Estudio de la paratuberculosis en un rebaño de ovinos de la sabana de Bogotá mediante la utilización de tres técnicas diagnósticas

Luisa Fernanda Mancipe Jiménez* / José Luis Sánchez Cárdenas*
Germán Rodríguez Martínez**

Resumen

El presente trabajo se llevó a cabo en una granja de ovinos de la Sabana de Bogotá, donde la finalidad de la investigación fue realizar un estudio de la paratuberculosis en dicho rebaño, con el fin de diagnosticar mediante tres técnicas diagnósticas la presencia del *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Para esto se emplearon 250 hembras ovinas pertenecientes a la Granja Experimental ICA-San Jorge, donde se tomó a cada animal una muestra de materia fecal, y mediante la coloración de Zielh Neelsen se determinó la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes. A continuación, se procedió a aplicar la prueba de intradermorreacción o tuberculinización (PPD Aviar® Sagar B-0653-034) a todas las ovejas y, por último, se realizó una prueba de serología (Elisa Pourquier®). De las muestras de materia fecal, solo diez resultaron positivas, de las cuales, cuatro fueron de carácter dudoso. En la tuberculinización se encontró que dieciséis animales resultaron positivos, debido a que presentaron una reacción ≥ 5 mm, pero tres de ellos fueron sospechosos, ya que en la medición arrojaron valores < 5 mm. En la prueba de Elisa se encontró que dos animales reaccionaron positivamente. Adicionalmente, se realizó un seguimiento de caso a uno de los animales objeto de estudio, que resultó positivo a las pruebas realizadas, a partir del cual, además, por medio de histopatología y necropsia, se logró confirmar la presencia de la enfermedad. Los hallazgos sugieren que para realizar un diagnóstico exitoso de la paratuberculosis, es necesaria la combinación de dos o más técnicas con el fin de determinar la distribución y el estado de la enfermedad en el rebaño.

Palabras clave: paratuberculosis, coloración Zielh Neelsen, intradermorreacción, Elisa, reacción.

* Médicos veterinarios de la Universidad de La Salle. Práctica particular. Correos electrónicos: lufemaji@gmail.com / mocholin@gmail.com

** Médico veterinario zootecnista de la Universidad Nacional de Colombia. Ph.D. en Epidemiología. Docente de la Universidad de La Salle. Correo electrónico: gerodriguezm@unisalle.edu.co

Paratuberculosis study in a sheep flock of la sabana de bogotá by using three diagnostic techniques

Abstract

The present work was carried out in a sheep farm of la Sabana de Bogotá, where the purpose of this research was to make a paratuberculosis study in that flock aiming to diagnose by three diagnostic techniques the *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* presence. It was used 250 ovine females of San Jorge Experimental Farm – ICA, where a pheces sample were taken from each animal and by Zielh Neelsen's stain it was stablished the presence of acid fast bacilli. Then, it was made the tuberculinization process (PPD AVIAR® SAGAR B – 0653-034) to the entire population of female sheep and finally, it was carried out a serology test (ELISA Pourquier®). From the stool sample, only 10 was positive where 4 of them were questionable. In the skin test it was found that 16 animals were positive due to a reaction ≥ to 5 mm, however, 3 of them were suspicious due to meterings < to 5 mm. In the ELISA test only 2 animals were positive. In adition, it was followed up a case of an animal that resulted positive to all techniques, also to histophatology and necropsy, confirming the presence of the disease. The findings suggest the need of several tests for a successful diagnose of paratuberculosis with the purpose of set the status and distribution of the disease in the flock.

Keywords: paratuberculosis, Zielh Neelsen's stain, skin test, ELISA, reaction.

Introducción

La paratuberculosis o enfermedad de Johne es una enfermedad crónica del intestino causada por el *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), el cual pertenece al grupo de las micobacterias del complejo *Mycobacterium avium* que comprende saprófitas ambientales, patógenos oportunistas y patógenos obligados que son de gran importancia en veterinaria y medicina por su implicación en infecciones de animales de granja y pacientes inmunodeprimidos (Chiodini, 1993).

Afecta principalmente a rumiantes domésticos y salvajes, y adquiere mayor importancia entre las especies típicas explotadas por el hombre como son bovinos, ovinos y caprinos, sin olvidar mencionar ciervos, búfalos, camellos, etc.

La patogénesis de la paratuberculosis comienza con la entrada de las bacterias a través del tejido linfoide del intestino delgado (placas de Peyer, principalmente) por mediación de las células M epiteliales. Los bacilos son fagocitados por macrófagos, en cuyo interior sobreviven y se multiplican, evitando los mecanismos bactericidas de estas células. Aún no están claros todos los eventos que suceden en la interrelación hospedador-parásito, ni los posibles factores de virulencia de MAP. Según los conocimientos actuales, existen cuatro etapas que caracterizan el progreso de la enfermedad: infección silenciosa, enfermedad subclínica, enfermedad clínica y enfermedad clínica avanzada. Tras la infección (fase de infección silenciosa) se abre un periodo de dos años o más sin signos de enfermedad (fase de enfermedad subclínica), estadios iniciales en los que predomina una respuesta inmune celular. Según avanza la enfermedad hacia estadios clínicos (fases de enfermedad clínica y clínica avanzada), la respuesta inmune va haciéndose más específica, la cual es reemplazada por un componente humoral con producción de anticuerpos específicos (Stabel *et ál.*, 2000).

El mecanismo de transmisión principal de la enfermedad es la vía fecal-oral, por ingestión de pasturas contaminadas con heces de animales infectados, ubres sucias, corrales desaseados, etc. Adicionalmente, existen otros tipos de transmisión que han cobrado fuerza, como la transmisión interespecie, desde la cual se afirma la posibilidad de infección de ovinos con bovinos, caprinos, ciervos, etc., y viceversa. También es de gran importancia la transmisión intrauterina, por ingestión de calostro y leche contaminados, por semen de machos positivos y embriones contaminados, entre otros (Bielanski *et ál.*, 2006; Buergelt *et ál.*, 2004; Sweeney, 1996).

Las investigaciones sobre la paratuberculosis son difíciles debido al lento crecimiento del *M. paratuberculosis*, al largo periodo de incubación de la infección y a la pérdida de confiabilidad sobre el modelo para investigar la interacción huésped-patógeno. A pesar de la introducción de protocolos moleculares para facilitar el diagnóstico de la enfermedad, las herramientas que están disponibles no son confiables para detectar animales infectados, especialmente en estadios tempranos de la infección. La paratuberculosis se encuentra extendida por todo el mundo, y a pesar de que la dificultad de su diagnóstico enmascara la realidad, las prevalencias que se calculan son muy elevadas. Actualmente se trabaja en programas que subrayan la caracterización de los factores de riesgo y la concientización de ganaderos y veterinarios en relación con la implementación de buenas prácticas de manejo, ya que el establecimiento de programas de vacunación genera costos muy elevados, aunque con el tiempo se espera que sean asequibles a los productores de todo el país (Cashman *et ál.*, 2008; Dhand *et ál.*, 2007).

Materiales y métodos

El trabajo se llevó a cabo en la Granja Experimental San Jorge-ICA, ubicada en la vereda San Jorge del municipio de Soacha (Cundinamarca), y en los laboratorios de bacteriología de la sede La Floresta de la Universidad de La Salle, ubicada en la ciudad de Bogotá; para este fin se utilizaron un total de 250 hembras ovinas (*Ovis aries*) de las razas *black face*, *cheviot*, *corriedale*, *hampshire*, *merino rambouillet*, *romney marsh*, mora, criolla y cruces, con edades que oscilan entre uno y nueve años.

Coloración ácido-alcohol resistente (Ziehl-Neelsen)

Toma y conservación de muestras de materia fecal

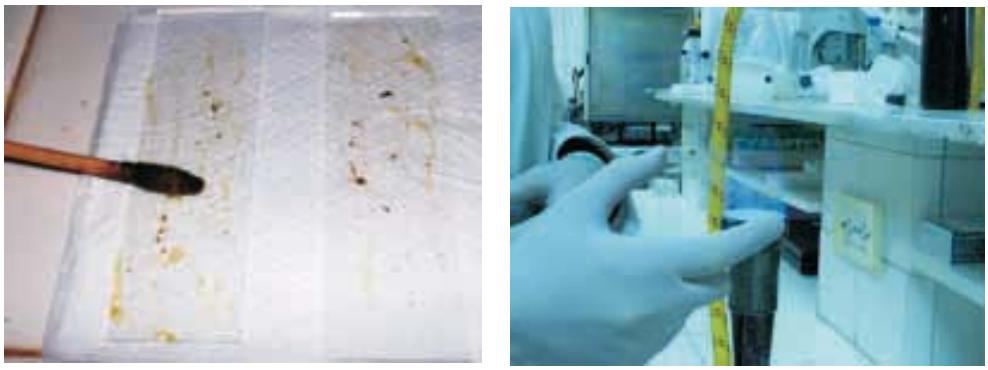
Se realizó la recolección de materia fecal directamente del animal por medio de la introducción de los dedos índice y corazón a través del recto; cada muestra fue inmediatamente almacenada en una bolsa plástica de cierre hermético y debidamente rotulada. Posteriormente, las muestras fueron empacadas en una nevera de icopor (poliestireno expandido) para ser protegidas de la luz directa. Una vez llegaron las muestras al laboratorio de bacteriología de la Universidad de La Salle, se sometieron a refrigeración (4 ºC) hasta el momento de ser procesadas.

Procesamiento de las muestras

Se realizó un frotis de las heces de cada animal en láminas portaobjetos, luego se dejó secar cada lámina a temperatura ambiente y después se procedió a fijar al calor mediante la utilización de un mechero (figura 1).

Luego se colocaron en los soportes las láminas separadas entre sí por espacios de 3-5 mm para coloraciones, donde se cubrió a cada una de ellas con la fucsina fenicada (colorante de fondo), y durante cinco minutos se calentó suavemente por debajo hasta que se observó el desprendimiento de vapores, sin permitir que el reactivo entrara en ebullición; inmediatamente se lavó cada lámina con un chorro de agua débil. Posteriormente, se cubrieron con alcohol ácido (decolorante) por un lapso de veinte segundos y nuevamente fueron lavadas con agua. Por último, se cubrió cada lámina con el azul de metileno (colorante de contraste) durante dos minutos y luego se lavaron con agua; se dejaron secar a temperatura medioambiental para ser observadas con el microscopio, empleando el objetivo 100X.

Figura 1. Frotis y fijación al calor de heces.

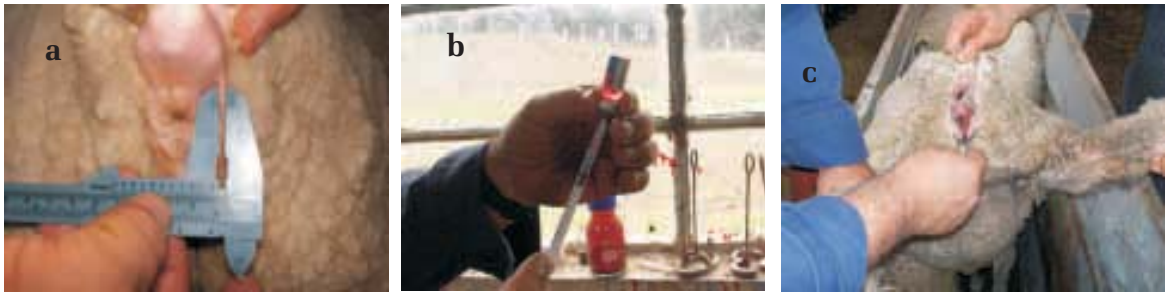


Prueba de intradermorreacción

Se realizaron 250 pruebas intradérmicas y adicionalmente se seleccionaron catorce animales menores de un año de edad, de los cuales siete eran hembras y siete machos, para determinar el comportamiento de la enfermedad en sus estadios iniciales en animales jóvenes. Se procedió a reunir la población de hembras en los corrales de la granja para realizar la aplicación de la tuberculina en el pliegue caudal derecho de cada animal. Se tomó a cada oveja por separado, levantándole a cada una la cola para realizar la medición del grosor del pliegue derecho con un cutímetro (figura 2a); este dato fue denominado *lectura inicial*.

En seguida se aplicó en cada oveja una dosis de 0,1 ml de tuberculina aviar (PPD Aviar® Sagar B-0653-034) en dicho pliegue (figura 2b y 2c). 72 horas después se realizó la lectura final, a partir de la cual se estableció que todo animal que tuviera en la diferencia de las lecturas (inicial-final) un espesor del pliegue ≥ a 5 mm se consideraría como positivo.

Figura 2. Tuberculinización en ovinos: a). medición del pliegue derecho, b). tuberculina aviar, c). aplicación de PPD.



Prueba de Elisa

Se procedió a reunir todas las hembras en los corrales para realizar la toma de la muestra de sangre de la vena cefálica, empleando Vacutainers™ de calibre 21G x 1½" (Becton Dickinson®, USA) por animal, y la muestra fue recolectada en tubos BD Vacutainer® de 7 ml sin anticoagulante (tapa roja, Becton Dickinson®, USA). Luego, las muestras fueron llevadas al laboratorio del ICA-Ceisa, donde se procesaron. Se empleó un kit que detecta anticuerpos (IgG) contra *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en suero (Elisa / Indirect Bicupule pour 240 reactions, Institut Pourquier®), procedimiento que consiste en capturar por reacción de los complejos inmunes los anticuerpos presentes en un fluido biológico (suero, plasma, orina, leche) por medio de un antígeno fijado a un sustrato reconocido por estos.

Cuestionario para recolectar información acerca de los factores de riesgo

Se realizó una entrevista de la cual se obtuvo información principalmente acerca del manejo de los animales y el control y manejo de la enfermedad. La información fue analizada y comparada con los resultados obtenidos en el cuestionario realizado por los autores.

Resultados

Coloración ácido-alcohol resistente (Ziehl-Neelsen)

De las 250 coloraciones realizadas se obtuvieron diez muestras en donde se encontraron bacilos áci-

do-alcohol resistentes (figura 3a), mientras que 240 animales no eliminaron el bacilo en la materia fecal por medio de la coloración ácido-alcohol resistente (figura 3b), como se puede apreciar en la tabla 1. Según los datos obtenidos, la mayoría de la población reaccionó negativamente a la prueba (96%), mientras que tan solo 4% reaccionó de manera positiva.

Figura 3. Coloración de Ziehl-Neelsen: a). Ziehl-Neelsen positivo, b). Ziehl-Neelsen negativo.

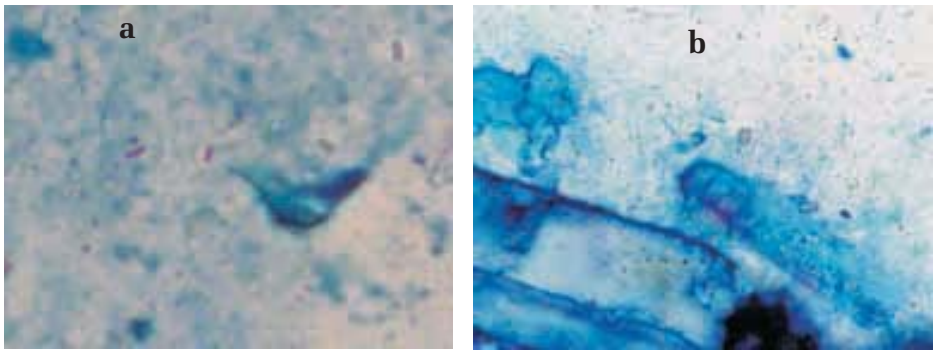


Tabla 1. Resultados prueba de Ziehl-Neelsen.

Raza	# Animales positivos	# Animales negativos	Total
Cheviot	0	6	6
Corriedale	2	40	42
Black face	2	18	20
Cruces	0	18	18
Mora	1	14	15
Romney marsh	2	57	59
Criollo	1	42	43
Hampshire	0	39	39
Merino	2	6	8
Total	**10**	**240**	**250**

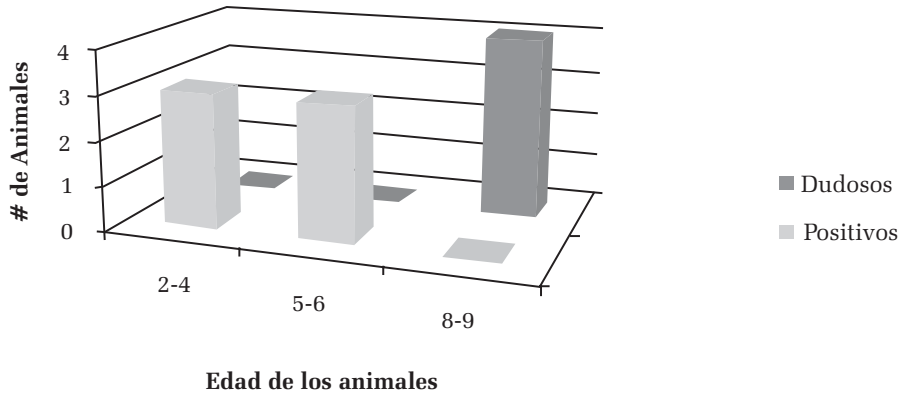
De acuerdo con las edades de los animales que se encontraron positivos (2-6 años), se deduce que pueden existir individuos con bacilos ácido-alcohol resistentes en materia fecal, pero no son necesariamente animales positivos frente a *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (tabla 2).

Tabla 2. Edad de animales positivos frente a la coloración con Zielh-Neelsen (ZN).

Raza Animal	Edad	Resultado ZN
Corriedale	6 años	Positivo
Corriedale	6 años	Positivo
Merino	5 años	Positivo
Criollo	9 años	Dudoso
Black face	8 años	Dudoso
Mora	4 años	Positivo
Black face	2 años	Positivo
Merino	9 años	Dudoso
Romney marsh	9 años	Dudoso
Romney marsh	4 años	Positivo

Según los resultados obtenidos en la tabla anterior, se puede decir que los animales ubicados en edades entre los dos y los seis años presentaron bacilos ácido-alcohol resistentes claramente identificables en materia fecal, mientras que los animales ≥ ocho años son de resultado dudoso (figura 4).

Figura 4. Edad de animales positivos y dudosos frente a ZN.



Prueba de intradermorreacción

De las 250 pruebas realizadas se encontró que dieciséis animales reaccionaron positivamente a la tuberculina, es decir, que obtuvieron como diferencia entre la lectura inicial y la final un espesor del pliegue de la cola ≥ a 5 mm (figura 5a), aunque tres de estas ovejas son sospechosas debido a que en la diferencia de mediciones obtuvieron valores entre 3,5 y 4,5 mm (figura 5b) (tabla 3).

Figura 5. Tuberculinización en ovinos: a). tuberculina positiva, b). tuberculina sospechosa.

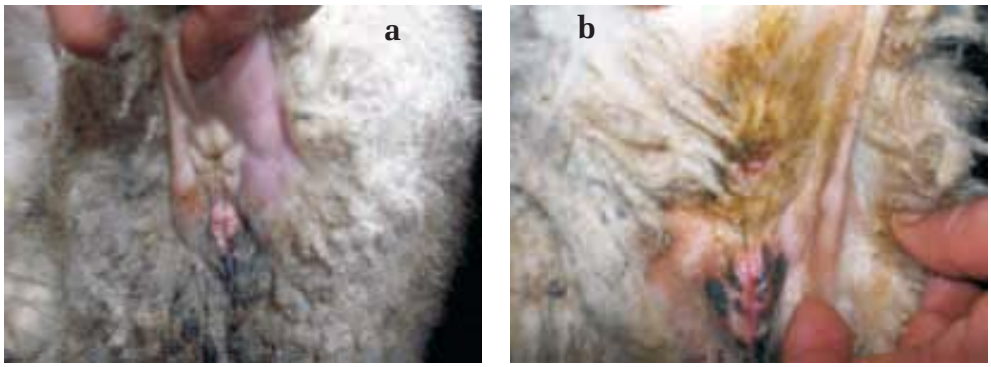


Tabla 3. Resultados prueba de intradermorreacción.

ID oveja	Lectura inicial (mm)	Lectura final (mm)	Diferencia entre lecturas (mm)	Resultado
0292	2,5	7,0	4,5	+/-
0878	2,5	11,0	8,5	+
02602	3,0	19,0	16,0	+
02608	3,0	13,0	10,0	+
02980	2,5	10,0	7,5	+
03006	2,0	14,0	12,0	+
03686	2,5	6,0	3,5	+/-
03930	2,0	9,0	7,0	+
04208	1,5	14,0	12,5	+
04502	2,5	12,0	9,5	+
04638	3,5	15,0	11,5	+
05004	3,0	11,0	8,0	+
05606	2,0	8,0	6,0	+
05868	2,0	10,0	8,0	+
06600	3,0	7,0	4,0	+/-
07632	2,5	14,0	11,5	+

Debido a la obtención de animales sospechosos (1,1%) y positivos (4,9%), se decidió corroborar los resultados mediante la repetición de la coloración de Zielh-Neelsen a dichos animales, y se encontró que diez de los dicciséis individuos fueron positivos a Zielh-Neelsen y a la tuberculinización (figura 5), tres de los dieciséis fueron negativos y los tres animales restantes solo resultaron positivos a la prueba de la tuberculina (tabla 4).

Figura 6. Confirmación de tuberculinización por Zielh-Neelsen.

Tabla 4. Resultados de la coloración Zielh-Neelsen vs. tuberculinización.

ID oveja	Tuberculina	Zielh-Neelsen	Resultados
0292	-	-	Negativo
0878	+	+	Positivo
02602	+	+	Positivo
02608	+	+	Positivo
02980	+	-	Positivo
03006	+	+	Positivo
03686	-	-	Negativo
03930	+	-	Positivo
04208	+	+	Positivo
04502	+	+	Positivo
04638	+	+	Positivo
05004	+	+	Positivo
05606	+	-	Positivo
05868	+	+	Positivo
06600	-	-	Negativo
07632	+	+	Positivo

Prueba de Elisa

De la población total de hembras ovinas, se encontró que solo dos animales resultaron positivos a la prueba de Elisa. La mayoría de la población (99,2%) resultó ser negativa a la prueba, mientras que 0,8% de las hembras dio positivo a la prueba serológica (figura 7) (tabla 5).

Figura 7. Porcentaje de animales positivos vs. negativos.

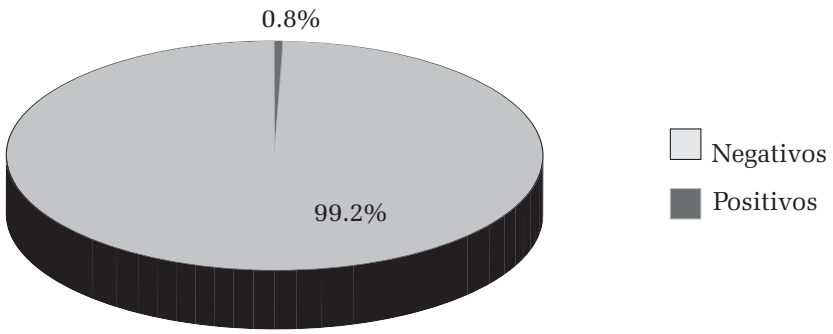


Tabla 5. Número de casos positivos mediante la prueba de Elisa.

	Positivos	%	Negativos	%	Sospechosos	%	Total
Elisa	2	0,79	248	99,21	0	0	250

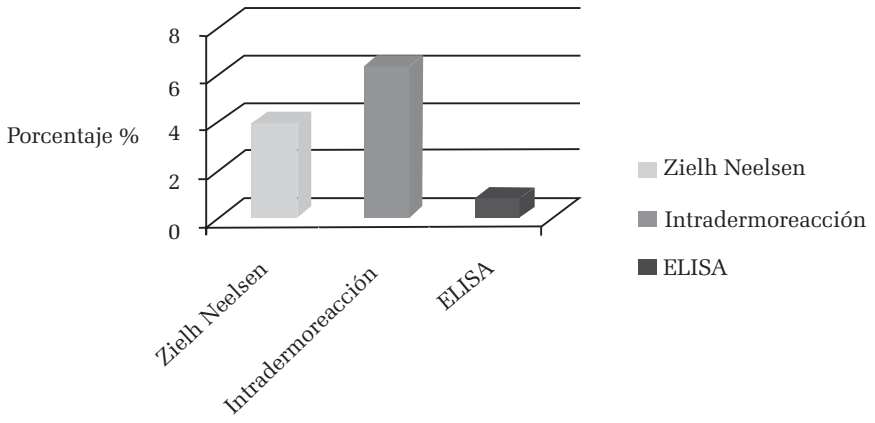
En relación con las tres pruebas realizadas, en la tabla 6 se presentan los resultados de positividad y negatividad obtenidos en la población total de hembras de la granja San Jorge.

Tabla 6. Total de positivos y negativos a ZN, intradermorreacción y Elisa.

Prueba	Total de positivos	% positivos	Total de negativos	% negativos	Total
Zielh-Neelsen (ZN)	10	4	240	96	250
Intradermorreacción	16	6.4	234	93,6	250
Elisa	2	0.8	248	99,2	250

Al graficar los animales positivos se obtiene que la prueba de intradermorreacción presenta un mayor número de animales positivos (6,4%), en segundo lugar está la coloración de Zielh-Neelsen con 4% de positivos y, por último, la prueba de Elisa que detectó el 0,8%, como se puede observar en la figura 8.

Figura 8. Porcentaje de animales positivos a ZN, intradermorreacción y Elisa.



Cuestionario para recolectar información acerca de los factores de riesgo

Se realizó la recolección de los datos por medio de la encuesta realizada al técnico encargado de la granja ovina ICA-San Jorge, a partir de la cual se obtuvieron los siguientes resultados (tabla 7).

Tabla 7. Historia y manejo de la paratuberculosis en la granja.

Parámetros	Resultado	Descripción
Duración y estado de la enfermedad		
Año en que fue diagnosticada	2004	
Método diagnóstico utilizado		
Sx clínicos / post mórtem	----	El establecimiento de la enfermedad es reciente y se ha corroborado por la realización de pruebas de serología cada 6-12 meses, además de los signos clínicos observados que dan indicios del desarrollo de la enfermedad de Johne. Sin embargo, la enfermedad apenas está estableciéndose, lo que indica que probablemente existen varios animales afectados por ésta.
Histopatología	----	
Serología	Sí	
Prueba fecal	----	
Otras / ¿cuál?	Examen visual	
Sx observados de paratuberculosis		
Muertes	Sí	
Pérdida de condición corporal	Sí	
Pérdida del vellón	Sí	
Ninguno	----	
Otro	----	
Mortalidad		
Porcentaje	1,5%	La mortalidad es baja debido al sacrificio inmediato de todo animal positivo a Elisa.
Fuente de la infección	Posible introducción de animales infectados	
Estrategias de control		
Procedimientos		
Sacrificio de animales con baja CC	Sí	Los métodos de control de la paratuberculosis son los adecuados para disminuir la diseminación de la enfermedad y reducir las pérdidas económicas.
Aislamiento de animales jóvenes	Sí	
Desinfección de praderas	Formol 10%	
Manejo de animales enfermos		
Fusil sanitario	Sí	
Aislamiento	Sí	

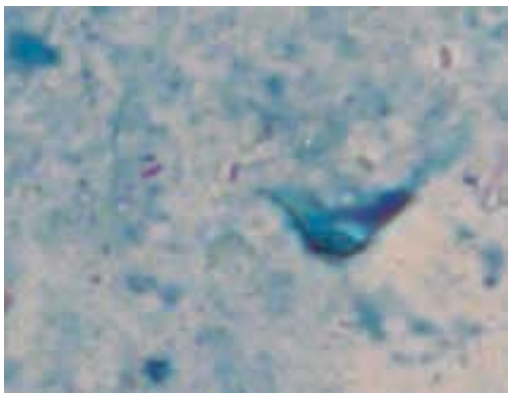
Seguimiento caso de paratuberculosis

A partir de los resultados obtenidos, se encontró que un animal perteneciente a la raza merino, con una edad de cinco años, fue positivo a cada una de las pruebas realizadas (figura 6). Este animal nació en la granja y su madre no reportó anamnesis de paratuberculosis. Por medio de la encuesta, se infirió que este individuo adquirió la enfermedad por la posible introducción de animales infectados a la granja, aproximadamente hace cuatro años.

Figura 9. Oveja merino positiva.

Baciloscopia positiva a la coloración de ZielhNeelsen en materia fecal (figura 10), donde se observa claramente las bacterias ácido-alcohol resistentes.

Figura 10. Baciloscopia positiva.



En la prueba de intradermorreacción este animal tuvo en su lectura inicial una medición del pliegue caudal derecho de 2 milímetros, y en la lectura final, 14 milímetros de espesor, lo que arroja una diferencia de 12 milímetros, indicativa de una buena respuesta a la prueba (figura 11).

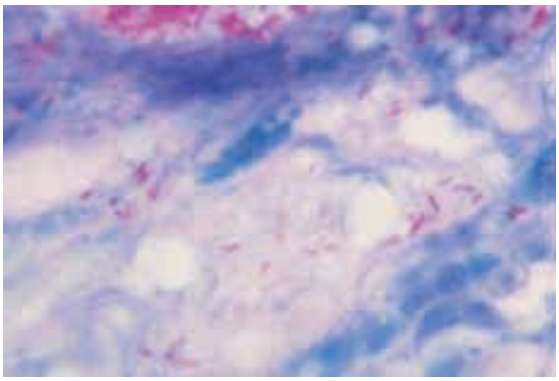
Figura 11. Intradermorreacción merino positiva.

Luego se realizó la prueba de Elisa en la cual manifestó altos títulos de anticuerpos contra *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Debido a que el animal resultó positivo a las tres pruebas, fue sacrificado y se tomaron muestras de tejidos que incluían ganglios linfáticos mesentéricos, duodeno, íleon e intestino grueso. La necropsia realizada al animal mostró el estado de emaciación en el que se encontraba, como se observa en la figura 12.

Figura 12. Necropsia de merino positiva.

Según los resultados de histopatología, se verificó la presencia de bacilos en el íleon, corroborando los resultados de las pruebas anteriores (figura 13).

Figura 13. Histopatología de merino positiva.



Discusión

Coloración ácido-alcohol resistente (Ziehl-Neelsen)

Se logró observar en 10 de las 250 muestras la morfología típica del bacilo; sin embargo, 4 de los 10 frotis positivos son de naturaleza dudosa. Esto demuestra que la técnica no puede arrojar un dato aproximado de los animales que se encuentran eliminando el bacilo, debido a que es posible que la prueba se haya desarrollado en un periodo durante el cual las ovejas no estaban eliminando el agente de forma activa, es decir, son eliminadoras intermitentes. Adicionalmente, se puede observar otros bacilos ácido-alcohol resistentes en las heces de animales sanos, por lo tanto, su presencia en materia fecal no puede utilizarse como criterio definitivo para clasificar a un animal como infectado con MAP. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Zimmer y col., (1999), quienes encontraron un 8,8% de resultados falsos positivos al examen microscópico directo comparado con el cultivo fecal y PCR.

Se encontró que 240 animales no eliminaron el bacilo en la materia fecal por medio de la coloración ácido-alcohol resistente, y, de acuerdo con Zimmer y col. (1999), la coloración de Zielh-Neelsen alcanza una especificidad de apenas 86%, que es un valor considerado como aceptable debido a que corresponde a una población de animales clínicamente sanos.

Prueba de intradermorreacción

Se conoce que la inmunidad mediada por células es la respuesta primaria y de mayor impacto frente a las infecciones micobacteriales, por lo tanto, se destaca la prueba de intradermorreacción debido a que mide la respuesta celular temprana en el individuo afectado (Kalis, 2003). En este caso, se puede decir que la respuesta de la PPD aviar frente al *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* presentó una reactividad de 4,9%, lo que indica que posiblemente es baja la presencia de la enfermedad en su estadio temprano, sin embargo, no debe considerarse como una prueba definitiva, ya que se ha documentado la obtención de falsos positivos y negativos, además de bajos niveles de sensibilidad y especificidad, en estudios realizados anteriormente (Tripathi *et ál*, 2006). Sumado a esto, Monaghan *et ál*. (1994) plantean que la tuberculina tiene una sensibilidad de 68-95% y una especificidad de 96,3%, dependiendo del estado sanitario de cada granja respecto a la enfermedad, lo cual indica que la prueba carece de confiabilidad cuando es realizada en poblaciones que presentan baja carga bacteriana.

De las 14 pruebas que fueron aplicadas en animales menores de un año de edad, de los cuales siete eran hembras y siete machos, todas resultaron negativas; por otro lado, de acuerdo con los resultados obtenidos por Reddacliff & Whittington (2003), la tuberculinización en corderos es muy sensible en infecciones tempranas, pero la respuesta de hipersensibilidad retardada decae en pocas horas y de esta manera ellos

no desarrollan la inflamación característica que provoca el test cuando es positivo.

Prueba de Elisa

Según Nielsen y Toft (2008), la sensibilidad diagnóstica de una prueba refleja la habilidad para detectar si la infección está presente (animales positivos), y la especificidad diagnóstica de una prueba refleja la habilidad de la misma para detectar los animales negativos, dado que la infección no está presente en estos animales.

En una amplia revisión del tema, Sergeant y colaboradores (2003) señalan que el éxito de las pruebas serológicas como Elisa, en cuanto a sensibilidad se refiere, radica en el grado de respuesta de los animales frente a la prueba, el número de animales muestreados y la prevalencia de la enfermedad en el rebaño. Además, afirma que la sensibilidad de este tipo de pruebas varía en amplios rangos, es decir, se pueden encontrar valores < 10% (cuando se quiere diagnosticar la fase subclínica de la enfermedad) y hasta 90% (generalmente en casos clínicos avanzados), lo que indica una variabilidad de la prueba debido a la etapa clínica en la que se encuentran los animales y la distribución de la enfermedad. En contraste con los pobres índices de sensibilidad, se ha reportado que la especificidad de la prueba para establecer el diagnóstico de la paratuberculosis en ovejas es de 91 a 100% (Coelho, 2007; Hilbink, 1994).

Con base en esta revisión y según los resultados obtenidos en la prueba, donde se encontró que solo dos animales de 250 reaccionaron positivamente, se puede decir que la Elisa arrojó un porcentaje de positividad de 0,8% (dos animales) y que los individuos que reaccionaron como positivos se encuentran en la etapa subclínica de la enfermedad, ya que no presentan diarrea, separación de los vellones, fragilidad de la lana y pérdida gradual de peso; sin embargo, tienen anticuerpos de la enfermedad detectables y presentan una respuesta inmune alterada, lo que lleva a pensar que eliminan bajas cantidades del microorganismo en la materia fecal.

Además se encontró que las dos ovejas afectadas son de raza *black face* y merino *rambouillet* con edades de ocho y cinco años, respectivamente. Son animales nacidos en la granja y sus madres no fueron diagnosticadas como positivas frente a paratuberculosis. Según los estatutos del ICA, se plantea que todo animal positivo macho o hembra (vacía o gestante) debe ser sacrificado. Se deduce que los animales adquirieron la infección probablemente por contaminación de pasturas y bebederos, según lo estipulado por Dhand y colaboradores (2007), quienes afirman que la contaminación de pasturas y el entorno son los principales factores de riesgo para la diseminación de la enfermedad de Johne.

Nielsen y cols. (2008) definen tres condiciones claves para establecer el estado y el grado de eliminación de bacilos de paratuberculosis para lograr un diagnóstico exitoso de la enfermedad, a saber: animales afectados (presentan sintomatología clínica), animales infecciosos (eliminan el bacilo durante el desarrollo de la prueba) y animales infectados por *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* (portan el agente mas no lo diseminan). Debido a los resultados obtenidos y a la observación de los animales positivos, se infiere que estos individuos son animales infecciosos, ya que se encuentran eliminando el patógeno, situación que los convierte en factores de riesgo potencial para los demás animales que pueden ser susceptibles a la enfermedad (generalmente animales jóvenes).

A pesar de los resultados obtenidos en las tres pruebas realizadas, Sevilla (2007) afirma que los métodos más comúnmente utilizados *in vivo* son el cultivo fecal y la prueba de Elisa, pero otros como la detección de interferón-γ (IFN- γ) van tomando mayor protagonismo, ya que tratan de identificar animales infectados antes de que presenten sintomatología clínica, y pue-

den ir acompañados de la prueba de intradermorreacción. No obstante, métodos más específicos como la histopatología o Elisa carecen de sensibilidad precisamente por su ineficacia en la identificación de animales con paratuberculosis subclínica, mientras que los más sensibles como el cultivo (considerado como técnica de referencia pero poco viable por su lentitud y costo), la estimulación de la producción de IFN-γ o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) parecen ser demasiado inespecíficos, al menos en términos prácticos de predicción de la enfermedad clínica.

Finalmente, dados los resultados obtenidos en las diferentes técnicas diagnósticas empleadas, cabe recalcar la relación intrínseca existente entre la tuberculinización y la coloración ácido-alcohol resistente, ya que manifiestan su potencial diagnóstico cuando son llevadas a cabo de manera conjunta, evidenciando todo aquel animal que se encuentre en las etapas preliminares de la enfermedad y que constituye un factor de riesgo potencial para la supervivencia del rebaño. Se considera por los resultados obtenidos en este estudio que la tuberculinización y la coloración de Zielh-Neelsen son pruebas que fácilmente pueden ser desarrolladas en campo cuando se tenga sospecha de la presencia de la enfermedad, ya que brindan una buena detección de la reacción celular temprana, la cual puede corroborarse con la posible presencia de micobacterias en la materia fecal. Cabe resaltar además la importancia del empleo de técnicas de biología molecular de gran capacidad diagnóstica como la PCR, la cual establece un diagnóstico mucho más preciso, implementando en un tiempo más reducido, programas de prevención, control y erradicación de la enfermedad.

Cuestionario para recolectar información acerca de los factores de riesgo

Dhand *et ál*. (2007) han observado que la alta población de animales en un rebaño lleva a grandes contaminaciones de las pasturas, debido al gran número de animales por unidad de área y al incremento de la diseminación del MAP por las madres como resultado del estrés nutricional. Consecuentemente, los corderos son altamente susceptibles a la infección, y en el presente estudio se encontró que esta población de animales se encuentra expuesta a dosis bajas de MAP, lo cual se demostró mediante la presencia de un bajo número de animales infectados detectados mediante la coloración de Zielh-Neelsen, intradermorreacción y Elisa. Adicionalmente, el 40% del área total de la granja es empleado en el pastoreo de los animales, haciendo que la contaminación de las pasturas sea constante por los animales diseminadores de la infección.

Como métodos de control de la paratuberculosis, en la granja emplean el sacrificio de animales con baja condición corporal y aíslan a los animales jóvenes de los adultos infectados. Dhand *et ál.* (2007) consideran que cuando existen altas tasas de prevalencia del agente, los granjeros plantean estrategias tales como el sacrificio de ovejas de bajo peso y la venta de pequeños lotes de animales, convirtiendo estas prácticas en medidas rápidas para amortiguar las elevadas pérdidas económicas por la enfermedad de Johne. Sin embargo, en un estudio previo realizado por Muskens *et ál*. (2003), se demuestra que la asociación entre el sacrificio de animales clínicos o animales potencialmente clínicos con respecto al estatus sanitario del rebaño, ocasiona grandes pérdidas económicas que desalienta las expectativas financieras del productor.

Conclusiones

La coloración de Zielh-Neelsen es un método poco confiable cuando se establece como único método diagnóstico, ya que se demostró la escasa capacidad de esta técnica para detectar animales infectados subclínica y clínicamente de manera certera, debido a que es posible observar otros bacilos ácido-alcohol resistentes en las heces de animales sanos.

De acuerdo con las edades de los animales que se encontraron positivos frente a Zielh-Neelsen, pueden existir individuos con bacilos ácido-alcohol resistentes en materia fecal, pero no son necesariamente animales positivos a *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis.*

La técnica de Zielh-Neelsen no puede arrojar un dato aproximado de los animales que se encuentran eliminando el bacilo, debido a que es posible que la prueba se haya desarrollado en un periodo durante el cual las ovejas son eliminadoras intermitentes del bacilo.

La prueba de intradermorreacción mide la respuesta celular temprana en el individuo afectado, por lo tanto, la detección de la enfermedad es baja en sus estadios iniciales, ya que la respuesta de la PPD aviar frente al *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* presentó un bajo porcentaje de animales positivos (4,9%) y 1,1% de animales sospechosos.

La tuberculinización es un método relativamente específico y útil para el diagnóstico temprano de la paratuberculosis en la mayoría de los rebaños.

La tuberculinización en corderos es muy sensible frente a infecciones tempranas, pero la respuesta de hipersensibilidad retardada decae en pocas horas y, de esta manera, estos animales no desarrollan la inflamación característica que provoca el test cuando arroja resultados positivos.

Los resultados obtenidos en la prueba de Elisa fueron muy bajos (0,8%), y los animales que reaccionaron como positivos se encuentran en el comienzo de la etapa clínica de la enfermedad, presentando fragilidad de la lana y pérdida gradual de peso, lo que contrasta con la presencia de anticuerpos de la enfermedad detectables y una respuesta inmune alterada. Esto lleva a pensar que eliminan cantidades moderadas del microorganismo en la materia fecal.

Se logró corroborar que la sensibilidad de la prueba de Elisa depende de la fase clínica de la enfermedad en la que se encuentre el animal, ya que la alta sensibilidad de la prueba ocurre en estadios tardíos o en la fase clínica de la paratuberculosis.

Los animales que se encuentran en estadios tempranos de la infección, incluso si se encuentran eliminando el microorganismo, no son necesariamente identificados por Elisa, debido a que pueden pasar meses o incluso años para que haya seroconversión.

Los individuos positivos a la enfermedad de Johne son animales infecciosos, ya que se encuentran eliminando el patógeno, situación que los convierte en factores de riesgo potencial para los demás animales que pueden ser susceptibles a la enfermedad, generalmente animales jóvenes.

Para llegar a un diagnóstico real de la paratuberculosis en un animal o en un rebaño, es necesario realizar varias pruebas diagnósticas, comenzando desde la menos sensible y específica hasta aquella que determina con gran certeza la presencia del bacilo, con el fin de reducir las pérdidas económicas.

Bibliografía

Aly, S. and Thurmond, M. "Evaluation of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection of dairy cows attributable to infection status of the dam". *Journal of American Veterinary Medical Association* 227. 3 (2005): 450-454.

Bielanski, A., Algire, J., Randall, G., and Surujballi, O. "Risk of transmission of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis by embryo transfer of in vivo and in vitro fertilized bovine embryos". *Theriogenology* 66. (2006): 260-266.

Buergelt, C. D., Donovan, G., Williams, A., and Joseph, E. "Identification of Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis by polymerase chain reaction in blood and semen of a bull with clinical Paratuberculosis. *Intern. J. Appl. Res. Vet. Med.* 2. 2 (2004): .

Cashman W., Buckley, J., Quigley, T., Fanning, S., More, S., Egan, J., Berry, D., Grant, I. and O'Farrell, K. "Risk factors for the introduction and within-herd transmission of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) infection on 59 Irish dairy herds". *Irish Veterinary Journal* 61. 7 (2008): 464-467.

Çetinkaya, B., Erdogan, H. M., and Morgan, K. L. "Relationships between the presence of Johne's disease and farm and management factors in dairy cattle in England". *Preventive Veterinary Medicine* 32. (1997): 253-266.

Chiodini, R. J. "Abolish Mycobacterium paratuberculosis strain 18". *Journal of Clinical Microbiology* 31. (1993): 1956-1958.

Coelho, A. C., Pinto, M. L., Silva, S., Coelho, A. M., Rodrigues, J., and Juste, R. A. "Seroprevalence of ovine paratuberculosis infection in the Northeast of Portugal". *Small Ruminant Research* 71. (2007): 298-303.

Collins, M. T. "Diagnosis of paratuberculosis". *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 12. 2 (1996): 357-371.

Coussens, P. M. "Model for immune responses to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in cattle". *Infection and Immunity* 72. 6 (2004): 3089-3096.

Dhand, N. K., Eppleston, J., Whittington, R. J., and Toribio, J. A. "Risk factors for ovine Johne's disease in infected sheep flocks in Australia". *Preventive Veterinary Medicine* 82. (2007): 51-71.

Harris, N. B. and Barletta, R. G. "Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis in Veterinary Medicine". *Clinical Microbiology Reviews* 14. 3 (2001): 489-512.

Hilbink, F., West, D. M., Lisle, G. W., Kittelberger, R., Hosie, B. D., Hutton, J., Cooke, M. M., and Penrose, M. "Comparison of a complement fixation test, a gel diffusion test and two absorbed and unabsorbed ELISAs for the diagnosis of paratuberculosis in sheep". *Veterinary Microbiology* 41. (1994): 107-116.

Hutchinson, L. J. "EconomiciImpact of Paratuberculosis. Veterinary clinics of North America. *Food Animal Practice* 12. (1996): 373-381.

Kalis, C. H. J., Collins, M. T., Hesselink, J. W., and Barkema, H. W. "Specificity of two tests for the early diagnosis of bovine paratuberculosis based on cell-mediated immunity: the Johnin skin test and the gamma interferon assay". *Veterinary Microbiology* 97. (2003): 73-86.

Magnano, G., Schneider, M., Carranza, A., Bergamo, E., Giraudo, J. A., y Henríquez, M. B. "Evaluación serológica de paratuberculosis en el sudoeste de la provincia de Córdoba, Argentina". *Veterianria Argentina* 19. 190 (2002): 741-746.

Mainar-Jaime, R. C. and Vázquez-Boland, J. A. "Factors associated with seroprevalence to *Mycobacterium paratuberculosis* in small-ruminant farms in the Madrid region (Spain)". *Preventive Veterinary Medicine* 34. (1998): 317-327.

Merkal, R. S., Larsen, A. B., and Booth, G. D. "Analysis of the effects of inapparent bovine paratuberculosis". *American Journal of Veterinary Research* 36. 6 (1975): 837-838.

Monaghan, M. L., Doherty, M. L., Collins, J. D., Kazda, J. F., and Quinn, P. J. "The tuberculin test". *Veterinary Microbiology* 40. (1994): 111-124.

Muskens, J., Bakker, D., De Boer, J., and Van Keulen, L. "Paratuberculosis in sheep: its possible role in the epidemiology of paratuberculosis in cattle". *Veterinary Microbiology* 78. (2001): 101-109.

Muskens, J., Elbers, A. R., Van Weering, H. J., and Noordhuizen, J. P., "Herd management practices associated with paratuberculosis seroprevalence in Dutch dairy herds". *J. Vet. Med. Series B* 50. (2003): 372-377.

Nedrow, A. J., Gavalchin, J., Smith, M. C., Stehman, S. M., Maul, J. K., McDonough, S. P., and Thonney, M. L. "Antibody and skin-test responses of sheep vaccinated against Johne's Disease". *Veterinary Immunology and Immunopathology* 116. (2007): 109-112.

Nielsen, S. S. and Toft, N. "Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: a review of accuracies of ELISA, interferon-g assay and faecal culture techniques". *Veterinary Microbiology* 129. (2008): 217-235.

Reddacliff, L. A. and Whittington, R. J. "Experimental Infection of weaner sheep with S strain *Mycobacterium avium* subsp. Paratuberculosis". *Veterinary Microbiology* 96. (2003): 247-258.

Sergeant, E. "Ovine Johne's disease in Australia: the first 20 years". *Australian Veterinary Journal* 79. 7 (2001): 484-491.

Sergeant, E., Marshall, D., Eamens, J., Kearns, C., and Whittington, R. J. "Evaluation of an absorbed ELISA and an agar-gel immuno-diffusion test for ovine paratuberculosis in sheep in Australia". *Preventive Veterinary Medicine* 61. (2003): 235-248.

Sevilla, I. "Caracterización molecular, detección y resistencia de mycobacterium avium subespecie paratuberculosis". Tesis doctoral. Universidad del País Vasco- Departamento de Agricultura, Pesca y Alimentación. 2007.

Sivakumar, P., Tripathi, B. N., Singh, N. and Sharma, A. K. "Pathology of naturally ocurring Paratuberculosis in water buffaloes (Bubalus bubalis)". *Veterinary Pathology* 43. (2006): 455-462.

Stabel, J. R. "Transitions in immune responses to *Mycobacterium paratuberculosis*". *Veterinary Microbiology* 77. (2000): 465-473.

Stabel, J. R. "Paratuberculosis: an update". World Buiatrics Congress. Niza, Francia. 2006.

Sweeney, R. W. "Transmission of Paratuberculosis". *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice* 12. 2 (1996): 305-312.

Tripathi, B. N., Sivakumar, P., Paliwal, O. P., and Singh, N. "Comparison of IS900 tissue PCR, bacterial culture, johnin and serological tests for diagnosis of naturally occurring paratuberculosis in goats". *Veterinary Microbiology* 116. (2006): 129-137.

Whitlock, R. H. and Buergelt, C. "Preclinical and clinical manifestations of Paratuberculosis (incliding pathology)". *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice* 12. 2 (1996): 345-355.

Wu, C. W., Livesey, M., Schmoller, S. K., Manning, E. J., Steinberg, H., Davis, W. C., Hamilton, M. J. and Talaat, A. M. "Invasion and persistence of

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* during early stages of Johne's isease in calves". *Infection and Immunity* 75. 5 (2007): 2110-2119.

Zimmer, K., Drager. K. G., Klawonn, W., and Hess, R. G. "Contribution to the diagnosis of Johne's disease in cattle. Comparative studies on the validity of Ziehl-Neelsen staining, faecal culture and a commercially available DNAProbe test in detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in faeces fron cattle". *Journal of Veterinary Medicine* 46. (1999): 137-140.