

## EVALUACION DE TRES METODOS DE DIAGNOSTICO PARA LA DETECCION DE PARATUBERCULOSIS EN CABRAS

CAROLINA RAMÍREZ CASILLAS<sup>1</sup>

ROBERTO GONZÁLEZ SÁNCHEZ<sup>1</sup>

JOAQUÍN DE LUCAS TRON<sup>2</sup>

### Resumen

Se evaluaron las pruebas de inmunodifusión en gel, intradermorreacción (Johnina) y cultivo de heces, para diagnosticar la enfermedad de Johne (paratuberculosis) en un grupo de 35 cabras lecheras naturalmente infectadas. Estos animales fueron sangrados, se les tomó muestra fecal y se les aplicaron 0.2 ml de johnina intradérmica en el pliegue ano-caudal. De este grupo se seleccionaron 9 animales que resultaron positivos a alguna de las tres pruebas utilizadas, y uno negativo a todas las pruebas; se les sacrificó y se recolectaron dos muestras de intestino delgado y ganglio linfático mesentérico por animal para cultivo bacteriológico y para histopatología. Se compararon los resultados obtenidos en las pruebas de inmunodifusión en gel, intradermorreacción y cultivo de heces con el crecimiento del microorganismo a partir de los órganos cultivados y la presencia del mismo en los cortes histológicos vistos al microscopio. El muestreo se llevó a cabo de marzo a septiembre de 1982. En los nueve animales sacrificados se aisló *Mycobacterium paratuberculosis* a partir de las muestras de intestino delgado y ganglio linfático mesentérico, y en los cortes histológicos teñidos con Ziehl Neelsen, se encontró gran cantidad de bacilos ácido-resistentes dentro de células epitelioides. Para la prueba intradérmica hubo 8 animales positivos, para la prueba de inmunodifusión en gel hubo 5 animales positivos y para el cultivo de

heces hubo 4 animales positivos. De los resultados obtenidos se concluye que la mejor prueba en este trabajo fue la intradermorreacción, pues de los nueve animales sacrificados sólo uno resultó falso negativo.

### Introducción

Aun a pesar de que esta enfermedad fue descrita por primera vez en 1895 por Johne y Frothingham (Jubb y Kennedy, 1970), no fue sino hasta 1978 cuando el bacilo paratuberculoso se aisló en México de ganado bovino (Ramírez y col., 1979) y en 1982 en cabras lecheras (Ramírez y col., 1982) en el Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias.

Desde entonces el problema que se ha presentado, al igual que en otros países, es el de implementar una técnica de diagnóstico que sea rápida y confiable que detecte a los animales enfermos que puedan estar diseminando el bacilo paratuberculoso en toda la zona. La enfermedad de Johne es generalmente introducida a un rebaño por un animal infectado, el cual no muestra signos al momento de la compra (Jubb y Kennedy, 1970; Blood y Henderson, 1974), por lo tanto, un retraso en el diagnóstico puede resultar en el establecimiento del microorganismo dentro del rebaño; en nuestro país esto es muy importante ya que es muy común que el propietario del mayor número de animales sea el que venda ganado a los propietarios de menores recursos, y si los animales vendidos están contaminados, la enfermedad se disemina a otras zonas. El diagnóstico de esta enfermedad en animales vivos es muy incierto, ya que según Merkal (1970, 1973) los animales se contagian a temprana edad y al inicio de la misma no hay síntomas aparentes. En el diagnóstico de paratuberculosis se han

Recibido para su publicación el 7 de junio de 1984.

<sup>1</sup> Depto. de Bacteriología y Micología, Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, SA RH, Km. 15.5 Carretera México-Toluca, México, D.F., Código Postal 05110.

<sup>2</sup> Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, A. Postal N° 25, Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

empleado la mayoría de las pruebas serológicas y alérgicas usadas en el diagnóstico de otras enfermedades. Algunos investigadores como Larsen (1951) y Merkal (1973) han encontrado de poco valor estas pruebas aplicadas a bovinos, afirmando que la mejor prueba en vivo para esta especie es el cultivo de heces; sin embargo, esta técnica resulta problemática porque el animal secreta intermitentemente el microorganismo y se requieren 100 organismos por gramo de heces para poder obtener un cultivo (Julián, 1975; Merkal, 1970). Otra forma de diagnóstico es la prueba de la Johnina; se prepara a partir de un cultivo de *M. paratuberculosis* y puede ser usada subcutánea, intravenosa o intradérmicamente (Larsen y Kopecky, 1965). Cuando se usa la vía subcutánea o intradérmica se produce una reacción local comparable a la vista con la reacción que produce la tuberculina. Esta prueba presenta la dificultad de que cruza serológicamente con animales que están tuberculinizados; sin embargo, en México, esta práctica no se lleva a cabo en cabras.

Una nueva técnica de diagnóstico es la prueba de inmunodifusión en agar, y actualmente se sugiere como un método confiable para la identificación de borregos y cabras infectados con *M. paratuberculosis* (Sherman y Gezon, 1980). Sorprendentemente, esta prueba ha resultado de poco valor cuando se utiliza en ganado bovino, pero parece ser adecuada cuando se aplica a bovinos y caprinos (Sherman y Gezon, 1980; Kluge *et al.*, 1968). Esta prueba es de bajo costo, requiere de una pequeña cantidad de suero de cada animal y puede dar resultados en 24 hr. La prueba es generalmente aceptada y su potencial para el futuro es amplio en el diagnóstico de paratuberculosis a nivel de hato en las especies ya mencionadas.

### Objetivo

El objetivo del presente trabajo fue el de evaluar las pruebas de inmunodifusión en agar, intradermorreacción y cultivo de heces en un hato de cabras naturalmente infectado.

### Material y métodos

El hato bajo estudio pertenece a un rancho de cabras lecheras localizado en el estado de Guanajuato. Se formó un grupo de 50 animales sospechosos de estar enfermos de paratuberculosis, estos animales eran de diferentes razas con una edad promedio de cinco años, se les tomaron muestras de heces y sangre para asegurar la presencia de *Micobacterium paratuberculosis* en este grupo de animales. De este grupo se utilizaron 35 animales para evaluar las pruebas de inmunodifusión en agar, intradermorreacción y cultivo de heces. En este grupo, había algunos animales positivos al cultivo de heces y otros positivos a la prueba de inmunodifusión en gel. Para esto, los animales fueron sangrados, se les tomó muestra fecal, se midió el pliegue ano-caudal y se aplicaron 0.2 ml de Johnina intradérmicamente en esta zona. La Johnina fue proporcionada por el Dr. R. Merkal del National Animal Disease Center, de Ames, Iowa. La reacción cutánea se midió a las 24, 48 y 72 horas y se tomaron como positivos los casos con más de 5.5 mm de diámetro de induración en el sitio inoculado, los resultados de este grupo de animales aparecen en el Cuadro 2. De este grupo se seleccionaron nueve animales que resultaron positivos a alguna de las tres pruebas utilizadas, y uno negativo a todas las pruebas. Se les sacrificó, se hizo la observación macroscópica de las vísceras y se recolectaron dos muestras de intestino delgado y ganglio linfático mesentérico por animal, para hacer el cultivo bacteriológico e histopatológico. Se compararon los resultados obtenidos en las pruebas de inmunodifusión en gel e intradermorreacción con el crecimiento del microorganismo a partir del cultivo de los órganos y la presencia del mismo en los cortes histológicos vistos al microscopio. El muestreo se llevó a cabo de marzo a septiembre de 1982.

El cultivo bacteriológico de órganos y heces se hizo siguiendo la técnica del benzalconio (Merkal, 1973). La prueba de inmunodifusión en agar se elaboró con 0.75% de agarosa en tris tampon a pH de 7.2. El antígeno utilizado en esta prueba fue

donado por el Dr. R. Merkál y consiste de un antígeno protoplásmico de *M. paratuberculosis*. La presencia de una o más líneas de precipitación claras y definidas, semejantes a las del suero control positivo, después de 24 a 48 horas se consideró como positivo. Las muestras de intestino delgado y ganglio linfático mesentérico que se trabajaron para histopatología se fijaron en formol al 10% y se incluyeron en parafina para hacer cortes que se tiñeron con hematoxilina-eosina y Ziehl Neelsen.

### Resultados

En el grupo de 50 animales muestreados se obtuvo el 44% (22 animales) de animales positivos a la prueba de inmunodifusión en agar y el 20% (10 animales) animales positivos al cultivo de heces (Cuadro 1). Del hato de 35 animales muestreados posteriormente, el 82.85% (29 animales) de los animales tuvieron una reacción intradérmica positiva. En este mismo grupo un número menor de animales fueron positivos a las otras pruebas de la siguiente manera: 37.14% (13 animales) a la prueba de inmunodifusión en agar y 40% (14 animales) al cultivo fecal (Cuadro 11).

Todos los animales positivos al cultivo de heces lo fueron también a la prueba intradérmica y a la de inmunodifusión en agar, el 28.5% (10 animales) de los animales fueron positivos a la prueba intradérmica, pero no a las pruebas de cultivo de heces

CUADRO 1

**Resultados obtenidos en 50 cabras, utilizando las pruebas de doble difusión en gel y el cultivo de heces para el diagnóstico de paratuberculosis**

	Inmuno difusión* %	**Cultivo de heces %
Positivos	44	20
Negativos	56	80

\* Doble difusión con antígeno protoplásmico de *M. paratuberculosis*.

\*\* Se utilizó medio de yema de huevo de Herold con micobactina P.

CUADRO 2

**Resultados obtenidos en 35 cabras, utilizando las pruebas de intradérmica-reacción, doble difusión en gel y el cultivo de heces para el diagnóstico de paratuberculosis**

	Intradérmica- reacción %	Inmunodifusión %	Cultivo de heces %
Positivos	82.85	37.14	40
Negativos	17.14	62.85	60

o inmunodifusión en agar. Los resultados obtenidos en los diez animales sacrificados fueron los siguientes: los nueve animales que resultaron positivos a alguna de las pruebas a evaluar tuvieron lesiones macroscópicas semejantes a las descritas por Jubb y Kennedy (1970). En general hubo hiperplasia de nódulos linfoides en la mucosa y submucosa de este órgano; los ganglios linfáticos mesentéricos estaban agrandados y edematosos, a través de la cápsula eran visibles algunos focos blanquecinos, la mucosa intestinal se encontraba hiperhémica y el contenido intestinal estaba acuoso. Histológicamente hubo enteritis crónica, la mucosa y submucosa estaban infiltradas con células leucocitarias predominando linfocitos y células epitelioides. En los ganglios linfáticos mesentéricos, hubo granulomas con centros necróticos rodeados por células gigantes de tipo Langhans. En los cortes histológicos coloreados con tinción de Ziehl Neelsen se observaron gran cantidad de bacilos ácido-resistentes dentro de macrófagos y células epitelioides en mucosa y submucosa de intestino delgado y ganglios linfáticos mesentéricos. De estos animales que fueron sacrificados se aisló *M. paratuberculosis* a partir de las muestras de intestino delgado y ganglio linfático mesentérico y en los cortes histológicos teñidos con Ziehl Neelsen de estos mismos órganos, se encontró gran cantidad de bacilos ácido-resistentes dentro de las células epitelioides. En prueba intradérmica hubo ocho animales positivos, cinco animales positivos a la prueba de inmunodifusión en agar y para el

CUADRO 3

Resultados obtenidos en 10 cabras sacrificadas utilizando como pruebas el cultivo bacteriano, histopatología, intradermoreacción, doble difusión en gel y el cultivo de heces, para el diagnóstico de paratuberculosis

	Cultivo bacteria (Int - Gang)*** %	Histopatología (Int - Gang) %	Intradermo- reacción %	Inmunodifusión %	Cultivo de heces %
Positivos	90	90	80	50	40
Negativos	10	10	20	50	60

\*\*\* Intestino delgado y ganglio linfático mesentérico.

cultivo de heces hubo cuatro animales positivos. En el décimo animal sacrificado, que fue negativo a las tres pruebas, no se aisló el *M. paratuberculosis* a partir de órganos ni tampoco hubo presencia del mismo en los cortes histológicos teñidos con Ziehl Neelsen.

### Discusión

Aunque según Larsen (1973) y Merkal (1970) el cultivo de heces es la prueba definitiva para diagnosticar la paratuberculosis en un hato, se ha visto que esta prueba es una de las más complicadas al tratar de desarrollarla, pues muchas veces el animal no excreta el bacilo y por otro lado, la muestra de heces debe contener más de 100 microorganismos por gramo de heces, lo cual es evidente que no es fácil de determinar. El principal problema que nosotros encontramos al utilizar esta prueba fue la gran contaminación por otras bacterias de crecimiento rápido en nuestros medios de cultivo, a pesar de seguir la técnica recomendada. Esto en parte pudo ser la causa del bajo porcentaje de animales positivos a esta prueba, pues en sólo cuatro de los 10 animales sacrificados se logró el aislamiento del microorganismo a partir de heces. La prueba de inmunodifusión en agar es fácil de hacerse y contando con el antígeno, puede manejarse a nivel de campo. Utilizando esta técnica en cabras, Sherman y Gezon (1980) han obtenido buenos resultados en el diagnóstico a nivel de hato, no así para la identificación individual;

los resultados de este autor concuerdan con los obtenidos en este trabajo, en donde sólo cinco animales reaccionaron positivamente a pesar de que se aisló el microorganismo a partir de los órganos obtenidos en la necropsia y se identificó en los cortes histológicos teñidos con Ziehl Neelsen.

Por lo que respecta a la prueba intradérmica, investigadores como Merkal (1970), Vardaman y Larsen (1966), mencionan que es una de las pruebas menos específicas como método de diagnóstico. Por otro lado, Sherman (1980) menciona una buena correlación con animales artificialmente infectados. Sin embargo, este mismo autor menciona haber encontrado una prevalencia alta en hatos en donde el microorganismo fue aislado, sugiriendo que esta prueba puede tener valor sobre un hato base. Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos en este trabajo, pues en nueve animales sacrificados, sólo uno produjo reacción falsa negativa. En un estudio semejante llevado a cabo en bovinos, Larsen y Vardam (1958) encontraron que la prueba intradérmica era la mejor, ya que el bacilo fue encontrado posmórtem en el intestino del 56% (10 animales) de los animales reactores positivos, aunque encontraron también bacilos ácido-resistentes en el intestino de cinco animales no reactores.

Las conclusiones a las que llegamos en este trabajo fueron las siguientes: 1. Es evidente que el empleo de una sola prueba para poder diagnosticar la Enfermedad de Johne no es suficiente. 2. El empleo de las

pruebas de intradermorreacción e inmunodifusión en agar para diagnosticar la presencia de esta enfermedad a nivel de hato puede ser válida, una vez que el microorganismo ha sido aislado en cultivo de heces. En función del escaso número de animales utilizados en este trabajo, los autores sugieren la continuación de este tipo de investigaciones para poder llegar a establecer el método más rápido y efectivo para el diagnóstico de esta enfermedad; al parecer, la técnica de ELISA desarrollada por Merkál ofrece estas cualidades, siendo la principal limitante el costo de implementación.

Agradecimientos: Al Sr. Guillermo Barreto, por la elaboración de los cortes histológicos utilizados en este trabajo, y al M.V.Z. Germán Valero por su ayuda al interpretarlos.

### Summary

The gel diffusion, intradermal (Johnin) and fecal culture tests were evaluated for the diagnosis of Johne's Disease in 35 naturally infected dairy goats. All animals

were bled, fecal sample was collected and 0.2 ml of Johnin was injected intradermally in the anocaudal fold. Sampling was performed from March to September 1982. Nine of the animals were positive to the three tests and only one was negative to the three tests. These ten animals were sacrificed and post-mortem examination was performed. Samples from small intestine and mesenteric lymph node were collected for bacteriological culture and histopathology. The three tests were compared with the bacteriological and histopathological results. *Mycobacterium paratuberculosis* was isolated from small intestine and mesenteric lymph nodes in all nine animals. In the Ziehl Neelsen stained tissue slides many acid-fast bacillus were seen within epithelioid cells. Eight were positive to the intradermal test, five to immunodiffusion and four to fecal culture. From the results it is concluded that the best test for the diagnosis of paratuberculosis in our study was the intradermal injection, with only one false negative in the group of nine animal sacrificed.

### Literatura citada

- BLOOD, D.C. and J.A. HENDERSON, 1974, *Medicina Veterinaria*, 4ª Ed., Nueva Editorial Interamericana, México.
- JUBB, K.V. and P.C. KENNEDY, 1970, *Pathology of Domestic Animals*. Academic Press, Inc., New York.
- JULIAN, R.J., 1975, A short review and some observations on Johne's disease with recommendations for control. *Can. Vet. Jour.* 16:33.
- KLUGE, J.P., R.S. MERKAL, W.S. MONLUX, A.B. LARSEN, K.E. KOPECKY, F.K. RAMSEY and R.P. LEHMANN, 1968, Experimental paratuberculosis in sheep after oral, intratracheal or intravenous inoculation: Lesions and demonstration of etiologic agent. *Am. Jour. Vet. Res.* 5:953-962.
- LARSEN, A.B., 1951, Johne's disease (paratuberculosis) of cattle. Circular N° 873. United States Department of Agriculture. Washington, D. C., p. 1-8.
- LARSEN, A.B. and T.H. VARDAMAN, 1958, A comparison of various diagnostic test with microscopic post-mortem findings in cattle infected with Johne's disease. Sixty-second Annual Proceedings of the United States Livestock Sanitary Association, p. 163-165.
- LARSEN, A.B. and K.E. KOPECKY, 1965, Studies on the intravenous administration of Johnin to diagnose Johne's disease. *Am. Jour. Vet. Res.* 26:673-675.
- LARSEN, A.B., 1973, Johne's disease, immunization and diagnosis. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 163: 902.
- MERKAL, R.S., 1970, Diagnostic methods for detection of paratuberculosis (Johne's disease). Proc. 74th Annual Meet. U.S. Animal Health Association, p. 620.
- MERKAL, R.S., 1973, Laboratory diagnosis of bovine paratuberculosis. *Jour. Am. Vet. Med. Ass.* 163:1100.
- RAMÍREZ, P.C., E.T. TRIGO, F.G. SUÁREZ y R. MERKAL, 1979, Aislamiento e identificación de *Mycobacterium paratuberculosis* en México. *Téc. Pec. Méx.* 36:74-75.
- RAMÍREZ, P.C., C.C. RAMÍREZ, G.E. VALERO y E. T. TRIGO, 1982, Paratuberculosis en cabras. *Téc. Pec. Méx.* 45:104-106.
- SHERMAN, D.M. and H.M. GEZON, 1980, Comparison of agar gel immunodiffusion and fecal culture for identification of goats with paratuberculosis. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 177:1208-1211.