



escaso número y sin estar asociadas a ninguna estructura determinada, apareciendo con una media de unas dos partículas por campo a 20.000 aumentos, lo que nos hace pensar que la técnica empleada (inclusión con resina epoxi) ha enmascarado los antígenos diana.

Apoptosis en la RHD

La apoptosis es una muerte celular programada, que está caracterizada por una serie de cambios morfológicos: condensación de la cromatina, vesiculización flácida del plasma de la membrana, fragmentación del ADN y picnosis. La apoptosis es un mecanismo genético y molecular de muerte celular, que se produce en una gran variedad de enfermedades en el hombre y los animales: cáncer, desórdenes inmunológicos y neurológicos, enfermedades cardiovasculares e infecciosas y como conse-

cuencia del consumo de determinadas drogas anticáncer (Mirlos *et al.* 1996). En la RHD la infección induce la muerte celular en los hepatocitos mediante el fenómeno de la apoptosis (Alonso *et al.* 1998; Jung *et al.* 2000). La técnica utilizada para detectar la apoptosis ha sido la detección del enzima terminal transferasa deoxynucleotidil (TUNEL). Pero, a pesar de ser la técnica histoquímica más utilizada, presenta problemas para diferenciar células necróticas de las muertas por apoptosis (Dong *et al.* 1997). En nuestro caso, hemos utilizado el monoclonal anti-ssDNA F7-26, que reconoce una simple cadena de ADN terminal como marcador de apoptosis (Frankfurt *et al.* 1997). Como resultados preliminares hemos podido confirmar que la apoptosis fue detectada en los hepatocitos a las 29 hpi, existiendo células muy positivas en el 10 % de los hepatocitos. Como novedad podemos señalar que hemos detectado apoptosis en algunos macrófagos del bazo.

RTA02-048. Paratuberculosis bovina en Asturias. prevalencia y evaluación de la interferencia con la prueba de la tuberculina

Investigador responsable

Dr. José Miguel Prieto Martín

Organismo

SERIDA

de saneamiento de la tuberculosis bovina en Asturias.

Equipo investigador

Dr. Alberto Espí Felgueroso
Isabel Márquez Llano-Ponte
Ana Balseiro Morales
Dr. Francisco García Marín
Dra. Ana Mateos García

SERIDA
SERIDA
SERIDA
Univ. León
UCM Madrid

■ Estudio de la prevalencia e incidencia anual de la paratuberculosis bovina en Asturias.

Objetivos

■ Establecer y valorar las reacciones cruzadas de los animales infectados con *M. avium paratuberculosis* con la prueba de la intradermorreacción que se emplea en la campaña

Resultados

Reacciones cruzadas de los animales infectados con *M. Avium paratuberculosis* con la prueba de la intradermorreacción

Durante este primer año de trabajo se han desarrollado las siguientes tareas:



Se han recogido ganglios retrofaringeo, bronquial y mediastínico de 392 vacas sacrificadas en matadero procedentes de 141 rebaños que habían reaccionado positivamente a la prueba de la tuberculina (IDTB). En 117 animales también se recogió la válvula ileocecal, ganglio ileocecal y ganglio mesentérico caudal. Como control negativo se recogieron las mismas muestras en 68 vacas sacrificadas en matadero, procedentes de 64 rebaños libres de tuberculosis.

En 450 vacas pertenecientes a 7 rebaños con antecedentes clínicos y serológicos de paratuberculosis se realizó la interpretación severa de la prueba de la tuberculina con cutímetro. Se recogieron muestras de sangre en todos los animales. En los casos en que algún animal fue sacrificado se recogieron los ganglios ya mencionados para investigar tanto la tuberculosis como la paratuberculosis.

Los métodos de análisis realizados hasta la fecha fueron:

Procesado histológico. Todos los tejidos mencionados se procesaron según el protocolo habitual de fijación de tejidos en formol tamponado al 10%, inclusión en parafina, realización de secciones seriadas de 3 micras y tinción con hematoxilina-eosina y Ziehl-Neelsen.

Inmunohistoquímica. Se utilizó esta técnica para la detección de bacilos o fracciones de antígenos de *M. avium paratuberculosis*, utilizando para ello antisueros primarios obtenidos por nosotros. En estos animales se analizó: válvula ileocecal, ganglio ileocecal y ganglio mesentérico caudal.

PCR. Esta técnica, puesta a punto durante este primer año de proyecto, nos permite determinar si en válvula ileocecal, ganglio ileocecal y ganglio mesentérico caudal existen fragmentos de ADN específicos del *M. avium*

paratuberculosis. Como oligos se emplearon el IS900-90 y el IS900-91.

Estudio de la prevalencia e incidencia anual de la paratuberculosis bovina en Asturias

Muestreo. Para estudiar la seroprevalencia de la paratuberculosis bovina en Asturias se han preparado 2.184 sueros procedentes de los bancos de suero de las Campañas de Saneamiento Ganadero de los años 1995 hasta 2001. Y se recogieron 312 sueros por año teniendo en cuenta una prevalencia estimada del 28,21% y un nivel de confianza del 95%.

ELISA. Durante este primer año de proyecto se ha realizado un estudio comparativo de tres ELISA indirectos con el fin de decidir cuál de ellos es el más idóneo para llevar a cabo el estudio epidemiológico. Los ELISA estudiados fueron: ELISA de la ULE (Pérez et al. 1997); ELISA comercial IDEXX y ELISA comercial Pourquier. Para ello, se procesaron 82 sueros controles testados por inmunodifusión en gel de agar.

Histopatología. Mediante la recogida de muestras en matadero y su procesado histológico también es posible determinar la prevalencia de la paratuberculosis bovina, completando la información obtenida por métodos serológicos.

Dado que estamos todavía en el primer año de proyecto es prematuro adelantar resultados concretos. Este año ha servido para recoger las muestras en los animales sacrificados, poner a punto las técnicas de PCR y ELISA, recopilar los sueros para el desarrollo del estudio epidemiológico y decidir qué rebaños con animales seropositivos a la paratuberculosis serán objeto de seguimiento y estudio comparativo con la IDTB.

