor de dos meses y se puede extender hasta por 4 a 6 meses en el caso de bovinos y caprinos y hasta 12 meses en el caso de los ovinos y además se deben usar medios especiales como el Herrold con yema de huevo que contengan mycobactina J todo ello para detectar sólo un 12% de los casos clínicos confirmados para el caso de los ovinos y un 78-86% en los caprinos (Gezon *et al.*, 1988; Stehman y Shulaw, 1996; Van Metre *et al.*, 2000). Por último, cuando se cultiva a partir de heces, el proceso de manejo de la muestra es laborioso contaminándose muchas veces con otras bacterias y hongos llegando hasta a un 30% de contaminación, es por ello que frente a esto se debe repetir el aislamiento traduciéndose en una pérdida de tiempo además de un aumento en los costos (Nielsen *et al.*, 2001; van Weering *et al.*, 2002; Weber *et al.*, 2002; Pislak *et al.*, 2003), todo lo cual incide en una baja sensibilidad.

Se pueden realizar cultivos fecales mediante "pools" o conglomerados de heces de varios animales, lo que provee de un método válido, una mejor sensibilidad y a un costo efectivo menor (Kalis *et al.*, 2000), permitiendo que un mayor porcentaje de animales del rebaño sean incluidos en el estudio. La única dificultad es la perdida potencial de esta sensibilidad a medida que se incluyen más individuos por conglomerados (Wells *et al.*, 2002; van Schaik *et al.*, 2002; Wells *et al.*, 2003).

Además de ser un camino específico para comprobar rebaños con MAP (van Schaik *et al.*, 2002) se puede determinar prevalencias dentro del rebaño (Wells *et al.*, 2003). El tamaño de los "pools" va a depender de la prevalencia estimada y del número de animales por rebaño. Así en rebaños con baja prevalencia y bajo número de animales no es conveniente su utilización porque la probabilidad de encontrar la infección disminuye de un 88 hasta 53% (van Schaik *et al.*, 2003).

La detección del MAP en tejidos afectados mediante la tinción de Ziehl-Neelsen es una técnica habitual, rápida y económica para diagnosticar paratuberculosis, pero se limita al *post mortem* o a muestras de heces de animales sospechosos que presentan signos clínicos. La sensibilidad de este método es baja (Collins, 1996; Eriks *et al.*, 1996; Anonimo, 2000; Manning y Collins, 2001; Pislak *et al.*, 2003), pues existe poca precisión en distinguir al MAP de mycobacterias no patógenas (saprofitas) comúnmente encontradas en las muestras fecales (Eriks *et al.*, 1996; Manning y Collins, 2001; Pislak *et al.*, 2003).

Los hallazgos histopatológicos incluyen infiltración granulomatosa en la lamina propia de la mucosa intestinal, por macrófagos epiteloideos que contienen bacilos ácido alcohol resistentes, linfocitos, plasmocitos y abundantes células gigantes multinucleadas (Kennedy y Benedictus, 2001).

Se han identificado genes únicos para el MAP, la inserción de la secuencia IS900 es la base para la detección específica de la bacteria, distinguiéndola de otras mycobacterias como *M. avium*. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) basada en la repetición específica de la secuencia de ADN (IS900), provee de un diagnóstico rápido y de alta especificidad, además de ser una prueba que se puede realizar en individuos vivos. El PCR se utiliza para confirmar el MAP luego del aislamiento en medios de cultivos y tejidos. Tiene una especificidad aproximada de 90%, el único problema es el número de falsos negativos observados en comparación con los cultivos tradicionales (Dimarelli-Malli y Sarris, 2001; Nielsen *et al.*, 2001; Pislak *et al.*, 2003; Buergelt, 2003), la eficacia de este método depende de la cualidad de aislamiento de ADN desde las muestras de tejidos. Los resultados falsos negativos provistos por este método se deben a un

aislamiento fallido del ADN y a la presencia de inhibidores de la amplificación del PCR, pues la pared celular del MAP es muy difícil de desarmar , lo que causaría un problema adicional en el aislamiento del ADN (Pislak *et al.*, 2003; Chui *et al.*, 2004).

Otra desventaja es el costo elevado (Van Metre *et al.*, 2000) aunque para Buergelt, 2003, el costo es efectivo.

2) Respecto a la detección de la respuesta inmunológica celular, se ha utilizado la llamada prueba intradérmica o "johnina", que corresponde a una prueba de hipersensibilidad retardada luego de la inyección intradérmica de un extracto de proteína purificada derivada del MAP. A pesar de que este método se utilizó por muchos años, hoy no se recomienda por su baja especificidad y poca correlación con el estado infeccioso del animal. Se han realizado ensayos de detección del interferón-gamma para el diagnóstico de paratuberculosis. Los resultados iniciales han sido promisorios para el bovino, pero se presentan problemas de baja especificidad en animales jóvenes (Nielsen *et al.*, 2001).

La inmunidad humoral se presenta en forma tardía entre 10-17 meses después de la infección, es por ello que se recomienda utilizar las pruebas luego de un período de 15 meses. Las pruebas serológicas más difundidas son el AGID (inmunodifusión en gel de agarosa), FC (fijación del complemento) y ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima). Hoy, la prueba más utilizada es el ELISA por su mejor sensibilidad y especificidad, especialmente en casos clínicos y en casos subclínicos que han comenzado a diseminar el MAP (Nielsen *et al.*, 2001; Manning y Collins, 2001). En los caprinos, se ha logrado una sensibilidad del 54% obteniéndose un 100% de especificidad (Burnside y Rowley, 1994) no obstante Molina *et al.* (1991) reportó una sensibilidad del 88% y una especificidad del 94% en un rebaño caprino con una alta prevalencia en España.

Se ha reportado en el ganado ovino una reacción cruzada frente a patologías como la linfadenitis caseosa enfermedad común también en el ganado caprino, entregando falsos positivos disminuyendo su especificidad (Stehman y Shulaw, 1996; Van Metre, 2000; Krt *et al.*, 2002), el AGID pareciera no afectarse por la presencia de anticuerpos contra *Corynebacterium*

pseudotuberculosis, ha sido reportado con la misma sensibilidad que el cultivo fecal en caprinos en su fase clínica (86-100%), no obstante no todos los cultivos positivos dan positivo al AGID y viceversa. Una ventaja del AGID sobre los cultivos es la rapidez en la obtención de los resultados, menor costo, menor uso de equipamiento especializado y menor tiempo y espacio de operación. Una mejor sensibilidad y buena medida de control se lograría utilizando ambas pruebas, primero se hace un "screening" al rebaño con la prueba de AGID y aquellos seropositivos se confirman mediante el cultivo fecal (Sherman y Gezon, 1980; Stehman y Shulaw, 1996; Van Metre *et al*, 2000). En un estudio realizado por Whittington *et al*. (2003) concluyeron que tanto el AGID como el ELISA tienen una alta especificidad pudiéndose usar indistintamente, no obstante encontraron que el ELISA tiene una mejor sensibilidad para la detección de cabras infectadas, siendo de elección en los casos de paratuberculosis caprina.

La prevalencia de la enfermedad influye en la interpretación de resultados positivos en el rebaño o en casos individuales, el valor predictivo en pruebas positivas es alta en poblaciones con alta prevalencia de la enfermedad en comparación con los de baja prevalencia (Van Metre *et al*, 2000)

3) El diagnóstico clínico de paratuberculosis es incierto especialmente en caprinos donde el síndrome diarrea no se presenta corrientemente. En general en cualquier especie la enfermedad se manifiesta sobre los dos años de edad presentando pérdida progresiva de peso, debilidad y disminución en la producción de leche. La enfermedad clínica se manifiesta generalmente después del estrés del parto, alta producción de leche u otras enfermedades concurrentes. El diagnóstico patológico puede complementar al clínico puesto que las lesiones específicas y características se encuentran a nivel de intestino y nódulos linfáticos regionales. Las lesiones intestinales se presentan mayormente en yeyuno e íleon y corresponden a una hipertrofia difusa de la mucosa intestinal con desarrollo de rugosidades gruesas y transversales. En ovinos y caprinos, las lesiones son similares a las del bovino aunque es frecuente solamente un ligero engrosamiento de la mucosa pero con caseificación y calcificación de los nódulos linfáticos comprometidos (Stephens,

1993).

Resultados negativos de las pruebas no indicarían que el animal está libre de la infección, puede significar simplemente que la muestra particular recogida no contiene el analito en cuestión (anticuerpo u organismo del *M. paratuberculosis*) (Manning y Collins, 2001).

10. Vacunación

La vacunación contra paratuberculosis fue descrita por primera vez en 1926 por Vallee y Rinjard. La vacuna es preparada hasta el día de hoy en Estados Unidos desde una variedad muerta del *Mycobacterium avium* suspendido en aceite mineral. En Europa se usa una vacuna viva. Ambas son capaces de inducir una respuesta inmunológica celular y humoral sin desarrollar niveles apreciables de inmunidad. Es por ello que solo es usada en rebaños con infección enzoótica. La vacuna reduce el número de animales que desarrollan signos clínicos, con infección intestinal detectable y que excretan el MAP pero no evitan la infección (Anónimo, 2000).

Tanto la vacuna atenuada como la muerta han sido usadas experimentalmente con muy buenos resultados en rebaños positivos a paratuberculosis. Luego de dos años de seguimiento no se detectó un nuevo caso clínico de paratuberculosis (García Marín *et al.*, 1999). Según Kalis *et al.* (1999b), la vacunación resultó ser exitosa en los Países Bajos para prevenir la paratuberculosis clínica en los años 60, pero se empezó a prohibir por la reacción cruzada que se genera con el diagnóstico de tuberculosis. En los años 80, ya libres de la tuberculosis bovina comenzó a utilizarse nuevamente y se demostró un costo-beneficio positivo debido a la disminución de la paratuberculosis clínica. Ellos demostraron que 10 años de vacunación no garantiza que no exista propagación por las heces del MAP y que el efecto de dos años de aislamiento y programas de selección y eliminación no se ven influenciados tanto si se vacuna o no.

En virtud de los escasos antecedentes que existen respecto de la paratuberculosis caprina en Chile, y de la creciente importancia que esta especie ha recobrado, es que este proyecto propone detectar rebaños caprinos en los que este presente el agente para luego a futuro proponer las medidas que limiten la diseminación de la enfermedad.

11. Control

El control de la paratuberculosis puede ser extremadamente difícil debido a la limitación impuesta por la baja sensibilidad de las pruebas de diagnóstico y la habilidad del organismo para sobrevivir por largos períodos en el entorno. Inicialmente es importante establecer si el rebaño está libre de la infección con MAP y luego establecer las medidas que tiendan a limitar la diseminación de la bacteria, detección de animales infectados y su eliminación. Dentro de las medidas recomendadas por Stheman y Shulaw (1996) y De Juan *et al.* (2002) en rebaños infectados se consideran:

- 1) todos los animales deben ser examinados rutinariamente y seleccionar aquellos que evidencien pérdidas de peso progresivo para un seguimiento más exhaustivo, los que serán sujeto a examinación post-mortem.
- 2) realizar muestreos serológicos, para determinar anticuerpos contra el MAP.
- 3) aislar cabras con pérdida de peso y establecer el diagnóstico.
- 4) eliminar los casos clínicos lo antes posible.
- 5) identificar los hijos de hembras infectadas o sospechosas.
- 6) remover la descendencia de las cabras infectadas.
- 7) evitar ingreso de animales infectados y tener un manejo que limite la infección de los lactantes.

Métodos de control del tipo preventivo son:

- 1) mantener un ambiente limpio sanitariamente en el período de crianza. Usar cama de paja limpia y mantenerla soleada.
- 2) evitar el contagio de la cría mediante separación inmediata de su madre y manejo independiente del resto del rebaño, diagnóstico precoz, eliminación de animales infectados, y vacunación en las primeras semanas de vida de las cabritas destinadas a la reposición. Esta última medida es la más extendida y aunque no previene totalmente la aparición de casos clínicos, permite limitar las pérdidas hasta un grado aceptable económicamente.

- 3) si se introducen animales provenientes de otros rebaños es conveniente mantenerlos en cuarentena y realizar la prueba de AGID antes de la compra,
- 4) limpiar las camas y los corrales constantemente,
- 5) quemar las camas de pajas o el estiércol acumulado usado para abono en alimentos de uso animal o humano,
- 6) no alimentar con mezclas de calostros o leche de hembras adultas o de vacas,
- 7) en el caso que se usen hembras nodrizas mantener las ubres siempre limpias,
- 8) pasteurizar el calostro o la leche para alimentar a los cabritos teniendo en cuenta que la pasteurización no es un método confiable para la eliminación del MAP,
- 9) evitar el pastoreo con otros animales o potreros que hayan pastoreado otros animales o hallan sido abonado con estiércol de otros rebaños,
- 10) cuidado con el acceso de animales silvestres que pudieran ser propagadores de la infección.

El tratamiento como medida de control no es considerado porque económicamente no se justifica además eventualmente la enfermedad sigue un curso fatal (Whittington *et al.*, 2000b).

HIPÓTESIS

Existe presencia de *Mycobacterium paratuberculosis* en rebaños caprinos de la Región

Metropolitana.

OBJETIVOS

General

- Detectar *Mycobacterium paratuberculosis* en caprinos de la Región Metropolitana.

Específicos

- Aislar *Mycobacterium paratuberculosis* desde heces de caprinos en rebaños de la Región Metropolitana.
- Probar un método bacteriológico que facilite la búsqueda del *Mycobacterium paratuberculosis*.
- Conocer a través de un cuestionario, las características epidemiológicas que puedan ser factores de riesgos para la presencia de la enfermedad.

MATERIAL Y MÉTODO

1.- Población objetivo para el muestreo

Para tener una mayor probabilidad de detectar rebaños caprinos infectados con MAP, se consideraron aquellos, en los que se haya sospechado la enfermedad, donde se hayan importado o introducido animales de otros rebaños, o que tengan contacto con bovinos. Se seleccionaron animales que presentaron mayor riesgo de estar infectados, para lo que se consideró:

- a. hembras mayores de un año, pues están sometidas a los factores estresantes que activan la enfermedad y en lo posible;
- b. animales que hayan presentado signos de diarrea, debilitamiento, pérdida de peso progresiva, disminución de la producción láctea, etc.

2.- Obtención de las muestras

En cada rebaño se seleccionó el número de animales en múltiplos de cinco, para conformar una muestra o "pool", tratando de abarcar solo el 25% de la población de cada rebaño. Se recolectaron muestras directamente desde el recto, tomando 1 a 2 heces de cada caprino, que se depositaron en bolsas de plástico estéril, debidamente identificadas. Estas se mantuvieron en refrigeración y se trasladaron dentro de las 48 horas al Laboratorio de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Previo al cultivo se conformaron los "pools" reuniendo 1 a 2 heces de cada animal en grupos de a 5, conjunto que constituyó la muestra a cultivar, previamente identificados con sus respectivos números de crotales en el caso que lo posean para luego en aquellos "pools" positivos el dueño pueda identificar a los animales sospechosos.

Se realizó un cuestionario (Anexo 1) en cada rebaño, con el fin de corroborar los factores de riesgo que este estudio considera para la obtención de las muestras.

Se tuvo acceso a 5 rebaños con manejo intensivo y a 5 rebaños con manejo extensivo, que representan una población aproximada de 2000 caprinos. Se tuvo una capacidad de procesamiento de 115 muestras, lo que representó cerca de 570 animales al utilizar el método de aislamiento mediante conglomerados, por lo que se tuvo acceso a un 25% de la masa.

Como antecedente de un tamaño muestral para detectar la enfermedad (Segura y Honhold, 1993), considerando un 3% de prevalencia estimada, un 95% de confianza y una población de 12.580 hembras mayores de un año en la región Metropolitana (INE, 1997), se obtiene un número de 99 muestras.

3.- Método de cultivo

3.21.- Medio de cultivo

Se realizaron cultivos bacteriológicos para *M. paratuberculosis* según recomendaciones del Australian Standard Diagnostic Techniques (ASDT) (Stephens, 1993) y con las modificaciones propuestas previamente por Whitlock y Rosenberger (1990) que permiten una mejor eficiencia en la recuperación de la bacteria. El medio de cultivo recomendado para aislamiento primario es el medio de Herrold con yema de huevo (HEYM) más mycobactina J, en tubos de agar inclinado con tapa rosca. La composición de los componentes y modo de preparación se presentan en el anexo 2.

3.22.- Procesamiento de las muestras:

El procesamiento de las muestras de heces se realizó según Whitlock y Rosenberger (1990).

1. 5 heces conforman un "pool", los que se colocaron en una bolsa con 20 ml de solución salina al 0.9%.
2. Se mezclaron en un triturador tipo stomacher por 30 segundos.
3. El contenido de la bolsa se traspasó a tubos cónicos de centrifuga de 50 ml. de capacidad, se dejaron por 30 minutos a T^o ambiente hasta obtener un sobrenadante.
4. 5 ml del sobrenadante obtenido se traspasó a un tubo cónico de centrifuga más 25 ml. de caldo corazón cerebro a la mitad de su concentración con HPC al 0.9% (cloruro de hexadecilpiridinium).
5. Se dejó incubando a 37°C por 24 horas.
6. Posteriormente se centrifugó a 900 x g por 30 minutos.

7. Se eliminó el sobrenadante.
8. Al "pellet" obtenido se le añadió 1 ml. de solución antibiótica.
9. Se dejó incubando por 48 horas a 37°C.

La preparación y composición de las soluciones decontaminantes y antibióticas se presentan en el anexo 3.

3.23.- Siembra del cultivo:

Luego de las 48 horas de incubación, se sembraron los tubos sin mycobactina (tubo 1), con mycobactina (tubo 2) y con mycobactina y antibióticos (tubo 3) con el "pellet" fecal obtenido luego de su procesamiento.

Se dejaron incubando a 37°C verificando la aparición de colonias tanto en el tubo 2 y 3, y que no existiera crecimiento en el tubo 1, lo que indicó un resultado positivo.

Los resultados se expresarán como presencia o ausencia de MAP por rebaño, considerando algunas características de ellos como son su manejo y número total de animales y se hará una breve descripción de la eficiencia del cultivo de acuerdo el porcentaje de contaminación por hongos obtenida en los cultivos.

3.24.- Identificación de las cepas

Los tubos luego de su inoculación fueron examinados cada dos semanas hasta la verificación de la presencia de colonias. Aquellas colonias que se tomaran un tiempo de incubación mayor de 2 meses para ser visibles, presentasen la morfología típica del MAP y que se desarrollasen solo en los tubos con medio HEYM más mycobactina con o sin antibióticos se consideraron positivas.

RESULTADOS

El empleo del medio Herrold modificado con yema de huevo (HEYM) permitió el aislamiento del MAP en 21 (18%) de los 115 pools de heces analizadas, correspondiente a 3 (30 %) de los predios muestreados.

Cuadro 1 Aislamiento de *Mycobacterium paratuberculosis* desde "pools" de heces caprinas

Rebaño Nº	Nº de animales / rebaño	Nº de animales muestreados	Nºde "pools"/ rebaño	"Pools" positivos /rebaño	Contaminación con hongos %	Tipo de manejo
1	240	60	12	2	-	E
2	105	25	5	-	-	E
3	120	30	6	-	-	E
4	140	35	7	-	-	E
5	60	15	3	-	-	E
6	240	60	12	-	100	I
7	80	15	4	-	-	I
8	182	50	10	-	-	I
9	108	30	6	5	-	I
10	1000	250	50	14	-	I
TOTAL	2275	570	115	21	10	-

Los cultivos positivos al MAP se caracterizaron por el desarrollo de colonias típicas a partir de la 8ª semana de incubación, de un tamaño de 0.5 a 1mm, de color blanquecino, rugosas e irregulares. Mostrándose colonias más grandes en algunos tubos (fig. 1)



Fig.1 Colonias de MAP en HEYM

En aquellos casos de explotación mixta, la base productiva es la elaboración de quesos y la producción de carne a base de cabritos lechales. La reposición casi siempre es con animales propios, salvo algunas excepciones donde hay introducción de reproductores provenientes de otras regiones o países. Solo en dos rebaños (20%) había segregación por edad, una buena higiene de los comederos y utilización de bebederos automáticos lo que facilita aun mas la higiene de los corrales y la disminución de la presencia de la enfermedad, no obstante en uno de estos rebaños es donde se presenta en su mayoría el problema, esto podría ocurrir por la procedencia de los animales (Cuadro 2).

De acuerdo a la información obtenida en el cuestionario, en la totalidad de los planteles se presentaban casos clínicos con adelgazamiento progresivo, los que no eran manejados en forma especial ni segregados del resto del rebaño, tampoco implementaban planes de control frente a la paratuberculosis. En el 80% de los planteles, no se realizaba separación de animales según la edad ni presentaban manejos higiénicos a nivel de comederos y bebederos (Cuadro 2).

Cuadro 2. Datos epidemiológicos de cada rebaño

Rebaño Nº	Nº de animales/ rebaño	Tipo de explotación	Reposición con animales propios	Alimentación cabrito	Separación por edades	Higiene de comederos y bebederos	Animales con adelgaza miento	Control de paratubercul osis	Tipo de manejo
1	240	carne	No siempre	madre	no	x	si	no	E
2	105	mixta	No siempre	madre	no	x	si	no	E
3	120	mixta	siempre	madre	no	x	si	no	E
4	140	mixta	siempre	madre	no	x	si	no	E
5	60	mixta	siempre	madre	no	x	si	no	E
6	240	leche	siempre	madre	no	x	si	no	I
7	80	leche	siempre	madre	no	x	si	no	I
8	182	leche	siempre	sustituto	si	xxx	si	no	I
9	108	leche	siempre	madre	no	x	si	no	I
10	1000	leche	No siempre	sustituto	si	xxx	si	no	I

E: extensivo

I: intensivo

x: mala

xx: regular

xxx: buena

xxxx: muy buena

DISCUSIÓN

En este trabajo, se comprobó la hipótesis de la presencia de MAP en rebaños caprinos de la Región Metropolitana. El aislamiento de bacterias que cumplen con los requisitos para ser consideradas como MAP desde heces de caprinos se llevó a cabo de acuerdo a la metodología propuesta por Whitlock y Rosenberger (1990) que establece un alto grado de especificidad para el MAP al utilizar medios de cultivos con yema de huevo y mycobactina J. Las condiciones de crecimiento en este medio y la aparición de colonias después de 8 semanas son condiciones que solo cumple esta bacteria dentro de su familia.

Uno de los inconvenientes del cultivo fecal como método de diagnóstico es que requiere tiempo, en este caso este no fue menos de 8 semanas para recién evidenciar la aparición de colonias, incluso bajo la lupa y obtener resultados positivos. Según la especie animal, se ha llegado hasta 12 meses el cultivo fecal como es en las cepas provenientes de ovinos (Stheman y Shulaw, 1996)

Además, el procedimiento para procesar las muestras antes de su cultivo es lento y laborioso, y al requerir medios de cultivos especiales es más caro que otros cultivos bacterianos corrientes.

Estos dos factores, el tiempo de cultivo y el costo de este pueden limitar el uso habitual de esta metodología en el control de la enfermedad. Sin embargo, se considera que ante una sospecha de la enfermedad, en cualquier tipo de rebaño se debe recurrir al cultivo para tener un indicio claro de la presencia de la infección, porque el cultivo fecal tiene una alta especificidad como método de diagnóstico, otorgándonos un 100% de seguridad y confiabilidad frente a un resultado positivo.

Los métodos serológicos para el diagnóstico del MAP, que podrían entregar un indicio de lo que está ocurriendo, siendo más baratos, tienen deficiencias de especificidad y presentan una alta proporción de resultados falsos positivos. Es por ello que Stheman y Shulaw, (1996) y Van Metre *et. al.* (2000) recomiendan realizar "screening" con pruebas altamente sensibles y luego utilizar

pruebas más específicas como el cultivo bacteriológico para llegar a un diagnóstico definitivo y comenzar a implementar medidas de manejo.

Uno de las grandes limitaciones que tiene el cultivo fecal es la contaminación insidiosa de los hongos, que se trató de eliminar mediante la descontaminación con HPC y la adición de soluciones antibióticas tanto en el medio de cultivo como en el preparado fecal, obteniendo resultados óptimos, solo existió un 10% de contaminación. La contaminación encontrada, en su totalidad fue en un solo rebaño, debido a la demora en el procesamiento de las muestras, sobrepasando las horas indicadas y mantenidas solo bajo refrigeración. Para el cultivo fecal, la muestra debe ser directamente obtenida desde el recto de los animales seleccionados, esta debe ser transportada sin preservantes dentro de 48 horas para realizar un buen procedimiento y se permita su crecimiento y viabilidad del cultivo. En aquellos casos en que el procedimiento va a ser decoroso, se recomienda mantenerlos a congelación bajo -70°C por un corto período de tiempo, no más de 3 semanas (Richards y Thoen, 1977; Whittington *et al.*, 2000b).

Para abaratar los costos y con el fin de lograr cubrir una mayor proporción de animales en cada rebaño y tener una mayor probabilidad de aislar al MAP se utilizó la técnica de "pools" fecal. Esto permite aumentar la sensibilidad del método, pero a su vez aumenta el grado de contaminación, a si mismo según van Schaik *et al.* (2002) y Wells *et al.* (2002) recomiendan incluir un número determinado de individuos por "pools", para no provocar un efecto de dilución de la bacteria.

Una limitante en el uso de "pools" es la mezcla eficaz de las heces que se trata de lograr con la utilización de un triturador tipo "stomacher", obteniendo buenos resultados homogenizando el preparado fecal.

También es importante tratar de concentrar al *Mycobacterium* y facilitar el aislamiento, sobre todo en aquellos casos en que están cursando una fase II, donde hay poca eliminación de la bacteria. Por ello, se aconseja la centrifugación lo que permitió aumentar la tasa de aislamiento independiente de la velocidad utilizada (Kalis *et al.*, 1999a; Nielsen *et al.*, 2001).

Respecto al estudio realizado en la Región Metropolitana, se encontró la presencia del MAP en 3 de los 10 rebaños caprinos muestreados, esto equivale a un 30% de los rebaños totales, obteniéndose resultados positivos en 21 "pools" de 115 "pools" muestreados o sea un 18% del total de "pools", 5 de los cuales fueron aislados en 1 solo rebaño, con sólo 6 "pools", teniendo un resultado total de 83% de infección en un sólo rebaño (cuadro 1).

La severidad de la infección o el grado de propagación en un rebaño dependerá de las condiciones de manejo, número de animales infectados y la duración de la infección en el grupo, realidad que es demostrada a través de la encuesta y a la inspección de las instalaciones de los planteles. Los rebaños catalogados como de manejo intensivo según lo observado, corresponden a un manejo confinado, sin que exista segregación por edades, ni uso de calostro artificial, segregación por producción o diferencias de raciones según la etapa productiva. Lo que si se cumple es el confinamiento, en la que solo se destaca el hacinamiento de los animales, la poca higiene de los corrales y el mal manejo de las heces como también, la contaminación fecal de los bebederos y de los comederos que en algunos casos ni siquiera existían.

Todos estos factores predisponentes estuvieron presentes y concordaron con aquellos resultados positivos a la presencia de MAP. Es por ello que la obtención de resultados positivos podrían ser indicativos de que la población de riesgo elegida, hembras mayores de 2 año, rebaños con sobrepoblación, manejo intensivo (confinados), son factores claros para gatillar la enfermedad, encontrar la infección y efectos cuantitativos.

Así también, llama la atención que la mayoría de los animales provenían de la zona Norte de Chile donde está confirmada la presencia de MAP lo cual, pudiera ser una posible causa de introducción de la enfermedad. En los rebaños extensivos quizás las medidas higiénicas eran iguales o peores la única diferencia era la obtención de alimentos en cerros, como caracteriza a esta especie, mayoritariamente por especies arbustivas donde hay poca contaminación fecal, quizás eso podría explicar el resultado positivo en solo uno de los rebaños extensivos.

Hoy, lo que cobra interés, es el posible potencial zoonótico del MAP, hasta que no se compruebe fehacientemente su relación directa con la enfermedad de Crohn y la importancia que

radica su sobrevivencia a técnicas como la pasteurización o la cloración de las aguas. Se estaría hablando entonces de una enfermedad emergente, donde se deberían de tomar e implementar medidas pertinentes para su control, considerando su patogénesis y características epidemiológicas, donde la estimación de su prevalencia es difícil.

Hay que considerar además, las pérdidas provocadas durante la etapa clínica en que hay menor eficiencia de conversión alimenticia como una menor producción de leche, menor grasa de proteína y grasa en la leche, menor peso de los animales al momento del sacrificio, por ende pérdida del valor de su carcasa, selección prematura para el sacrificio, disminución de la fertilidad y ser propagadores activos (Collins, 2003b) lo que se traduce en pérdidas para los productores.

En aquellos resultados que dieron negativos no se puede afirmar que no existe la infección. Solamente se puede afirmar que la patogénesis de la enfermedad y la existencia de pruebas que no son lo suficientemente sensibles para detectar una escasa cantidad de bacterias o que simplemente están cursando la fase subclínica inicial, en que todavía no hay diseminación por las heces.

CONCLUSIONES

- 1.-Se comprobó la presencia de *Mycobacterium paratuberculosis* desde heces de caprinos de la Región Metropolitana.
- 2.- El medio HEYM más la adición de mycobactina J demostró claramente ser muy efectiva para el aislamiento del MAP a partir de muestras de heces de animales que ya estaban diseminando el microorganismo. Esto no quiere decir que en aquellos planteles en que dieron resultados negativos estén libres de la infección sino que pueden estar en un estado subclínico en que todavía no hay diseminación de la bacteria por las heces.
- 3.- La incorporación de antibióticos tanto a los medios preparados como al proceso de descontaminación fecal es efectivo para disminuir la contaminación insidiosa de los hongos, información importante para ser incluida en los futuros protocolos de procesamiento de muestras. Por otra parte, el procesamiento dentro de las 24 horas de extraídas las muestras, es determinante para la disminución de los mismos.
- 4.- Según los resultados obtenidos se evidencia que la presencia del MAP es mayor en los rebaños de manejo intensivo que en los de manejo extensivo.
- 5.- Según los datos epidemiológicos obtenidos, se puede establecer que las medidas higiénicas, el hacinamiento y la procedencia de animales de otros rebaños son factores que pudieran estar asociados a la presentación de la enfermedad y que los productores tanto en manejo intensivo como extensivo no aplican medidas necesarias para el control de la enfermedad existiendo poca información sobre la paratuberculosis.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Anonimo**. 2000. Possible links between Crohn's disease and paratuberculosis, **In**: Report of the Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare pp: 1-77 . European Commission Directorate-General Health & Consumer Protection Directorate B - Scientific Health Opinions Unit B3 – Management of scientific committees II. <http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scsh/out38_en.pdf> [consulta: 12 de junio del 2004].
2. **Bannantine J.P.** 2003. Genomic homogeneity between *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* belies their divergent growth rates. BMC Microbiol. 3: 10.
3. **Bauerfeind R., Benazzi S., Weiss R., Schliesse T., Willems H., Baljer G.** 1996. Molecular characterization of *Mycobacterium paratuberculosis* isolates from sheep, goats and cattle by hibridation with a DNA probe to insertion element IS900. J. Clin. Microbiol. 34: 1617-1621.
4. **Beard P., Daniels M.J., Henderson D., Pirie K., Buxton D., Rhind S., Greig A., Hutichings M., Mckendrick I., Stevenson K., Sharp J.** 2001. Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland. J. Clin. Microbiol. 39: 1517-1521.
5. **Buergelt C., Layton A., Ginn P., Taylor M., King J., Habecker P., Mauldin E., Whitlock R., Rossiter C., Collins M.** 2000. The pathology of spontaneous paratuberculosis in the North American Bison. Vet. Pathol. 37: 428-438.
6. **Buergelt, C.** 2003. In utero infection of pregnant cattle by *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* detected by nested polymerase chain reaction. J. Appl. Res. Vet. Med. 1 (4). < <http://www.jarvm.com/articles/Vol1Iss4/index.htm>> [consulta: 20 de julio del 2004].
7. **Burnside D., Rowley B.** 1994. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of paratuberculosis in goats. Am. J. Vet. Res. 55: 465-466.
8. **Catton B.** 2002. Paucibacillary paratuberculosis in a goat. Can. Vet. J. 43: 787-788.

9. **Chávez-Gris G., Torres-Ramos E., Alarcón A.** 2002. Anatomopathological early findings in kids experimentally inoculated by oral route with caprine and ovine *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Abstract online. 7th International Colloquium on Paratuberculosis. Bilbao, Spain: 11th -14th june, 2002. < http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst2_p17.htm > [consulta: 15 de febrero del 2004].
10. **Chávez-Gris G., Trigo F., Svastova P., Pavlik I.** 2004. Identificación del polimorfismo genético de aislamientos de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* de caprinos del centro de México. Vet. Méx. 35: 75-82.
11. **Chiodini R. J., Van Kruiningen H. J., Merkal R. S., Thayer W. R., Coutu J. A.** 1984. Characteristics of an unclassified *Mycobacterium* species isolated from patients with disease. J. Clin. Microbiol. 20: 966-971.
12. **Chiodini R. J.** 1996. Inmunology: resistanse to paratuberculosis. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Prac. 12: 313-339.
13. **Chui L.W., King R., Lu P., Manninen K., Sim J.** 2004. Evaluation of four DNA extraction methods for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by polymerase chain reaction. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 48: 39-45.
14. **Cocito C., Gilot P., Coene M., De Kesel M., Poupart P., Vannuffel P.** 1994. Paratuberculosis. Clin. Microbiol. Rev. 7: 328-345.
15. **Collins D., Gabric D., De Lisle G.** 1990. Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. J. Clin. Microb. 28: 1591-1596.
16. **Collins M. T.** 1996. Diagnosis of paratuberculosis. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 12: 357-372.
17. **Collins M. T.** 1997. *Mycobacterium paratuberculosis*: A Potential Food-Borne Pathogen?. J. Dairy Sci. 80: 3445-3448.
18. **Collins D., Cavaignac S., de Lisle G.** 1997. Use of four DNA insertion sequences to

- characterize strains of the *Mycobacterium avium complex* isolated from animals. Mol. Cell. Probes. 11: 373-380.
19. **Collins D., De Zoete M., Cavaignac S.** 2002. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains from cattle and sheep can be distinguished by a PCR test based on a novel DNA sequence difference. J. Clin. Microbiol. 40: 4760-4762.
 20. **Collins M.** 2003a. Update on paratuberculosis: Epidemiology of Johne's disease and the biology of *Mycobacterium paratuberculosis*. Irish Vet. J. 56: 565-574.
 21. **Collins M.** 2003b. Paratuberculosis: Review of present knowledge. Acta Vet. Scand. 44: 217- 221.
 22. **Collins M.** 2004. Update on paratuberculosis: Control and zoonotic potential. Irish Vet. J. 57: 49-52.
 23. **Corpa J. M., Garrido J., García Marín J. F., Pérez V.** 2000. Classification of lesions observed in natural cases of paratuberculosis in goats. J. Comp. Path. 122: 255-265.
 24. **De Juan L., Santos A., Aranaz S., Montero N., Álvarez J., Vela A., Las Heras A., Mateos A., Domínguez L.** 2002. Control strategies to obtain a paratuberculosis free-caprine herds. Abstract online. 7th International Colloquium on Paratuberculosis. Bilbao, Spain: 11th -14th june, 2002. <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst7_p30.htm> [consulta: 20 de diciembre del 2002].
 25. **Dimarelli-Malli Z., Sarris K.** 2001. Comparison of DNA probe test and cultivation methods for detection of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in caprine and ovine faeces. Aust. Vet. J. 79: 47-50.
 26. **Eriks I., Munck K., Besser T., Cantor G., Kapur V.** 1996. Rapid differentiation of *Mycobacterium avium* and *M. paratuberculosis* by PCR and restriction enzyme analysis. J. Clin. Microbiol. 34: 734-737.
 27. **Francois B., Krishnamoorthy R, Elion J.**1997. Comparative study of *Mycobacterium paratuberculosis* strains isolated from Crohn's disease and Johne's disease using restriction fragment length polymorphism and arbitrarily primed polymerase chain reaction. Epidemiol.

- Infect. 118: 227-233.
28. **Fus M., Szteyn J., Wiszniewska A. , Herman L** 2003. Comparison of three methods of releasing DNA from *Mycobacterium avium* subsp.*paratuberculosis* cells. Bull. Vet. Inst. Pulawy 47: 107-112.
 29. **Gao A., Mutharia L., Chen S., Rahn K., Odumeru J.** 2002. Effect of pasteurization on survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. J. Dairy Sci. 85: 3198-3205.
 30. **García Marín J. F., Tellechea J., Gutiérrez M., Corpa J., Pérez V.** 1999. Evaluation of two vaccines (killed and attenuated) against small ruminant paratuberculosis. Abstract online. 6th. International Colloquium on Paratuberculosis, Melbourne , Australia Feb 14-18. < http://www.paratuberculosis.org/proc6/abst2_25.htm > [consulta: 12 de julio del 2004].
 31. **Gezon H., Bither H., Gibbs H., Acker E., Hanson L., Thompson J., Jorgenson R.** 1988. Identification and control of paratuberculosis in a large goat herd. Am. J. Vet. Res. 49: 1817-1823.
 32. **Grant I., Ball H., Neill S., Rowe M.** 1996. Inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in cow`s milk at pasteurization temperatures. Appl. Environ. Microbiol. 62: 631-636.
 33. **Grant I., Ball H., Rowe M.** 1998. Effect of higher pasteurization temperatures, and longer holding times at 72 degrees C, on the inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. Lett. Appl. Microbiol. 28: 461-465.
 34. **Grant I.R., O'Riordan L.M., Ball H.J., Rowe M.T.** 2001. Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw sheep and goats milk in England, Wales and Northern Ireland. Vet. Microbiol. 79: 123-131.
 35. **Grant I.R.** 2003. *Mycobacterium paratuberculosis* and milk. Acta Vet. Scand 44: 261-266.
 36. **Greenstein R.J.** 2003. Is Crohn's disease caused by a *mycobacterium*? Comparisons with leprosy, tuberculosis, and Johne's disease. Lancet Infect. Dis. 3: 507-514.
 37. **Greger M.,** 2001. Paratuberculosis and Crohn's Disease: Got Milk?. < <http://www.mad-cow.org/00/paraTB.html> > [consulta: 13 de marzo del 2003]

38. **Harris B., Barletta R.** 2001. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. Clin. Microbiol. Reviews 14: 489-512.
39. **Holstad G., Dønne B., Sigurdardóttir O., Pavlik I., Ahrens P., Tharaldsen J., Schönheit J., Storset A., Nyberg O.** 2002. Evaluation of possible cross-infection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*M. a. paratuberculosis*) between sheep, goats and cattle in Norway. Abstract online. 7th International Colloquium on Paratuberculosis. Bilbao, Spain: 11th -14th june, 2002. < http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst7_o14.htm > [consulta: 15 de febrero del 2004].
40. **INE.** 1997. VI Censo Nacional Agropecuario. Instituto Nacional de Estadísticas. 443 p.
41. **Kalis C., Hesselink J., Barkema H., Collins M., Visser I.** 1999a. Factors influencing the isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from bovine fecal samples. J. Vet. Diagn. Invest. 11: 345-351.
42. **Kalis C., Hesselink J., Barkema H.** 1999b. Vaccination does not prevent faecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Abstract online. 6th. International Colloquium on Paratuberculosis, Melbourne , Australia Feb 14-18.
< http://www.paratuberculosis.org/proc6/abst2_33.htm > [consulta: 12 de julio del 2004].
43. **Kalis C., Hesselink J., Barkema H., Collins M.** 2000. Culture of strategically pooled bovine fecal samples as a method to screen herds for paratuberculosis. J. Vet. Diagn. Invest. 12: 547-551.
44. **Kennedy D., Benedictus G.** 2001. Control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in agricultural species. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 20 :151-179.
45. **Khalifeh M., Stabel R.** 2004. Effects of gamma interferon, interleukin-10 and transforming growth factor β on the survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in monocite-derived macrophages from naturally infected cattle. Infection and Immunity 72: 1974-1982.
46. **Krt B, Ocepek M., Pislak M., Juntas P., Pogacnik M., Cvetnic Ž.** 2002. Correlation

- between seropositive reactors to paratuberculosis and to pseudotuberculosis in sheep. Abstract online. 7th International Colloquium on Paratuberculosis. Bilbao, Spain: 11th -14th june, 2002. <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst3_p6.htm> [consulta: 12 de julio del 2004].
47. **Lugton I.** 1999. Mucosa-associated lymphoid tissues as sites for uptake, carriage and excretion of tubercle bacilli and other pathogenic mycobacteria. *Immunol. Cell. Biol.* 77: 364-372.
 48. **Manning E., Collins M.** 2001. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 20: 133-150.
 49. **Manning E.J.B., Steinberg H., Krebs V., Collins M.** 2003. Diagnostics testing patterns of natural *Mycobacterium paratuberculosis* infection in pygmy goats. *Can. J. Vet. Res.* 67: 213-218.
 50. **Molina A., Morera L., Llanes D.** 1991. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Mycobacterium paratuberculosis* in goats. *Am J. Vet. Res.* 52: 863-868.
 51. **Moser C.** 1982. Johne's Disease (Paratuberculosis) in a goat. *Can. Vet. J.* 23: 63-66.
 52. **Muehlherr J. E., Zweifel C., Corti S., Blanco J. E., Stephan R.** 2003. Microbiological quality of raw goat's and ewe's bulk-tank milk in Switzerland. *J. Dairy Sci.* 86: 3849-3856.
 53. **Nielsen S.S., Nielsen K.K., Huda A., Condrón R., Collins M.T.** 2001. Diagnostic techniques for paratuberculosis. *Bull. Inter. Dairy Fed.* Nº 362, pp 5-17.
 54. **OIE,** 2000. Paratuberculosis. In: Manual of standards for diagnostic test and vaccines. 4th ed. Paris Office Internationale des Epizooties: 292-303.
 55. **Pavlik I., Matlova L., Bartl J., Svastova P., Dvorska L., Whitlock R.** 2000. Parallel faecal and organ *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* culture of different productivity types of cattle. *Vet. Microbiol.* 77: 309-324.
 56. **Pérez V., Tellechea J., Badiola J. J., Gutiérrez M., García Marín J. F.** 1997. Relation between response and pathologic findings in sheep with naturally acquired

- paratuberculosis. Am. J. Vet. Res. 58: 799-803.
57. **Pislak M., Ocepek M., Zabavnik J., Pogacnik M.** 2003. Comparison of four methods for isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DNA from tissue samples. Slov. Vet. Res. 40: 91-97.
58. **Richards W., Thoen Ch.** 1977. Effect of freezing on the viability of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine feces. J. Clin. Microb. 6: 392-395.
59. **Richter E., Wessling J., Lügering N., Domschke W., Rüscher-Gerdes S.** 2002. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in a patient with HIV. Germany Emerg. Infect. Dis. 8: 729-731.
60. **Sanderson J., Moss M., Tizard M., Hermon-Taylor J.** 1992. PCR detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in Crohn's Disease tissue DNA extracts. Abstract online. 3th International Colloquium on Paratuberculosis. Florida, USA. 28th sept. – 2nd Oct., 1991. <<http://www.paratuberculosis.org/proc3/page201.htm>> [consulta: 15 de febrero del 2004].
61. **Schoren C., Kluver P., Butler K., McDonald W., Hope A., Condrón R.** 2002. Factors affecting the survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in soil. Abstract online. 7th International Colloquium on Paratuberculosis. Bilbao, Spain: 11th -14th june, 2002. <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst1_o5.htm> [consulta: 15 de febrero del 2004].
62. **Sechi L. A, Mura M, Tanda E., Lissia A., Fadda G., Zanetti S.** 2004. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in tissue samples of Crohn's disease patients. New Microbiol. 27: 75-77.
63. **Segura J., Honhold N.** 1993. Manual de muestreo para la Salud y Producción Animal. Universidad autónoma de Yucatán. Merida, México. 47p.
64. **Sherman D., Gezon H.** 1980. Comparison of Agar Gel Immunodiffusion and fecal culture for identification of goats with paratuberculosis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 177: 1208-1211.
65. **Sigurdardóttir Ó. G., Press C. M., Evensen Ø.** 2001. Uptake of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* through the distal small intestinal mucosa in goats: An

- ultrastructural study. *Vet. Pathol.* 38: 184-189.
66. **Smith M., Sherman D.** 1994. Digestive System. In: *Goat Medicine*. Williams & Wilkins. Baltimore City. U.S.A. pp 307-311.
67. **Stabel J., Steadham E., Bolin C.** 1997. Heat inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk: Are current pasteurization conditions effective?. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4975-4977.
68. **Stabel J., Pearce L., Chandler R., Hammer P., Klijn N., Cerf O., Collins M., Heggum C., Murphy P.** 2001. Destruction by heat of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk and milk products. *Bull. Inter. Dairy Fed.* Nº 362, pp 53- 61.
69. **Stehman S.** 1996. Paratuberculosis in small ruminants, deer, and South american camelids. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 12 : 441- 445.
70. **Stehman S., Shulaw W.** 1996. Paratuberculosis (Johne's Disease) in sheep and goats: Recommendations for diagnosis and control.
< http://goatconnection.com/articles/publish/article_128.shtml > [Consulta: 06 de febrero de 2004].
71. **Stephens L.R.** 1993. Johne´s Disease. Bacteriology and serology. In: *Australian Diagnostic Techniques for Animal Diseases*. L.A. Corner, T.J. Bagust (Eds.) CSIRO for the Standing Committee on Agriculture and Resources Management. East Melbourne. 11p.
72. **Sung N., Collins M.** 2000. Effect of three factors in cheese production (pH, salt, and heat) on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* viability. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1334-1339.
73. **Sweeney R. W., Whitlock R. H, Rosenberger A. E.** 1992. *Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. *J. Clin. Microbiol.* 30: 166-171.
74. **Sweeney R.** 1996. Transmission of paratuberculosis. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 12 : 305-12.
75. **Tafti A. K., Rashidi K.** 2000. The pathology of goat paratuberculosis: Gross and

- histopathological lesions in the intestines and mesenteric lymph nodes. J. Vet. Med. B. 47: 487-495.
76. **Tooker B., Burton J., Coussens P.** 2002. Survival tactics of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine macrophage cells. Vet. Immunol. Immunopathol. 87: 429-437.
77. **Valentin-Weigand P., Goethe R.** 1999. Pathogenesis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infections in ruminants: still more questions than answers. Microbes and Infection 1: 1121-1127.
78. **Van Metre D., Tyler J., Stehman S.** 2000. Diagnosis of enteric disease in small ruminants. Vet. Clinic. North Am. Food Anim. Pract. 16: 87-115.
79. **van Schaik G., Stehman S., Schukken Y., Rossiter C., Shin S.** 2002. A model to estimate optimal pool-sizes of fecal samples to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in dairy herds. Abstract online. 7th International Colloquium on Paratuberculosis. Bilbao, Spain: 11th -14th june, 2002 < http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst4_o4.htm > [consulta: 15 de febrero del 2004].
80. **van Schaik G., Stehman S., Schukken Y., Rossiter C., Shin S.** 2003. Pooled fecal culture sampling for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* at different herd sizes and prevalence. J Vet. Diagn. Invest. 15: 233-241.
81. **van Weering H., Koene M., Hesselink J., Weber M.** 2002. Reduction of the contamination rate of fecal cultures of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Abstract online. 7th International Colloquium on Paratuberculosis. Bilbao, Spain: 11th -14th june, 2002. < http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst4_p5.htm > [consulta: 15 de febrero del 2004].
82. **Weber M., Oosterhuis V., Koene M., Kalis C.** 2002. Re-testing cattle following contamination at different incubation stages of fecal culture for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Abstract online. 7th International Colloquium on Paratuberculosis. Bilbao, Spain: 11th -14th june, 2002. < http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst4_p6.htm > [consulta: 17 de febrero del

2004]

83. **Wells S., Whitlock R., Linderman C., Fyock T.** 2002. Evaluation of bacteriologic culture of pooled fecal samples for detection of *Mycobacterium paratuberculosis*. Am. J. Vet. Res. 63 :1207-1211.
84. **Wells S.J., Godden S.M., Lindeman C.J., Collins J.E.** 2003. Evaluation of bacteriologic culture of individual and pooled fecal samples for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in dairy cattle herds. J. Am. Vet. Med. Assoc. 223: 1022-1025.
85. **Whan L., Grant I., Ball H., Scott R., Rowe M.** 2001. Bactericidal effect of chlorine on *Mycobacterium paratuberculosis* in drinking water. Lett. Appl. Microbiol. 33: 227-31.
86. **Whan L., Ball H., Rowe M.** 2002. Can *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* exhibit cross-protection when subjected to stresses relevant to the water treatment industry?. Abstract online. 7th International Colloquium on Paratuberculosis. Bilbao, Spain: 11th -14th June, 2002. <http://www.paratuberculosis.org/proc7/abst6_p5.htm> [consulta: 15 de febrero del 2004].
87. **Whipple D., Kapke P., Vary C.** 1990. Identification of restriction fragment length polymorphisms in DNA from *Mycobacterium paratuberculosis*. J. Clin. Microbiol. 28: 2561-256
88. **Whitlock R.H., Rosenberger A.E.** 1990. Fecal culture protocol for *Mycobacterium paratuberculosis*. A recommended procedure. Proc. Ann. Meeting US. Anim. Hlth. Assoc. 94: 280-285.
89. **Whittington R. J., Hope A. F., Marshall D. J., Taragel C. A., Marsh I.** 2000a. Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: IS900 restriction fragment length polymorphism and IS1311 polymorphism analyses of isolates from animals and a human in Australia J. Clin. Microbiol. 38: 3240-3248.
90. **Whittington R.J., Fell S., Walker D., McAllister S., Marsh I., Sergeant E., Taragel C. A., Marshall D. J., Links I. J.** 2000b. Use of pooled fecal culture for sensitive and economic detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in flocks of

- sheep. J. Clin. Microb. 38: 2550-2556.
91. **Whittington R., Sergeant E.** 2001. Progress towards understanding the spread, detection and control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in animal populations. Aust. Vet. J. 79: 267-278.
 92. **Whittington R., Eamens G., Cousins D.** 2003. Specificity of absorbed ELISA and agar gel immuno-diffusion tests for paratuberculosis in goats with observations about use of these tests in infected goats. Aust. Vet. J. 81: 71-75.
 93. **Whittington R., Marshall D., Nicholls P., Marsh I., Reddacliff L.** 2004. Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment. Appl. Environ. Microbiol. 70: 2989-3004.
 94. **Williams E., Snyder S., Martin K.** 1983. Pathology of spontaneous and experimental infection of North American wild ruminants with *Mycobacterium paratuberculosis* .Vet. Pathol. 20: 274-291.
 95. **Yayo Ayele W., Macháčková M., Pavlík I.** 2001. The transmission and impact of paratuberculosis infection in domestic and wild ruminants. Vet. Med. – Czech 46: 205–224.
 96. **Yoshimura H.H, Graham D.Y.** 1988. Nucleic acid hybridization studies of mycobactin-dependent mycobacteria. J. Clin. Microbiol. 26: 1309-1312.

ANEXO 1**CUESTIONARIO PARATUBERCULOSIS CAPRINA****Rebaño n°**.....

1. Propietario_____
2. Ubicación_____
3. Tipo de explotación leche carne mixta
4. Reposición totalmente con animales propios sí no
5. Si contesta no, donde consiguió los animales_____
6. Número de animales mayores de 1 año_____
7. Sistema de utilización de pastos Intensivo Extensivo Mixto

8. Manejo del rebaño

- Tipo de alimentación de cabritos madre tarro sustituto
- Existe separación entre cabritos y adultos_____
- Existe suministro de agua y alimentos en forma higiénica_____
- Existe pastoreo separado de otra especie animal_____

9. Conocimiento acerca de paratuberculosis:

- ¿ Conoce acerca de paratuberculosis?_____
- ¿ Ha notado bajas individuales en la producción láctea?_____
- ¿ Ha tenido casos de diarreas recurrentes?_____
- ¿ Ha tenido casos de enflaquecimiento progresivo?_____
- ¿ Ha tenido muerte de animales flacos y con lesiones intestinales?_____
- ¿ Ha realizado alguna acción de control de paratuberculosis?

ANEXO 2**1.1.- Preparación del Medio Herrold:**

1. Pesar los siguientes ingredientes: Proteasa peptona, cloruro de sodio, agar noble, extracto de carne y piruvato de sodio.
2. Agregar glicerol y agua desionizada.
3. Calentar hasta disolver con magneto con una temperatura de 150 °C
4. Ajustar pH a 7.2 con NaOH al 0.1 M
5. Añadir Mycobactina J
6. Autoclavar a 120°C por 1 hora
7. Enfriar por media hora a 60°C
8. Agregar verde de malaquita al 2% y agitar
9. Añadir las yemas de huevos y agitar
10. Añadir los antibióticos y agitar
11. Con tubo corto dosificar 5 ml por tubo hasta completar 100 tubos tapa rosca

1 frasco de 500ml	-
Dosificador con tubo corto	-
100 tubos con tapa rosca	5 ml /tubo
Agua destilada deionizada	445
NaOH (0.1 M)	-
Mycobactina J	1 ml
Huevos s/ antibióticos	50 ml
Verde malaquita 2% autoclavada	2.6 ml
Proteasa peptona	4.5 g
NaCl	2.25g
Agar	7.5g
Extracto de carne	1.35g

Glicerol	13.5ml
Piruvato de Na+	2g
Vancomicina	2.5 ml
Amphotericina	2.5ml
Ácido Nalidixico	2.5ml

11. Dejar los tubos inclinados a T^o ambiente por una noche
12. Colocar tubos a 37°C por un día
13. Dejar con la tapa rosca suelta por una semana para permitir la evaporación de la humedad residual de la superficie del medio
14. Almacenar los tubos en refrigerador hasta su utilización.

1.2.- Preparación de los huevos:

Usar huevos frescos infértiles y libres de antibióticos, para obtener sus yemas utilizando 5 huevos por 500 ml. de medio Herrold obteniendo aproximadamente 50 ml.

1. Lavar los huevos con detergente y agua
2. Enjuagar y secar
3. Sumergir los huevos en etanol al 95% por 30 minutos mínimo
4. Romper huevos bajo cámara estéril
5. Extraer la yema
6. Revolver con bageta hasta homogenizar
7. Traspasar el contenido al medio Herrold

Se prepararon tres medios Herrold, uno sin mycobactina J y sin antibióticos otro solo con mycobactina J y por último un tercero con mycobactina J y antibióticos.

ANEXO 3**1.1.- Preparación de soluciones madres:**

a.- Mycobactina J: agregar 2 ml de etanol al 95% a un frasco con 2 mg. de mycobactina J quedando 1 mg/ml. Para añadir 1 ml por medio litro de medio realizado.

b.- Verde de Malaquita: agregar 200 mg de verde de malaquita a 10 ml. de agua desionizada para obtener una solución al 2%. Disolver bien. Autoclavar por 20 minutos. Almacenar a T° ambiente. Usar 2.6 ml. por medio litro de medio.

c.- Amphotericina B: agregar 100 mg. de Amphotericina B a 10 ml. de agua desionizada para obtener una solución al 1%. Filtrar. Se utiliza 25 mg. por medio litro de medio.

d.- Ácido Nalixídico: agregar 100 mg. de Ácido Nalixídico a 10 ml. de agua desionizada para obtener una solución al 1%, mezclar bien y filtrar. Se utiliza 25 mg. por 500 ml. de medio.

e.- Vancomicina: Disolver 100 mg. en 5 ml. de agua desionizada para obtener una solución al 5%, mezcla bien y filtrar. Usar 125 mg. por 500 ml. de medio Herrold.

1.2.- Preparación de soluciones descontaminantes:**1.21.- Solución HPC**

1. Disolver 18.5 gr. de Caldo cerebro-corazón en 981.5 ml. de agua desionizada
2. Esterilizar en autoclave por 20 minutos
3. Dejar enfriar
4. Agregar 9 gramos de HPC
5. Mezclar
6. Almacenar a 4°C

1.22.- Solución antibiótica

1. Tomar asépticamente 100 ml de solución caldo corazón cerebro y agregar los siguientes antibióticos:

- 1 0.5 ml Amphotericina B (5 mg/ml)

2 1 ml de Vancomicina (10 mg /ml)

3 1 ml Ac. Nalixídico (10 mg/ml)

2. Almacenar a 4°C

Agregar 1 ml de esta solución al pellet luego de la centrifugación.