

Manual de Procedimiento Técnico Diagnóstico de Paratuberculosis



Laboratorio de Referencia de la
Office International des Epizooties (OIE)
en Paratuberculosis para América del Sur,
América Central, México, y Caribe



SECRETARIA DE AGRICULTURA,
GANADERIA, PESCA Y ALIMENTACION

SERVICIO NACIONAL
DE SANIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA

Dirección de Laboratorio y Control Técnico
Coordinación de Bacteriología

Manual de Procedimiento Técnico

Diagnóstico de Paratuberculosis

**Laboratorio de Referencia de la
Office International des Epizooties (OIE)**
**en Paratuberculosis para América del Sur,
América Central, México y Caribe**



Dirección de Laboratorios y Control Técnico
Coordinación de Bacteriología

Elaboración y Redacción: Dra. Amelia Bernardelli

Aprobación: Dr. Jorge Rodríguez Toledo

Versión 1.0
Año 2000

PROLOGO

El objetivo de este Manual es dar a conocer el compendio de todas las técnicas empleadas por la Dirección de Laboratorios y Control Técnico.

Los Procedimientos desarrollados corresponden a técnicas aceptadas internacionalmente adoptadas por nuestro Laboratorio y utilizadas en su trabajo cotidiano.

Por lo tanto se aclara que los mismos no son autorías de las personas que en cada caso han explicitado y desarrollado las técnicas de uso en sus áreas respectivas, y que algunas de ellas han sido sujetas a modificaciones para su mejor implementación.

INDICE

Introducción	7
Mecanismos Inmunológicos en Paratuberculosis Bovina	9
Legislación del SENASA	13
Materiales	17
Muestreo	21
Técnica de Laboratorio	25
Anexo	39
Medios de cultivos	41
Método de coloración de Ziehl- Neelsen	45
Histopatología	49
Inmuno difusión en Gel de Agar	53
Fijación del complemento	57
Documentación fotográfica	63
Diagrama de Puntos	67
Bibliografía	71

INTRODUCCION

La Paratuberculosis es una enfermedad infecciosa, contagiosa, de curso crónico, que produce en los ruminantes adultos, diarrea, emaciación y lesiones intestinales. El síndrome de mala absorción es causado por la proliferación del *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Mptb) por infiltración mononuclear. Como consecuencia de ello se producen pérdidas de proteínas, debido a la enteritis, observándose una marcada disminución del peso del animal enfermo.

La infección se vehiculiza en forma preponderante a través de las heces contaminadas, mediante la penetración de los bacilos por la mucosa, comprobándose la lesión granulomatosa en el intestino delgado, colon y recto.

La susceptibilidad a la infección se produce en los terneros de menos de 30 días, observándose la sintomatología clínica en animales de 2 a 5 años de edad, pudiéndose agravar el proceso por la mala nutrición, deficiencias minerales, parto estrés, parasitosis, etc.

Para el diagnóstico de la Paratuberculosis no es posible utilizar un solo método, dado los diferentes estadios de la noxa con animales clínicamente enfermos, subclínicamente infectados e infectados.

Por ello es importante conocer los mecanismos inmunológicos que ocurren en las enfermedades por micobacterias, ya que de allí se derivarán la aplicación de las diferentes técnicas.

La vía principal del proceso inmunitario es la inmunidad mediada por células con la intervención de macrófagos y liberación de los mediadores químicos llamados **citoquinas**, que producirán atrofia muscular, emaciación, alopecia, disturbios renales y leucopenia. Esta sintomatología ocurre en los primeros estadios de la enfermedad; con el transcurso del tiempo, deberá coexistir con la inmunidad humoral, liberación de inmunoglobulinas (IgG) y consecuentemente edema, lacrimación, rales y procesos diarreicos.

La mayoría de las pruebas serológicas y alérgicas utilizadas en otras enfermedades han sido ensayadas para el diagnóstico de Paratuberculosis. Durante el primer estadio de la infección algunas de estas pruebas detectan los animales con Paratuberculosis. Cuando el proceso tuberculoide se desarrolla, las pruebas de hipersensibilidad retardada ó de inmunidad mediada por células se vuelven positivas. Ciertos animales que llegan a esta situación, eliminan los bacilos y curan. Otros se ubican en un estadio intermedio, en el curso del cual las pruebas serológicas que detectan los anticuerpos circulantes se convierten en positivas.

Además, cuando se desarrolla la anergia, las pruebas de hipersensibilidad retardada ó de la inmunidad mediada por células se negativizan. Es el momento, en que las técnicas serológicas menos sensibles, tales como la Fijación del complemento ó la Inmunodifusión en el gel de agar se convierten en positivas, los animales habitualmente comienzan a eliminar bacilos por las heces y pueden ser detectados por el cultivo de materia fecal.

Los animales que han curado ó han sido expuestos a otros micro- organismos antigénicamente cercanos pueden reaccionar a las pruebas serológicas ó alérgicas, solamente los gravemente infectados que tienen posibilidad de curar, serán detectados por el cultivo de materia fecal. Estos podrían no mostrar síntomas clínicos de la enfermedad durante muchos años, pero eliminarían los bacilos exponiendo a los otros a la infección.

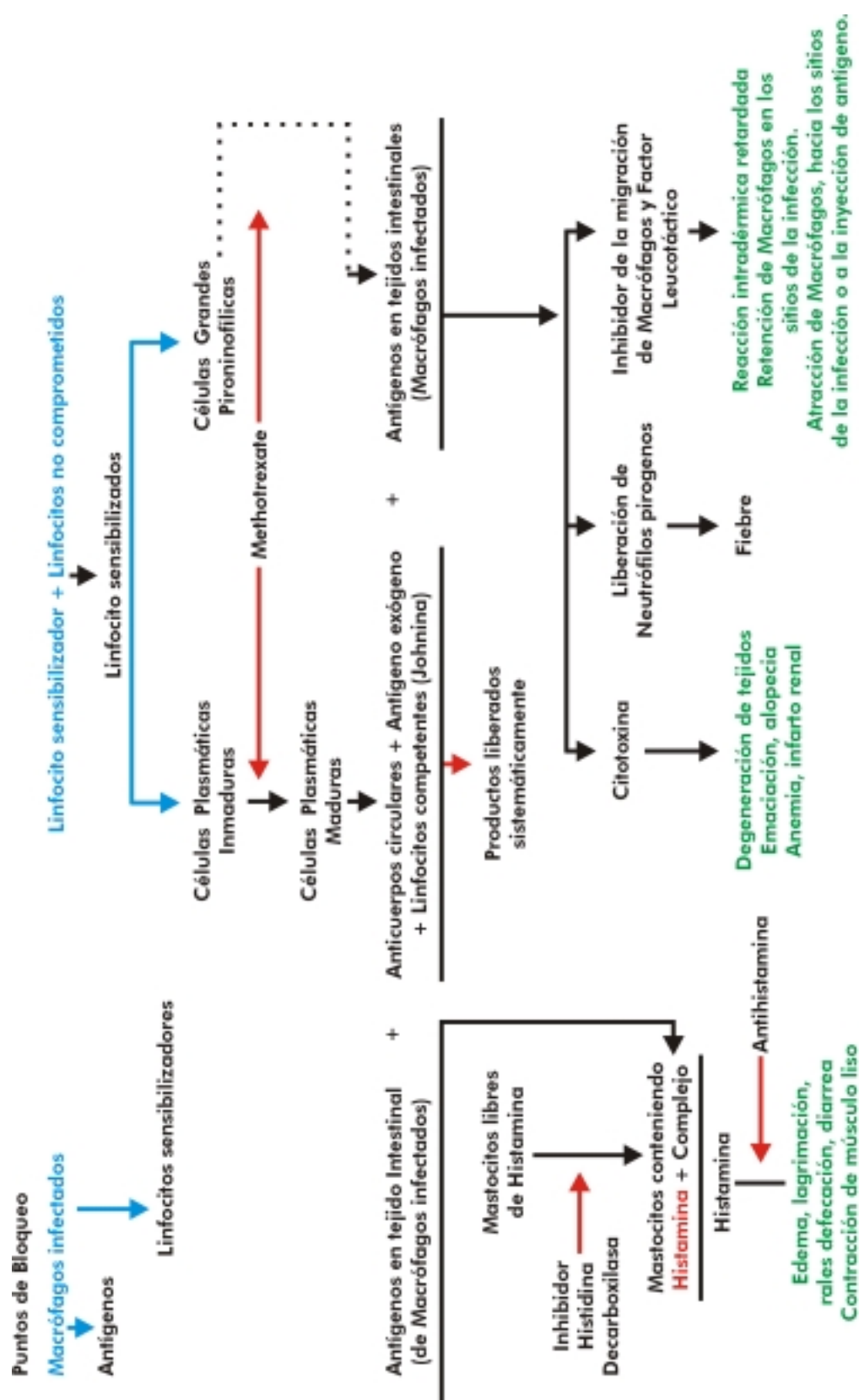
El test cutáneo como se utiliza en Tuberculosis pero usando sensitinas derivadas de *Mycobacterium avium* (Derivado Proteico Purificado: D.P.P. Aviar) ó *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Johnina) ha sido empleado para la estimación de los anticuerpos humorales. Un resultado negativo a este método no es decisivo.

El método diagnóstico asimismo varía según la especie animal que se estudia.

Se han intentado condensar en esta publicación algunos de los métodos utilizados en el diagnóstico de la Paratuberculosis. El impacto económico que produce esta enfermedad en los rodeos, ha movilizado el interés para el desarrollo de nuevas técnicas, ya que solamente el uso de un conjunto de ellas, puede garantizar un diagnóstico de certeza.

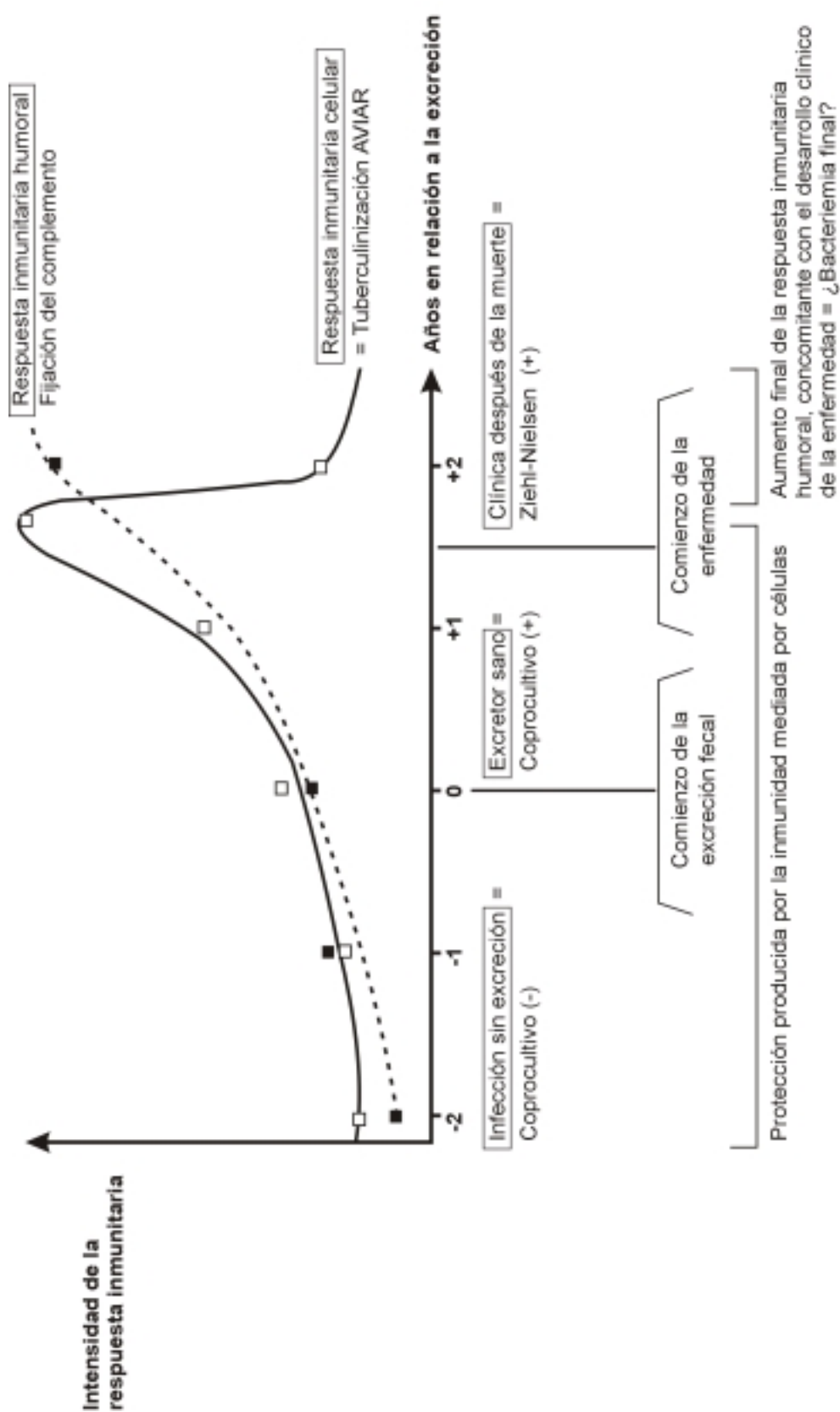
Los temas expuestos han sido tratados con mayor profundidad en la bibliografía descripta, por lo cual remitimos a la misma al lector.

Mecanismos inmunológicos en Paratuberculosis Bovina



Am. J. Vet. Res. Vol.31, N°3 March 1979

PARATUBERCULOSIS - EVOLUCION



R. Perard
Second Int. Colloq. on
Paratuberculosis (1985)

Legislación del SENASA

LEGISLACION DEL SENASA

Buenos Aires, 20 de Octubre de 1969
CIRCULAR Nº 84

Señor Inspector General
Señor Veterinario Local

Para su conocimiento y demás efectos transcribimos Decreto número 5561 del 19 de septiembre de 1969;

Visto el Expediente nº 116.762/69, en el cual la SECRETARIA DE ESTADO DE AGRICULTURA Y GANADERIA propicia la inclusión de la enfermedad de JOHNE o paratuberculosis bovina en la nomenclatura de enfermedades a que hace referencia el artículo 4º del Reglamento de Policía Sanitaria de los Animales, aprobado por el decreto de fecha 8 de noviembre de 1906, reglamentario de la Ley nº 3.959, y

CONSIDERANDO:

Que la enfermedad de JOHNE o paratuberculosis bovina es una enfermedad exótica no existente en nuestro país;

Que por su naturaleza infecto-contagiosa dicha enfermedad constituye un serio peligro para la sanidad animal siendo considerada como una de las enfermedades más graves que afectan actualmente a la industria mundial del ganado vacuno;

Por ello y dadas las facultades acordadas por el artículo 3º de la Ley nº 3.959 y lo propuesto por el Señor Secretario de Estado de Agricultura y Ganadería,

EL PRESIDENTE DE LA NACION ARGENTINA
DECRETA:

ARTICULO 1º.- Incorpórase al artículo 4º del Reglamento General de Policía Sanitaria de los Animales la enfermedad de JOHNE o paratuberculosis bovina.

ARTICULO 2º.- en el caso de aparición de la enfermedad de JOHNE o paratuberculosis bovina en el país, la SECRETARIA DE ESTADO DE AGRICULTURA Y GANADERIA por intermedio de sus organismos técnicos competentes y cuando razones sanitarias lo aconsejen podrá ordenar el sacrificio de animales, autorizándose al SERVICIO DE SANIDAD ANIMAL, para invertir por intermedio del SERVICIO DE LUCHAS SANITARIAS, SELSA, las sumas que resulten necesarias para el pago de las indemnizaciones a que den lugar el sacrificio de los animales, por el valor de los objetos o construcciones destruidas, como así también para liquidar y pagar las mismas, previo dictamen de la Comisión Técnica que al efecto designará, todo ello de acuerdo con las autorizaciones acordadas por el artículo 25º de la Ley nº 3.959 y el presente decreto.

A tales efectos el SERVICIO DE SANIDAD ANIMAL, por intermedio del SERVICIO DE LUCHAS SANITARIAS, SELSA, deberá incluir en los ordenamientos presupuestarios los créditos respectivos.

ARTICULO 3º.- El presente decreto será refrendado por el señor Ministro de Economía y Trabajo y firmado por el señor Secretario de Estado de Agricultura y Ganadería.

ARTICULO 4º.- Comuníquese, publíquese, dése a la Dirección Nacional del Registro Oficial y vuelva a la SECRETARIA DE ESTADO DE AGRICULTURA Y GANADERIA.

DECRETO Nº 5561

Fdo.: ONGANIA
José María Dagnino Pastore
Lorenzo A. Raggio

Saludamos a Ud muy atentamente.


Dr. Raymond R. Espinosa
Asistente de Campo

Materiales

MATERIALES

A – EQUIPOS:

- Estufa (37°C).-
- Heladera (+5°C).-
- Peachímetro “Beckman” Modelo 4500.-
- Bomba de vacío “Minymaspres” N° 4106.-
- Freezer (-70°C) “Cindy” H 15.-
- Autoclave.-
- Agitador magnético “Precytec” Modelo AG.-
- Balanza “Mettler” PN 1210.-
- Balanza “Mettler” H 71.-
- Centrífuga de mesa “Rolco” Modelo 2036.-
- Microscopio binocular “Nikon”.-
- Extractor de aire con filtro HEPA.-
- Horno Tipo Pasteur “Rosmar” Modelo OHRI N° 41777.-
- Estufa de cultivo de mesa “Ionomex” N° 00445.-

B – MATERIALES:

- Placas filtrantes esterilizantes EKS ó similar, diámetro 30 cm.-
- Tubos a rosca, diámetro 1,5 cm, largo 16 cm.-
- Frascos para diluciones por 1000 ml.-
- Frasco erlenmeyer por 250 ml.-
- Espátula metálica.-
- Asa metálica espiral.-
- Pipetas: 10 ml de un solo aforo.-
- Pipetas: 5 ml de un solo aforo.-
- Pipetas: 2 ml de un solo aforo.-
- Pipetas: 1 ml de un solo aforo.-
- Marcador indeleble.-

C – DROGAS Y MEDIOS:

- Aceite de inmersión p.a.
- Acido sulfúrico p.a.
- Acido clorhídrico
- Agar (Special Noble Difco 0142).
- Alcohol etílico 96° p.a.
- Azul de bromocresol p.a.
- Azul de metileno p.a.
- Bicromato de potasio p.a.

- Borato de sodio p.a.
- Carbonato de sodio anhidro p.a.
- Carbonato de sodio monohidratado p.a.
- Citrato de magnesio. 6H₂O p.a.
- Cloruro de calcio anhidro p.a.
- Cloruro de cobalto p.a.
- Cloruro de manganeso p.a.
- Cloruro de potasio p.a.
- Cloruro de sodio p.a.
- Dextrosa anhidra p.a.
- Extracto de carne vacuna (Difco 0126).
- Fenol p.a.
- Fosfato de potasio monobásico p.a.
- Fosfato dibásico anhidro p.a.
- Fosfato disódico dodecahidratado p.a.
- Fucsina básica p.a.
- Glicerina p.a.
- Hidróxido de potasio p.a.
- Hidróxido de sodio p.a.
- May Grünwald solución.
- Nitrato de sodio p.a.
- Peptona p.a.
- Peróxido de hidrógeno – 100 volúmenes.
- Púrpura de bromocresol p.a.
- Rojo fenol p.a.
- Sulfato de manganeso p.a.
- Verde de malaquita p.a.
- Micobactina
- Yemas de huevo

D – REACTIVOS Y SOLUCIONES:

- Solución de fenol al 5%.-
- Hidróxido de sodio al 4%,solución estéril.-
- Verde de malaquita al 2%,solución estéril.-
- Solución madre de azul de metileno ,en alcohol etílico.-
- Solución de azul de metileno al 1%.-

Muestreo

MUESTREO

En el animal vivo:

- Heces.-
- Suero sanguíneo.-
- Biopsia de mucosa rectal.-

En el animal muerto:

- Válvula íleocecal.-
- Ganglios mesentéricos.-
- Colon.-
- Recto.-

Recolección y envío al laboratorio

La toma de materia fecal se realiza utilizando un guante seco directamente del recto ,el guante se usa una sola vez. Colocar aproximadamente 15 gramos de materia fecal en un recipiente de boca ancha del doble de capacidad, identificar con un rótulo y enviar refrigerado rápidamente al laboratorio.No se agrega ningún conservador químico.

Técnica de Laboratorio

TECNICAS DE LABORATORIO

A - Diagnóstico clínico de la enfermedad:

A-1- Aislamiento del (Mptb) en heces, mediante cultivo.

A-2- Aislamiento del (Mptb) de material de necropsia mediante cultivo.

A-3- Histopatología, observación de las células y los bacilos (Coloración de Ziehl-Neelsen).

A-4- Biopsia de mucosa rectal.

B - Detección subclínica de la infección:

B-1-Aislamiento de Paratuberculosis en heces, mediante cultivo.

B-2-Histopatología, observación de células y bacilos (Coloración de Ziehl-Neelsen).

B-3-Detección de anticuerpos específicos mediante serología:

a-Inmunodifusión en gel de agar.

b-Fijación del Complemento.

c-Enzimoinmunoensayo.

B-4- Prueba tuberculínica intradérmica utilizando Johnina ó Tuberculina Aviar.

A - Diagnóstico clínico de la enfermedad

A-1 Aislamiento del *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Mptb) en heces, mediante cultivo.

Decontaminación:

Se transfiere con una espátula aproximadamente un gramo de heces, a un tubo de vidrio de 50 ml que contiene 40 ml de agua destilada estéril, se agita la mezcla durante 30 minutos a temperatura ambiente. Sedimentarán durante ese lapso las partículas más grandes. Trasladar 5 ml de la zona superior de la suspensión a un tubo de vidrio que contenga 35 ml de solución de Cloruro de Benzalconio al 0,3% ó Cloruro de Hexadecilpiridinio al 0,75%. Invertir el tubo varias veces y dejar a temperatura ambiente sin mover, durante 24 horas.

Inoculación:

Sembrar con una pipeta pasteur estéril, 0,1 ml del sedimento, sin mover el recipiente en cuatro tubos con medio de Herrold, tres con micobactina y uno sin micobactina.

Coloración:

Hacer un frotis con el sedimento y teñir por el método de Ziehl-Neelsen. La aparición de bacilos ácido-alcohol resistentes no indica la enfermedad ya que bacilos saprófitos de estas características pueden estar presentes en la materia fecal de los mamíferos infectados ó no. Sin embargo, el Mptb aparece en acúmulos en la coloración; esta formación es fácil de evaluar en un observador entrenado, por lo cual la identificación del bacilo por esta vía, deberá ser muy cuidadosa.

Método de coloración de Ziehl-Neelsen:

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

El examen microscópico del extendido se realiza con un microscopio equipado, con objetivo de inmersión (100X) y ocular 8X a 10X.

Se coloca una gota de aceite de cedro entre el portaobjetos y el objetivo, dejándola caer sobre el portaobjetos sin apoyar el gotero. De lo contrario se corre el riesgo de transportar bacilos suspendidos en el aceite de un preparado a otro. Al enfocar un preparado positivo los bacilos se observan como formas alargadas ó redondeadas en acúmulos, coloreadas en rojo brillante sobre un fondo azul.

La observación del extendido coloreado del material biológico investigado, se debe efectuar siempre de la misma manera. Por ejemplo, una vez enfocado el preparado se recorre de su extremo izquierdo al derecho, siguiendo una línea recta. La observación cuidadosa de cada campo demanda entre dos a cinco minutos.

Incubación:

Después de transcurrida una semana, se observan los tubos, si se detecta contaminación, se siembra nuevamente con el inóculo de reserva conservado a 15°C, en tubos con medio nuevo de Herrold con ó sin micobactina.

Si surge una nueva contaminación se repite la siembra, siempre utilizando el material decontaminado original.

El Cloruro de Benzalconio puede destruir con el tiempo las bacterias por acción lítica, pero ello es neutralizado en parte, por la presencia de los fosfolípidos, provenientes del huevo, que se encuentran en el medio de Herrold.

Los tubos se observan cada dos semanas durante catorce semanas.

Las colonias primarias en medio de Herrold son pequeñas, de aproximadamente 1 mm de diámetro, translúcidas, incoloras, hemisféricas y de superficie lisa y brillante.

Las colonias primarias de Mptb son ácido-alcohol resistentes, gram positivas y tienen un tamaño aproximado de 0,5 micrones de diámetro y 1,0 micrones de longitud, Generalmente aparecen en grupos, tanto si provienen de tejidos como de heces.

Las colonias primarias tiene una dependencia estricta a la micobactina, para su crecimiento. Se puede utilizar micobactina J proveniente de *Mycobacterium subsp. paratuberculosis* en lugar de micobactina

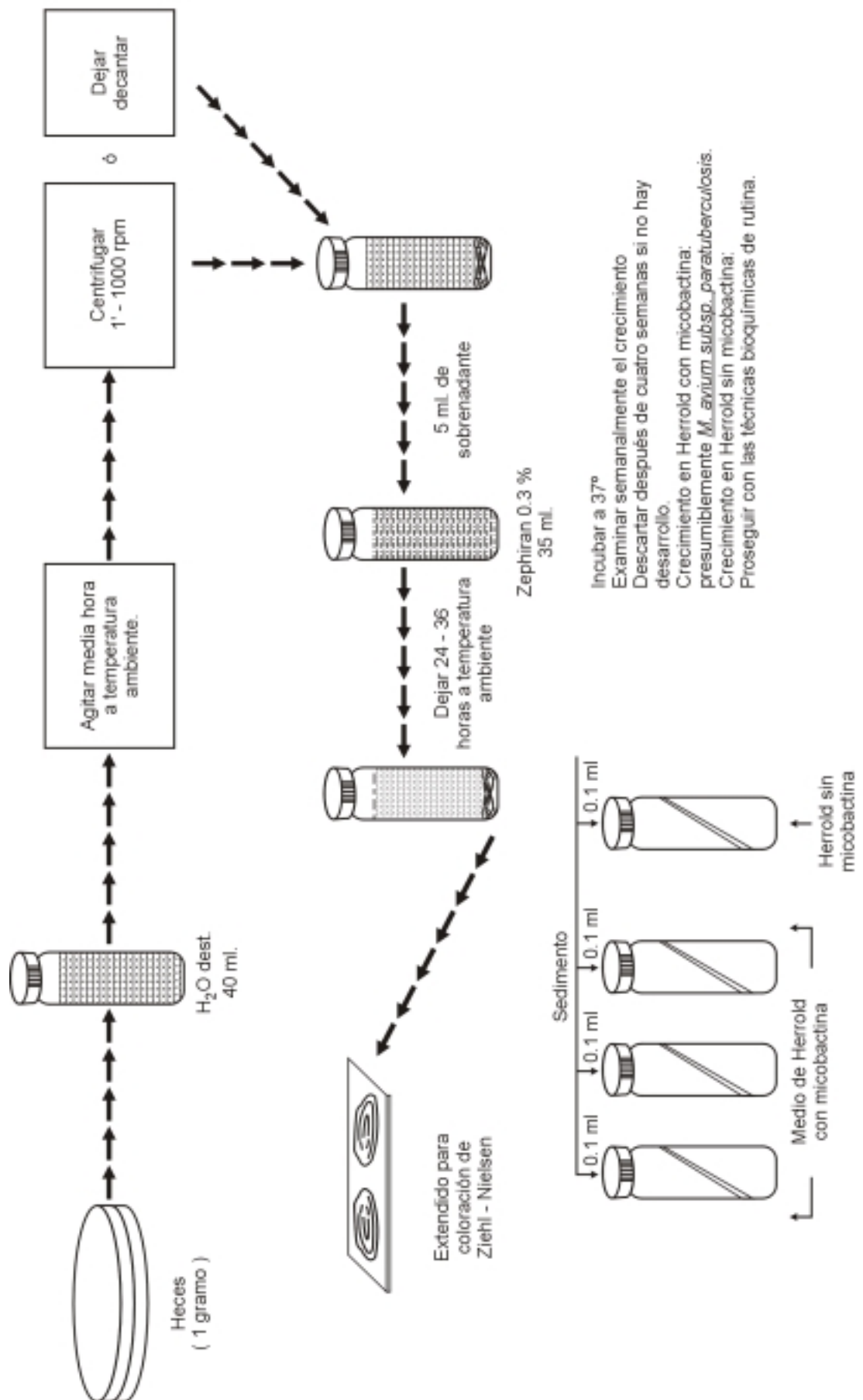
P (*Mycobacterium phlei*) para acelerar la velocidad de crecimiento en el medio de Herrold.

La dependencia en el primer aislamiento a la micobactina, ha sido considerada una característica taxonómica del Mptb. La micobactina es un complejo liposoluble que sirve de transporte dentro de la célula del hierro contenido en el medio, el que se realiza por compuestos hidrosolubles presentes en la pared celular llamados: exoquelinas, los que transportan el hierro férrico a la micobactina formando la "Ferrimicobactina", la que es reducida por las "Ferrimicobactina reductasas" que liberan el hierro dentro del citoplasma bacteriano.

Las pruebas bioquímicas habituales en la tipificación de micobacterias, así como la resistencia ó sensibilidad a determinados antibióticos, son poco efectivas a los fines de clasificar al bacilo. Esta identificación se hace por:

- Acido-alcohol-resistencia de las bacterias que forman la colonia sospechosa y su presentación en acúmulos.
- El tiempo de crecimiento superior al de otras micobacterias no tuberculosas (M.O.T.T.).
- Ausencia de cultivo en el tubo que no contiene micobactina.

Aislamiento de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en heces, mediante cultivo



Merkal, R. (Comunicación personal)

A-2 Aislamiento de *Mycobacterium subsp. paratuberculosis* de material de necropsia mediante cultivo

Colocar aproximadamente un gramo de tejido con 4 ml de Cloruro de Hexadecilpiridinio al 0,75% en un equipo para disrupción, después de producida la disgregación, aspirar la suspensión sobrenadante con la pipeta y transferir a un tubo esterilizado que contenga alcohol al 70%, la muestra es decontaminada durante toda la noche, al día siguiente, transferir 2 ó 3 gotas del sedimento en tubos conteniendo medio de Herrold con y sin micobactina y proseguir en la observación de los cultivos y clasificación como en el aislamiento de Mptb en heces.

A-3 Histopatología:

Las muestras se fijan en formol al 10% y se realiza la inclusión en parafina, se hacen cortes en micrótopo, con un espesor de 4 micras y se colorean con Hematoxilina-Eosina y Ziehl-Neelsen.

A la observación microscópica se puede ver un infiltrado de células epitelioides en el corion de la mucosa y de la submucosa, deformación de las vellosidades con engrosamiento de la mucosa, comprimiendo las criptas de Lieberkühn.

En los cortes coloreados con Ziehl-Neelsen se visualizan gran cantidad de células epitelioides que contienen dentro de cada una de ellas, bacilos ácido-alcohol resistente, principalmente en el corion de la mucosa y en los ganglios mesentéricos.

A-4 Biopsia de mucosa rectal:

Es uno de los métodos más sencillos de realizar, se produce el raspaje de la última porción del intestino, mediante un elemento cortante, y el tejido obtenido se coloca sobre un portaobjetos y se fija a la llama, enfriar y colorear mediante el método de Ziehl-Neelsen, se observan al microscopio, los bacilos ácido-alcohol resistente de aproximadamente 1,5 x 0,5 micrones, se ven en acúmulos ó bien dentro de los macrófagos; asimismo la aparición de uno ó varios bacilos apareados podría deberse a micobacterias saprófitas (*Mycobacterium phlei*) de la superficie del intestino. Algunas especies de hongos son ácido-alcohol resistente y se encuentran en el aislamiento bacteriológico y podrían presentarse en la tinción.

Solamente el tamaño, la distribución y la morfología de los bacilos, pueden por lo tanto asegurar el diagnóstico.

B-Detección subclínica de la infección

B-3 Determinación de anticuerpos específicos mediante serología

a)Inmunodifusión en gel de agar:

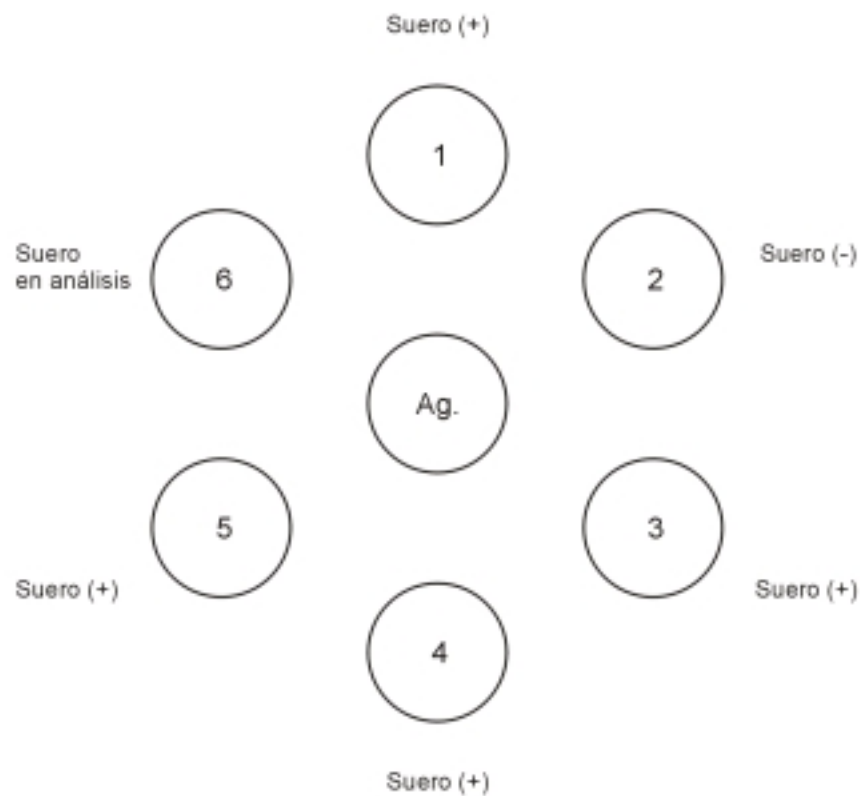
Se trabajó con una modificación del método original de R.S. Merkál.

Se utilizan placas de Petri de vidrio de 6 cm de diámetro en las que se colocan 3 ml de una suspensión al 1% de Agar Noble Difco ó Bacto Agar en buffer de borato de sodio. Se deja solidificar el agar y se corta el gel con un accesorio que permite la distribución de seis orificios externos y uno central.

El antígeno fué elaborado en la DILACOT-SENASA ,según método de Merkál (Comunicación personal).

Asimismo se ha utilizado el producido por Allied Monitor , Inc.(Fayette Missouri,USA)

Inmunodifusión en gel de agar



1, 3, 4 y 5 : Suero positivo estándar

2 : Suero negativo estándar

6 : Suero en análisis












Ag : Antígeno soluble de extracto protoplasmático de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

Se observa una línea de precipitación definida a las 48 horas en los sueros positivos.

FIJACION DEL COMPLEMENTO

TITULACION DEL ANTIGENO.

- Para titular el antígeno se hacen diluciones seriadas de un suero inmune específico contra diluciones seriadas del antígeno.
- El suero se inactiva a 62°C, 30' y se agita a los 15'.

		Controles			
Prueba		Antígeno	Complemento	Glóbulos Rojos	
Suero 0.2 ml 					
Control Suero 0.2 ml 					
Antígeno 0.2 ml A todos los tubos de la prueba					
Buffer ml a los controles  0.2 ml 0.2 ml 0.2 ml Controles suero Agitar - Dejar a temperatura ambiente 30'		 0.2 ml 0.3 ml	 0.4 ml 0.6 ml 0.7 ml	 0.8 ml	
50° H₅₀ 0.4 ml A todos los tubos de la prueba y los controles del suero					
50° H₅₀ A los diferentes ≠ controles Agitar. Dejar a 4°C entre 15 y 18 horas		 0.2 ml 0.1 ml	 0.2 ml 0.1 ml		
Glóbulos rojos sensibilizados 0.2 ml } A todos los tubos de la prueba y de los controles obteniendo un volumen final de 1 ml. Agitar a baño maría 37°C - 30' - Agitar a los 15'					

Centrifugar durante 15' todos los tubos que no muestren hemólisis total. Leer la densidad óptica por espectrómetro o por comparación con patrones de hemólisis.

La dilución óptima es aquella que produce lecturas del nivel máximo de fijación con el antisuero. Se unen los puntos finales del 30 % de hemólisis.

FIJACION DEL COMPLEMENTO

[illegible]

b) Fijación del Complemento:

1- **Se debe diluir el suero 1/8 en solución de buffer veronal e inactivar a 62°C**, durante 30 minutos.

Se realizan diluciones seriadas del suero inicial en razón 2 hasta completar 6 diluciones: 1/128.

Se colocan 0,2 ml de suero negativo como control.

2- **Se agrega 0,2 ml del Antígeno a los tubos de la prueba y a los controles del Antígeno.**

Para compensar los volúmenes se agregan 0,2 ml de buffer frío a todos los controles (suero y antígeno).

3- **El complemento debe ser diluido en buffer frío, el cual fue previamente titulado** según técnica del INPPAZ que contenga 5 C' H₅₀ en 0,4 ml.

Se debe mezclar suavemente sin producir espuma.

Se agregan 0,4 ml de complemento a los tubos de la prueba y a los controles 5 C' H₅₀ y 0,2 ml a los controles de 2,5 unidades. A los controles de 1,25 unidades agregar 0,1 ml, debe llevarse a volumen a todos los controles, es decir, que éste será igual a 0,8 ml.

Al tubo control de los glóbulos rojos se le agrega 0,8 ml de buffer.

4- **A todos los tubos se le agregan 0,2 ml de glóbulos rojos. Al retirar las gradillas** del baño maría se las deben sumergir en agua helada y centrifugar todos los tubos.

5- **Si los controles son satisfactorios se proceden a leer los tubos de la prueba** comparándolos con la escala de color, caso contrario si el control del suero muestra una hemólisis menor del 75% se lo informa como anticomplementario.

Lectura de la reacción

Porcentaje de la hemólisis	Interpretación
0% - 50%	+
51% - 90%	+ / -
91% - 100%	-

Interpretación de los títulos

1/8	-
1/16	Sospechoso
1/32	+

Resultado:

El título del suero es la recíproca de la dilución más alta que contiene antígeno y en la cual el 50% de los glóbulos rojos están hemolizados.

El 50% ó más de hemólisis es interpretado como negativo.

c) Enzimoimmunoensayo:

El método de ELISA es al presente, uno de los más sensibles y específicos para detectar en el suero los anticuerpos del Mptb.

La seroconversión se observa con esta técnica entre los 6 a 9 meses de la eliminación de los bacilos detectables por cultivo. La especificidad del ELISA se puede incrementar mediante la absorción de los sueros con polvo de *Mycobacterium phlei* ó con el uso de antígenos de Mptb. más específicos.

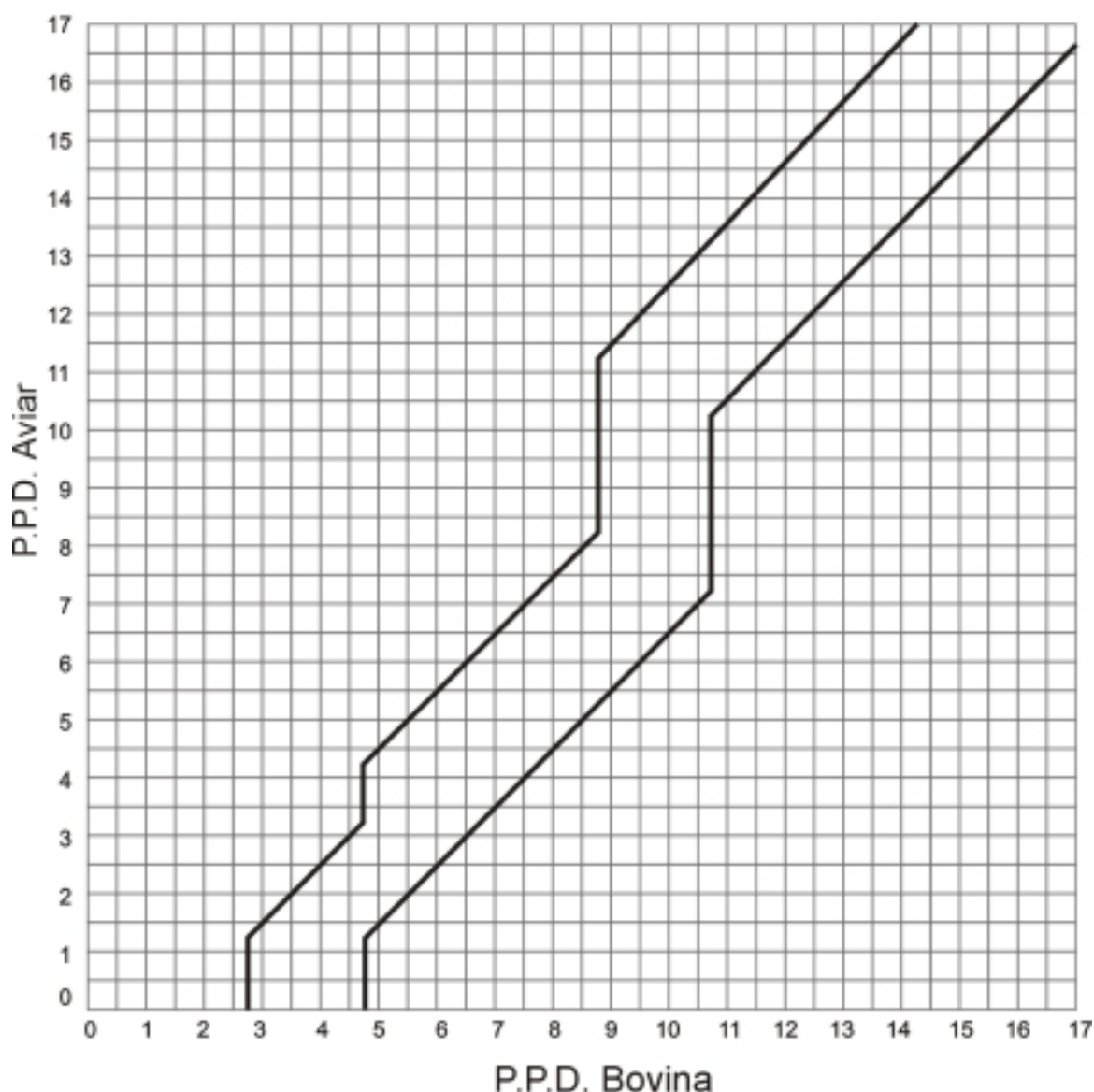
El método ELISA no es utilizado como diagnóstico oficial en la República Argentina, debido a que se comprobó por trabajos previos, que la incidencia de la prevalencia en tuberculosis bovina disminuye la sensibilidad y la especificidad de la técnica (11).

B-4 Prueba tuberculínica intradérmica utilizando Johnina ó Tuberculina Aviar

La técnica es realizada por inoculación de 0,1 ml de Tuberculina D.P.P. (Derivado Proteico Purificado) Aviar (0,5 mg/ml, 25.000 U.I.) ó Johnina (0,5 mg/ml) en el tercio medio del cuello del bovino. El espesor de la piel es determinado previamente con un calibre, repitiéndose la lectura a las 72 horas posteriores a la inyección.

Un incremento mayor de 3 mm es considerado positivo. La prueba tiene valor limitado, su utilización en un rodeo indica la sensibilización de los animales a Mptb.ó al complejo *Mycobacterium avium* y por ello deberá ser utilizado solamente como un test preliminar a la iniciación de un programa de control.

Diagrama de Puntos



5 CRITERIOS DE INTERPRETACION

Diagnóstico bacteriológico:

En comparación, el diagnóstico bacteriológico a partir de las heces y de material de necropsia tiene una sensibilidad superior a la de los métodos serológicos, constituyendo el solamente el diagnóstico de certeza y de presentar la ventaja de no producir ningún error por exceso.

Histopatología:

La técnica posee menor sensibilidad para reconocer la enfermedad en los animales subclínicamente infectados, pero la presentación característica en acúmulos del Mptb y el estudio de las células del sistema digestivo incrementan la sensibilidad del método.

Biopsia de mucosa rectal:

Es otro método diagnóstico que debido a la facilidad de su realización se usa rutinariamente, aunque solamente el 25% de los animales infectados dan reacción positiva.

Inmunodifusión en gel de agar:

De acuerdo con los diferentes autores se indican distintos valores referentes a la sensibilidad del método, según Rodrick y Chiodini (7), sería de 55% para los animales verdaderamente positivos, 45% para los falsos negativos, 44% para los falsos positivos y 56% para los verdaderamente negativos.

Fijación del Complemento:

El mismo autor indica 64% para los animales verdaderamente positivos, 36% para los falsos negativos, 55% para los falsos positivos y 45% para los verdaderamente negativos.

Enzimoimmunoensayo:

La sensibilidad de la técnica es comparable en los casos clínicos, con el método de Fijación del Complemento pero la misma se incrementa, cuando se relaciona, a éste último método, en la determinación serológica de los subclínicamente infectados (13).

Prueba tuberculínica intradérmica:

Según Rodrick y Chiodini, R. (7) se determinarán 64% de animales verdaderamente positivos, 46% de falsos negativos, 21% de falsos positivos y 79% de verdaderamente negativos.

Observaciones:

La elección de los métodos depende del grado de sensibilidad requerida a nivel individual ó de rodeo, y las cifras correspondientes a los criterios de interpretación varían según los diferentes autores, por lo tanto los valores presentados no son excluyentes de otros según las distintas fuentes consultadas.

Dichos valores, asimismo, varían según se refiera a bovinos, ovinos, caprinos, etc.

ANEXO

Medios de cultivo

MEDIOS DE CULTIVO

Aislamiento de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

Medio de Herrold:

Peptona.	9,0 g
Cloruro de sodio.	4,5 g
Agar.	15,3 g
Extracto de carne vacuna.	2,7 g
Glicerina.	27,0 ml
Agua destilada.	870,0 ml
Yemas de huevo *.	6
Solución estéril de Verde de Malaquita (forma oxálica) al 2% en agua.	5,0 ml

**Se preparan asépticamente usando huevos frescos. Estos deben provenir de gallinas cuyas dietas no han contenido antibióticos.*

Equipo:

Preparar y esterilizar:

- Un frasco fraccionador de 2 litros, con tapón de algodón y provisto de caño de goma y campana de vidrio para distribuir y de ser posible una barra magnética dentro del frasco, para mezclar.
- Tubos de vidrio esterilizados, preferiblemente con tapa a rosca, en cantidad suficiente.
- Pinzas de borde dentado.

Método de preparación:

Mezcle y caliente todos los ingredientes (menos las yemas y la solución colorante) hasta que se disuelva el agar, en un matraz de 2 litros. Enfrie a 60°C y ajuste el pH a 7,5 con hidróxido de sodio 1N. Mezcle por agitación. Esterilice en el autoclave durante 25 minutos a 121°C. Enfrie a 56°C y agregue las 6 yemas en forma estéril, de la siguiente manera: Lave los huevos con agua tibia y detergente y enjuáguelos con agua corriente. Déjelos secar, sumérjalos en alcohol etílico 70° durante 15 minutos. Séquelos entre toallas estériles. Quiebre cada huevo por un extremo con una pinza estéril, haga una perforación de 10 mm y saque la clara con la pinza y con la ayuda de la gravedad. Haga una perforación mayor y rompa la yema. Con la misma pinza mezcle la yema, girando y quite el saco vitelino, vacíe la yema en el medio estéril del frasco fraccionador. Repita el proceso para cada huevo. Mezcle el medio suavemente en la agitadora magnética. Agregue la solución de Verde de Malaquita con una pipeta estéril. Mezcle otra vez. Distribuya asépticamente en los tubos. Deje que el medio se solidifique en ellos en posición inclinada. Compruebe la esterilidad incubando durante 48 hs. a 37°C.

Medio de Herrold con Micobactina

Peptona	9,0 g
Cloruro de sodio	4,5 g
Agar	15,3 g
Extracto de carne vacuna	2,7 g
Glicerina.	27,0 g
Agua destilada.	870,0 g
Hidróxido de sodio al 4%	4,1 ml aprox.
Micobactina.	2 mg
Solución estéril de Verde de Malaquita forma oxálica al 2% en agua	5,1 ml

Preparación de la micobactina:

La micobactina se distribuye en la cantidad de 2 mg. La misma es suficiente para preparar 1 litro de medio de Herrold y se debe disolver en 4 ml de alcohol etílico.

Preparación de los huevos:

En la misma forma ya descripta para la preparación del medio de Herrold.

Realización del medio de cultivo:

Se prepara la solución compuesta por todos los ingredientes, salvo las yemas y la solución colorante, tal como se describió para el medio de Herrold. Se mezclan por agitación y se añade la micobactina con la pipeta, dejándola caer directamente en el centro para que no toque la superficie interior del frasco. Coloque en el autoclave 20 minutos a 121°C. Enfrie a 56°C y añada asépticamente las 6 yemas estériles (véase preparación anterior) y 5,1 ml de solución de Verde de Malaquita al 2% estéril. Mezcle nuevamente todo en el frasco fraccionador y distribuya asépticamente en tubos. Deje solidificar en posición inclinada. Compruebe la esterilidad incubando el medio a 37°C durante 48 hs.

Método de coloración de Ziehl-Neelsen

METODO DE COLORACION DE ZIEHL- NEELSEN

Fucsina, solución madre:

Fucsina básica.	10 g
Alcohol 96°.	100 ml

Disolver por tratamiento en un mortero, 10 ml de la solución madre, agregar 5,5 ml de fenol acuoso. (Calentar a baño María 100 g de fenol cristalizado con 10 ml de agua destilada, hasta disolución, dejar enfriar).

Agitar y agregar agua destilada hasta completar 100 ml, dejar reposar 24 hs. y filtrar.

Azul de Metileno, solución madre:

Azul de Metileno.	1 g
Alcohol 96°.	100 ml

Disolver mediante agitación.

Solución de Azul de Metileno al 1%:

Azul de Metileno, Solución madre de.	10 ml
Agua destilada.	90 ml

Dejar reposar 24 hs. y filtrar un papel.

Solución decolorante:

Acido clorhídrico p.a.	3 ml
Alcohol 96°.	97 ml

Histopatología

HISTOPATOLOGIA

Coloración de Hematoxilina-eosina

Hematoxilina de Erlich:

Hematoxilina.	4 g
Alcohol.	200 ml
Agua destilada.	200 ml
Glicerina.	200 ml
Alumbre de potasio.	6 g
Acido acético glacial.	20 ml

Disolver la hematoxilina en el alcohol, agregar los demás componentes. Dejar dos semanas a temperatura ambiente, expuesto a la luz solar. Filtrar antes de usar.

Eosina

Solución stock acuosa

Eosina soluble en agua.	10 g
Agua destilada.	1000 ml
Acido acético glacial.	2 ml

Solución de trabajo

Solución stock acuosa de eosina al 1%.	66 ml
Alcohol 80°.	132 ml

Método

Colorear durante dos minutos con la solución de Hematoxilina, lavar con agua corriente, dejar un minuto con la solución de Eosina y lavar con agua destilada.

Inmunodifusión en Gel de Agar

INMUNODIFUSION EN GEL DE AGAR

Solución buffer stock

Acido bórico.	45 g
Hidróxido de sodio.	2 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

Solución buffer de trabajo

Diluir 200 ml de la solución anterior con 800 ml de agua destilada.

Preparación del agar

Disolver a baño maría un gramo de Agar Noble Difco ó Bacto Agar en 100 ml de solución buffer de trabajo, entibiar, agregar merthiolate sódico (1:10.000) y envasar en tubos a rosca previamente esterilizados, conservar en la heladera.

En el momento de usar, fundir el agar, calentando los tubos en baño de maría.

Elaboración del Antígeno

Se realiza la ruptura de las células de Mptb, por pasaje en una prensa hidráulica fraccionadora de células. Centrifugar a 40.000 x g, durante dos horas para eliminar las paredes celulares, el sobrenadante se liofiliza y se resuspende en agua en una concentración de 10 mg/ml.

Fijación del complemento

FIJACION DEL COMPLEMENTO

Reactivos e Instrumental:

- Solución de veronal sódico: pH 7,3-7,4.
- Glóbulos rojos sensibilizados de carneros al 2,8%.
- Hemolisina de conejo.
- Antígeno producido en la DILAB-SENASA – Titulación.
- Complemento obtenido del suero de cobayos – Titulación.
- Suero positivo (control).
- Suero negativo (control).
- Suero problema el cual no debe presentar contaminación ó hemólisis.
- Espectrofotómetro, se trabaja con una densidad óptica de 540 nanometros.

Reactivos:

1 - Solución salina tope con veronal sódico:

Cloruro de sodio. 83 g

5-5 dietil barbiturato sódico p.a. 10,19 g

Acido clorhídrico p.a. 1N. 34,58 g

Solución concentrada de Calcio y Magnesio. 5 ml

H₂O destilada c.s.p. 2000 ml

Preparación:

- En un matraz aforado de 2000 ml, disolver el Cloruro de sodio y el 5-5 dietil barbituratosódico, en 500 ml de agua destilada.
- Agregar el ácido clorhídrico.
- Agregar 5 ml de la solución concentrada de Calcio y Magnesio:

Cloruro de calcio . 2H₂O, p.a. 4,4 g

Cloruro de Magnesio . 6H₂O, p.a. 20,3 g

Agua destilada. 100 ml

- Completar el volumen hasta 2000 ml con agua destilada y mezclar.

Dilución de uso: 1:5 en agua destilada.

El pH debe estar entre 7,3 y 7,4 después de diluída, caso contrario repetir la operación. Se descarta transcurridas las 24 hs.

2 -Suspensión de glóbulos rojos de carnero:

Preparación:

La sangre de oveja colectada en solución Alsever debe estar como mínimo 5 días a 4°C, se filtra a través de una gasa a un tubo de centrifuga graduado.

Se centrifuga a 2000 r.p.m. durante 5 minutos. Se descarta el sobrenadante por succión tratando de arrastrar los leucocitos que forman una capa amarillenta. Se resuspenden los glóbulos rojos en una solución salina tope 1:5 y se realizan tres lavados, en el cuarto lavado se deja 10 minutos. Si el sobrenadante se presenta turbio, los glóbulos rojos se descartan.

Estandarización: De los glóbulos rojos al 2,8%.

Se conecta el espectrofotómetro para su adecuado calentamiento.

A un paquete celular de glóbulos rojos de 1 ml se lo suspende en 35 ml de solución buffer. Agitar cuidadosamente para obtener una suspensión homogénea. En una cubeta se colocan 0,2 ml de esta suspensión y se agregan 2,8 ml de agua destilada. Una vez lisados, se leen las densidades ópticas contra un blanco de agua destilada.

Cada laboratorio deberá determinar la densidad óptica para cada instrumento.

La longitud de onda a utilizar es de 540 nm, la suspensión obtenida deberá contener 7×10^8 hematíes/ml (equivalente a la suspensión al 2,8%).

Para calcular el volumen final deseado se usa la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen final} = \frac{\text{D.O. inicial} \times \text{Volumen inicial}}{\text{D.O. final}}$$

D.O.: Densidad óptica.

3 - Hemolisina:

La hemolisina es una mezcla de anticuerpos de alto (1.000.000) y bajo (165.000) peso molecular. Se obtiene inmunizando conejos con hematíes de oveja lavados ó con estroma de hematíes de oveja.

Para la titulación se prefiere el método de la meseta y se realiza cada vez que se usa un nuevo lote de hemolisina, 1/100 ó un nuevo lote de células de oveja.

4 - Sensibilización de glóbulos rojos:

Para la titulación del complemento, antígeno y para la prueba diagnóstica:

A un volumen de glóbulos rojos al 2,8% se agrega un volumen de la dilución óptima de hemolisina agitando en torbellino. Se deja incubar 15 minutos a 25°C.

5 - Titulación del antígeno:

Preparación de las diluciones de hemolisina.

1 ml de Dilución de hemolisina		Diluyente		Dilución final
1:100	+	9,0 ml	=	1:1000
1:1000	+	1,0 ml	=	1:2000
1:1000	+	1,5 ml	=	1:2500
1:1000	+	2,0 ml	=	1:3000
1:1000	+	3,0 ml	=	1:4000
1:1000	+	4,0 ml	=	1:5000

Se mezcla 1 ml de cada dilución de hemolisina y 1 ml de glóbulos rojos normalizados. Dejar reposar 30 minutos a 25°C a partir de ese momento son células sensibilizadas.

Preparar una dilución de C' 1:400.

Según el número de diluciones de hemolisina se preparan por duplicado tubos en los que se colocan: 1,2 ml de buffer frío y 1,2 ml de C' 1:400.

Se agrega 0,6 ml de glóbulos rojos sensibilizados a los tubos que contienen C' y solución buffer.

Incubar a baño maría 30 minutos, agitar a los 15 minutos.

Sumergir la gradilla en agua fría y centrifugar.

Leer la Densidad Optica (D.O.) por duplicado.

Calcular el porcentaje de hemólisis:

$$\frac{\text{D.O. de cualquier lisado} \times 100}{\text{D.O. en tubos con hemólisis completa}}$$

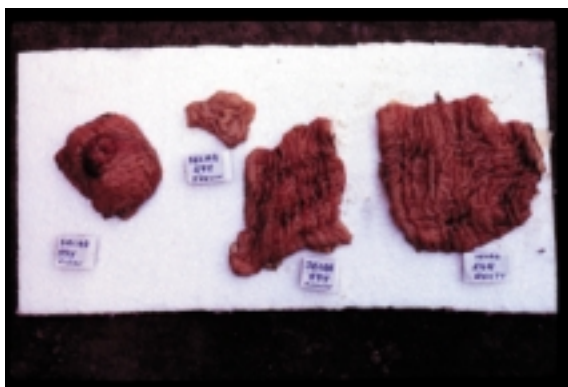
Se grafica en un papel logarítmico milimetrado el porcentaje de hemólisis y las diluciones de la hemolisina.

La dilución óptima es aquella donde no aumenta apreciablemente la hemólisis. Se determina la meseta y la dilución óptima es la segunda dilución de la misma.

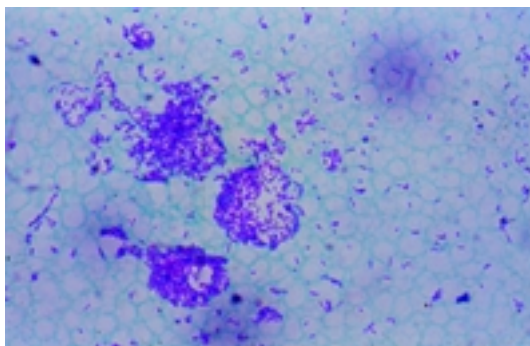
6 - Titulación del complemento:

Se debe titularlo cada vez que se realiza la prueba en la cual se usan cinco unidades. Una vez diluído para su uso se dejará 20 minutos en la heladera y podrá usarse hasta transcurridas 2 horas, luego se descarta.

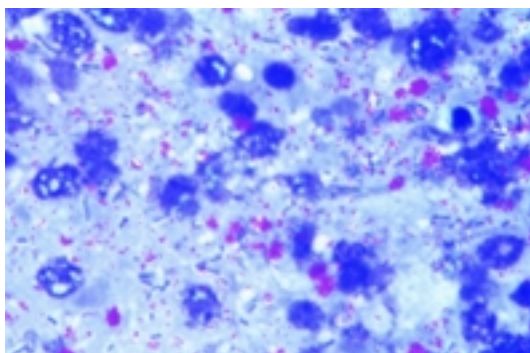
Documentación fotográfica



Material de necropsia : íleon ,recto y ciego



Coloración de Ziehl-Neelsen : presentación en acúmulos



Biopsia de mucosa rectal : Bacilos en acúmulos (coloración de Ziehl-Neelsen)

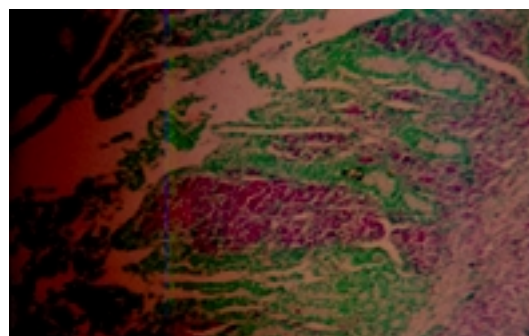


Cultivo de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* , cepa III V

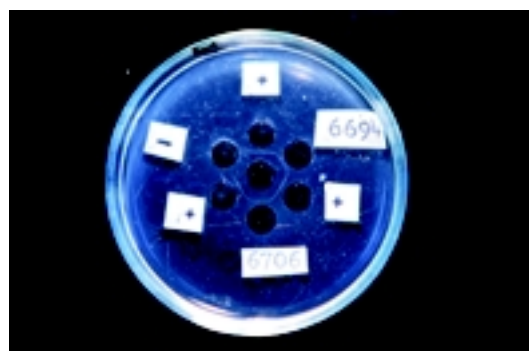
Tubo 1 : Medio Watson Reid

Tubo 2 : Medio Löwestein-Jensen

Tubo 3 : Medio de Stonebrink

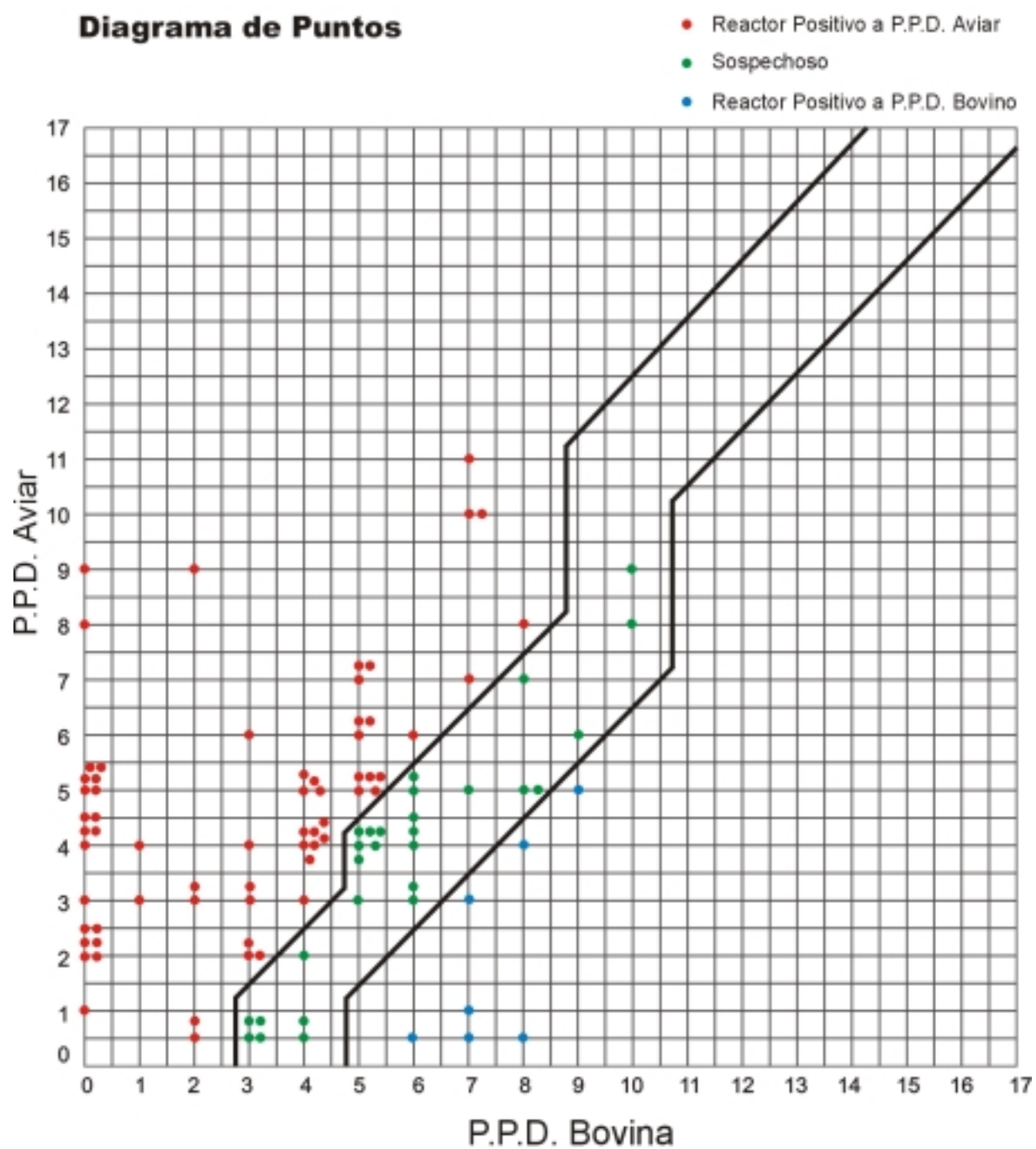


Histopatología : células epiteliodes con gran cantidad de bacilos en su interior (coloración de Ziehl-Neelsen)



Inmunodifusión en Gel de Agar 6694 y 6706 : líneas de precipitación de sueros de bovinos reaccionantes positivos

Diagrama de Puntos



BIBLIOGRAFIA

- Balzer SE, Lamb C, Collins MT : Diagnostic sensitivity and specificity of the gamma interferon test for bovine paratuberculosis (Abstract).Abstracts of papers presented at the Annual Conference of Research Workers in Animal Diseases 98 : 1984
- Bech-Nielsen S, Jorgensen JB,Ahrens P, et al: Diagnostic accuracy of a *Mycobacterium phlei*-absorbed serum enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of bovine paratuberculosis in dairy cows.J Clin Microbiol 30:613-618,1992
- Benedictus G,Haagsma J: The efficacy of mesenteric lymph node biopsy in the eradication of paratuberculosis from an infected farm.Vet Q 8:5-11,1986
- Billman-Jacobe H, Carrigan M,Cockram F, et al: A comparison of the interferon- gamma assay with the absorbed ELISA for the diagnosis of Johne's disease in cattle..Aust Vet J 69:25-28,1992
- Braum PK,Buergelt CD, Littel RC, et al: Use of an enzyme -linked immunosorbent assay to estimate prevalence of paratuberculosis in cattle of Florida..J Am Vet Med Assoc 196:1251-1254,1990
- Burnside DM, Rowly BO: Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay diagnosis of paratuberculosis in goats..Am J Vet Res 55:465-466,1994C
- Colgrove CS, Thoen CO, Blackburn BO, et al: Paratuberculosis in cattle: A comparison of three serologic tests with results of fecal culture.Vet Microbiol 19:183-187,1989
- Collins MT:Clinical approach to control of bovine paratuberculosis. J Am Vet Med Assoc 204:208-210,1994
- Collins MT, Sockett DC, Goodger WJ , et al: Herd prevalence,geographic distribution of, and risk factors for, bovine paratuberculosis in Wisconsin.J Am Vet Med Assoc 204:636-641,1994
- Cox JC, Drane DP, Jones SL et al: Development and evaluation of a rapid absorbed enzyme immunoassay test for the diagnosis of Johne's disease in cattle.Aust Vet J 68:157-160,1991
- de Lisle GW, Samagh BS, Duncan JR: Bovine paratuberculosis,II: A comparison of fecal culture and the antibody response.Can J Comp Med 44:183-191,1980
- de Lisle GW, Seguin P, Samagh BS, et al: Bovine paratuberculosis, I: A herd study using complement fixation and intradermal tests. Can J Comp Med 44:177-182,1980
- Lambreth RS, Collins MT: Inability to detect mycobactin in *Mycobacteria*-infected tissues suggests an alternative iron acquisition mechanism by *Mycobacteria* in vivo.Microb Pathog 14:229-238,1993
- Merkai RS, Whipple DL, Sacks JM, et al: Prevalence of *Mycobacterium paratuberculosis* in ileocecal lymph nodes of cattle culled in the United States.J Am Vet Med Assoc 190:676-680,1987
- Milner AR, Mack WN, Coates KJ ,et al: The sensitivity and specificity of a modified ELISA for the diagnosis of Johne's disease from a field trial in cattle.Vet Microbiol 25:193-198,1990
- Ridge SE, Morgan IR, Sockett DC, et al: Comparison of the Johne's disease in cattle.Aust Vet J 68:253-257,1991
- Rothel JS, Jones SL, Corner LA, et al: A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon - gamma and its use for the detection of tuberculosis in cattle.Aust Vet J 67:134-137,1990
- Seitz SE, Heider LE, Hueston WD, et al:Bovine fetal infection with *Mycobacterium paratuberculosis* . J Am Vet Med Assoc 194:1423-1426,1989
- Sherman DM, Bray B, Gay JM, et al: Evaluation of the agar gel immunodiffusion test for the diagnosis of subclinical paratuberculosis. Am J Vet Res 50:525-530,1989
- Sherman DM, Markham RJF, Bates F: Agar gel immunodiffusion test for diagnosis of clinical paratuberculosis in cattle.J Am Vet Med Assoc 185:179-182,1984
- Sockett DC, Conrad TA, Thomas CB, et al: Evaluation of four serological tests for bovine paratuberculosis.J Clin Microbiol 30:1134-1139,1992

- Sockett DC, Heisey DM, Collins MT: Estimating prevalence from results of a screening test when sensitivity is a function of prevalence. *In* Chiodini RJ, Collins MT, Bassey EOE (eds): Proceedings of the Fourth International Colloquium on Paratuberculosis, Rehoboth, MA, International Association for Paratuberculosis, 1995, pp.3-8
- Streeter RN, Hoffsis GF, Bech-Nielsen S, et al: Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows. Am J Vet Res 56:1322-1324,1995
- Sweeney RW, Whitlock RH, Buckley CL, et al: Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle. J Vet Diag Invest 7:488-493,1995
- Whipple DL, Callihan DR, Jaarnagin JL: Cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal specimens and suggested standardized procedure. J Vet Diag Invest 3:368-373,1991
- Wood PR, Corner LA, Rothel JS, et al: Field comparison of the interferon-gamma assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. Aust Vet J 68:286-290,1991
- Yokomizo Y: Evaluation on an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using *Mycobacterium phlei*-absorbed serum for the diagnosis of bovine paratuberculosis in a field study. Jpn Ag Res Quarterly 20:60-67,1986