

CEDIVE



Facultad de Ciencias
VETERINARIAS



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

TESIS DOCTORAL
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Paratuberculosis bovina: efecto de las micobacterias ambientales en el diagnóstico serológico

Leandro Adrián Di Paolo
2022





**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de

**DOCTOR EN CIENCIAS
VETERINARIAS**

**Paratuberculosis bovina: efecto de las micobacterias
ambientales en el diagnóstico serológico.**

AUTOR: Med. Vet. Di Paolo, Leandro Adrián.

DIRECTOR: TRAVERÍA, Gabriel Eduardo.

CODIRECTORA: ROMANO, María Isabel.

LUGAR DE TRABAJO: Centro de Diagnóstico e Investigaciones veterinarias
(CEDIVE)

Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

MIEMBROS DEL JURADO: Dra. ORIANI, Delia Susana.

Dra. PARDINI, Lais Luján.

Dra. BACIGALUPE, Diana Raquel.

AÑO: 2022

DEDICATORIA

Dedico esta tesis al esfuerzo de mis padres, Gladys y Eduardo, quienes invirtieron gran parte de su vida para que yo pueda cumplir el sueño que tuve desde niño, ser veterinario.

A mi mujer Florencia, y a mi hijo Augusto, que durante tantos años me acompañaron y apoyaron en este trabajo, en mi profesión, y en la vida en general.

A mis hermanos, Gabriel y Samanta, que junto a ellos la vida es más fácil.

A todos mis compañeros de trabajo, a mis amigos de la vida y de la profesión, y a todos los que desinteresadamente aportaron mucho para mi formación profesional y como persona.

A todos, gracias totales.

AGRADECIMIENTOS

Seguramente seré injusto con los agradecimientos, ya que probablemente no mencione a todos los que han colaborado en esta tesis.

En primer lugar, agradezco enormemente a mi director, el Dr. Gabriel Travería “El colo”, por haber sido mi guía, y por haber trabajado incansablemente para alcanzar este objetivo.

Al grupo del CEDIVE dedicado al estudio de la paratuberculosis, particularmente a Fiorella Alvarado Pinedo, Pedro Sosa, Luis Peralta, Magalí Romero, y tantos otros becarios y residentes que aportaron su trabajo. Además, quiero agradecer a Dolores Ancinas, que siempre me brindó su ayuda.

A todo el CEDIVE en su conjunto, a los técnicos y profesionales que se esfuerzan día a día para hacer crecer nuestro laboratorio.

Al Dr. Jorge Romero, quien confió en mí, hace ya dos décadas, para que forme parte de este hermoso proyecto que es el CEDIVE.

A Enrique Costa “El Nono”, de quién aprendí mucho y siempre confió en mí, desde aquel momento, en que me ofreció formar parte de Patología médica, hasta hoy.

A los profesionales del INTA Castelar, a la Dr. María Isabel Romano, por ser mi codirectora, al Dr. Martín Zumarraga, por ayudarnos con la identificación genómica de las micobacterias, y a la institución en general.

CITAS BIBLIOGRÁFICAS CORRESPONDIENTES A LAS PUBLICACIONES PARCIALES DEL TRABAJO DE TESIS.

Publicaciones en revistas:

- DI PAOLO LEANDRO ADRIÁN, SOSA PEDRO SEBASTIÁN, ALVARADO PINEDO MARÍA FIORELLA, ROMERO MAGALÍ ANDREA, PERALTA LUIS MARÍA, TRAVERÍA GABRIEL. Bovine paratuberculosis: association between the urea index and the optical density of serum in the indirect ELISA technique. Brazilian Journal of Animal and Environmental Research. v. 4, n. 1, jan/mar. 2021. DOI: 10.341 88/bjaerv4n1 -105.
- SOSA PS, ALVARADO PINEDO MF, DI PAOLO LA, PERALTA LM, TRAVERÍA GE. Comparación de ELISA indirecto en suero sanguíneo versus ELISA indirecto en leche, para el diagnóstico de paratuberculosis en bovinos de tambo: Realizada en la provincia de Buenos Aires, Argentina. Veterinaria (Montevideo) [Internet]. 26 de agosto de 2021 [citado 27 de agosto de 2021];57(216): e20215721602. Disponible en: <https://www.revistasmvu.com.uy/index.php/smvu/article/view/782>
- ALVARADO PINEDO MARÍA FIORELLA, DI PAOLO LEANDRO ADRIÁN, SOSA PEDRO SEBASTIÁN, ROMERO MAGALÍ ANDREA, PERALTA LUIS MARÍA, COSTA ENRIQUE FÉLIX, TRAVERÍA GABRIEL. Seroprevalencia de paratuberculosis bovina mediante la prueba de ELISA urea en rodeos de cría y de leche con sospecha de la enfermedad, localizados en la provincia de Buenos Aires, Argentina. ANALECTA VETERINARIA vol. 39 N° 1, 2019.

Presentaciones en congresos:

- DI PAOLO LEANDRO ADRIÁN, SOSA PEDRO SEBASTIÁN, ALVARADO PINEDO MARÍA FIORELLA, PERALTA LUIS MARÍA, TRAVERÍA GABRIEL. Comparación del uso de urea e inmunoabsorbentes en la técnica serológica de ELISA indirecto en paratuberculosis bovina. XIII Jornadas de la Asociación Argentina de Inmunología Veterinaria. I Reunión de la Red Latinoamericana de Inmunología Veterinaria. 18 y 19 de noviembre de 2021. FCV. UNLPam.
- SOSA P. S., ALVARADO PINEDO M. F., DI PAOLO L. A., PERALTA L. M., ROMERO M. A., TRAVERÍA G. E. Comparación entre un ELISA indirecto en suero y un ELISA en leche para el diagnóstico de paratuberculosis en vacas de tambo: resultados preliminares. Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnósticos (AAVLD). Rio cuarto, Córdoba. Nov. 2018.
- DI PAOLO LA., SOSA PS., ALVARADO PINEDO MF., PERALTA LM., ROMERO MA., TRAVERÍA GE. Paratuberculosis bovina: asociación entre el índice urea y la densidad óptica de los sueros en la técnica de ELISA

indirecto. Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnósticos (AAVLD). Rio cuarto, Córdoba. Nov. 2018.

- ALVARADO PINEDO MARIA FIORELLA, SOSA PEDRO S, DI PAOLO LEANDRO A., ROMERO MAGALI A., PERALTA LUIS M., TRAVERÍA GABRIEL E., MOYANO R. DAMIAN, JAUREGUIBERRY MARIA, ROMANO M. ISABEL. ELISA urea in the diagnosis of paratuberculosis: estimation of seroprevalence in some localities of Buenos Aires province, Argentina. 14 th International Colloquium on paratuberculosis. Fecha 4-8 de junio de 2018. Rivera Maya. México.
- ALVARADO PINEDO, MF; FERNANDEZ, M; MOYANO, RD; PERALTA, LM; DI PAOLO, LA; ROMERO, MA; ROMANO, MI; TRAVERÍA, GE. The diagnostic possibilities of bovine paratuberculosis using skin test with avian PPD. 13th International Colloquium on paratuberculosis. Fecha 20-24 de junio de 2016. Nantes. Francia.
- DI PAOLO, L.A; ALVARADO PINEDO, M.F; PERALTA, L.M; ROMERO, M.A; TRAVERÍA, G.E. Paratuberculosis bovina: diagnóstico serológico con un ELISA urea para intentar categorizar el estadio de la enfermedad. XXI Reunión Científico Técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico (AAVLD). Fecha 6,7 y 8 de octubre de 2016. Jujuy, Argentina.
- ROMERO MAGALI, ALVARADO FIORELLA, DI PAOLO LEANDRO, SANTANGELO MARIA, TRAVERIA GABRIEL. USO DE UN MEDIO DE CULTIVO LÍQUIDO PARA EL DESARROLLO TEMPRANO DE PARATUBERCULOSIS. VI Jornadas de jóvenes investigadores. Realizada en la UBA. 8, 9 y 10 de junio de 2016. Libro de resúmenes página 149.
- DI PAOLO, L.A; TRAVERÍA, G.E; ALVARADO PINEDO, M.F; ILLANES, F; NIÑO URIBE, A; MOYANO, D; ROMERO, J.R. Primer comunicación de transmisión congénita de tuberculosis en un feto de un rodeo de cría de Chascomús. Buenos Aires. Argentina. X Reunión Argentina de Patología Veterinaria. Fecha: 24,25 y 26 de agosto de 2016. Esperanza Pcia. de Santa Fe.
- ROMERO, M.A; ALVARADO PINEDO, M.F; DI PAOLO L.A; PERALTA, L.M; FERNANDEZ, M. MOYANO R.D; SANTAGELO, M. TRAVERIA GE. Medios de cultivo alternativos para el desarrollo de distintas micobacterias. 9na.s jornadas internacionales de Veterinaria práctica Mar del Plata 28 y 29 de agosto de 2015.
- ALVARADO PINEDO, MF. MOYANO, RD. PERALTA, LM. DI PAOLO, LA. ROMERO, MA. ROMANO, MI. TRAVERÍA GE. Plan de trabajo con aplicaciones repetidas de ppd aviar para mejorar el diagnóstico temprano de la paratuberculosis bovina. XX Reunión Científico Técnica de la

Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico (AAVLD). Fecha 27,28 y 29 de noviembre de 2014. Tucumán, Argentina. Libro de resúmenes ISBN 978-950-554-903-0. Pag. 10.

- ALVARADO PINEDO, M. FIORELLA.; CALVET, LUCIO; SORIANO, MERCEDES; VACA, ROBERTO; MOYANO, ROBERTO; DI PAOLO, L. ADRIÁN; TRAVERÍA GABRIEL. Potencial diagnóstico de la prueba tuberculínica en dos rodeos lecheros con paratuberculosis bovina. VIII Jornadas Internacionales de Veterinaria Práctica. Fecha: 9 y 10 de agosto de 2013. Organizado por el Colegio de Veterinarios de la provincia de Buenos Aires. Mar del Plata. Buenos Aires. Argentina. Resumen disponible en www.cvpba.org.ar.

ÍNDICE / TABLA DE CONTENIDOS.

Contenido

A) ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS:	3
B) RESUMEN:	4
C) PALABRAS CLAVES:	5
D) TÍTULO EN IDIOMA INGLÉS:	5
E) RESUMEN EN IDIOMA INGLÉS:	5
E) KEYWORDS:	6
1-INTRODUCCIÓN:	7
1.1 CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES DE LA ENFERMEDAD:	8
1.1.1 <i>Definición y aspectos básicos:</i>	8
1.1.2 <i>Características principales del agente etiológico:</i>	9
1.1.3 <i>La enfermedad en los bovinos:</i>	11
1.1.4 <i>Potencial zoonótico:</i>	18
1.1.5 <i>Métodos diagnósticos:</i>	19
1.1.5.1 <i>Diagnóstico clínico:</i>	20
1.1.5.2 <i>Diagnóstico post-mortem:</i>	21
1.1.5.3 <i>Patología macroscópica:</i>	21
1.1.5.4 <i>Histopatología:</i>	22
1.1.5.5 <i>Diagnóstico microbiológico:</i>	24
1.1.5.6 <i>Diagnóstico de inmunidad serológica:</i>	24
1.1.5.7 <i>Diagnóstico de inmunidad celular:</i>	27
1.1.6 <i>Tratamiento y control:</i>	29
1.2 SITUACIÓN ACTUAL DE LA PARATUBERCULOSIS EN LOS RODEOS DE LA CUENCA DEPRIMIDA DEL RÍO SALADO:	29
1.3 OBJETIVOS Y ALCANCES DE LA TESIS:	31
1.3.1 <i>Diseño experimental:</i>	33
2- MATERIALES Y MÉTODOS	35
2.1 RODEOS ESTUDIADOS:	35
2.2 PRUEBAS SEROLÓGICAS:	37
2.2.1 <i>ELISA:</i>	38
2.2.3 <i>ELISA CON ABSORBENTES</i>	41
2.2.4 <i>AGID:</i>	42
2.3 TUBERCULINIZACIÓN CON LA PPD AVIAR:	42
2.4 CULTIVO E IDENTIFICACIÓN DE MAP Y MA:	43
2.5 BACTERIOSCOPIA E IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA:	46
2.6 IDENTIFICACIÓN DE CEPAS:	48
2.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	50
2.7.1 <i>Curvas de ROC:</i>	51
2.7.2 <i>Análisis de correlación de Pearson:</i>	53
2.7.3 <i>Prueba de χ^2 (X^2):</i>	54
2.7.4 <i>Análisis de varianza (ANOVA):</i>	55
2.7.5 <i>Test de Friedman:</i>	56
2.7.6 <i>Test de Wilcoxon:</i>	56
2.7.7 <i>Análisis Bayesiano:</i>	57
3. RESULTADOS	61
3.1 ANÁLISIS DE RESULTADOS SEROLÓGICOS:	61

3.2 ANÁLISIS DE PREVALENCIA Y ANTECEDENTES SANITARIOS:.....	61
3.3 ANÁLISIS DE CORRELACIÓN:	62
3.4 ANÁLISIS DE PUNTO DE CORTE PARA IU:	66
3.5 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICOBACTERIAS ATÍPICAS (MA):	73
3.6 COMPARACIÓN DEL USO DE UREA E INMUNOABSORBENTES EN LA TÉCNICA DE ELISA. ..	76
3.7 EVALUACIÓN DE ELISA-U CON RELACIÓN A DIFERENTES ANTÍGENOS EN SUEROS DE BOVINOS CON PTBC Y TBC:.....	78
4. DISCUSIÓN	80
5. CONCLUSIONES	96
6. BIBLIOGRAFÍA	99
7. ANEXOS	111
ANEXO I.....	111
ANEXO II.....	112
ANEXO III.....	115
ANEXO IV	117
ANEXO V	118
ANEXO VI	119
ANEXO VII	120

A) ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS:

Ac: Anticuerpos.
ADN: ácido desoxirribonucleico.
Ag: Antígeno.
ARN: ácido ribonucleico.
AGID: inmunodifusión en gel de agar.
AUC (area under the curve): área bajo la curva.
BAAR: bacilos ácido alcohol resistentes.
CHP: cloruro de hexadecilpiridinio.
DO: Densidad óptica.
ELISA: ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima.
ELISA-su: ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima sin agregado de urea
ELISA-u: ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima con agregado de urea.
°C: grados centígrados.
ha: Hectárea.
IA: índice de avidéz.
IC 95%: intervalo de confianza del 95%.
ICB 95%: intervalo de credibilidad bayesiana del 95%.
Ig: inmunoglobulinas.
IL: interleuquinas.
IFN- γ : interferón gamma.
IHQ: inmunohistoquímica.
IS: secuencia de inserción.
IU: índice urea.
LR+: Likelihood Ratio positivo o razón de verosimilitud positiva.
LR-: Likelihood Ratio negativo o razón de verosimilitud negativa.
MA: Micobacterias ambientales.
Map: *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*.
 μ L: microlitros.
mg/ dL: miligramos por decilitro.
mg/ mL: miligramos por mililitro.
mm: milímetros
PBS: solución fisiológica bufferada.
PCR: reacción en cadena de la polimerasa.
PPD: derivado proteico purificado.
PPRC: % de positividad en relación con los controles.
PTBC: Paratuberculosis.
r.p.m: revoluciones por minuto.
ROC (receiver operating characteristic): características operativas del receptor.
Se: Sensibilidad.
Sp: Especificidad.
TBC: Tuberculosis.
Th: linfocitos T *helper*.
UFC: unidad formadora de colonia.
VPP: valor predictivo positivo.
VPN: valor predictivo negativo.

B) RESUMEN:

Esta tesis pretende ser un aporte para el diagnóstico serológico de la paratuberculosis bovina a través del desarrollo y puesta a punto de una técnica de ELISA indirecto con el agregado de urea (ELISA-u) como agente caotrópico mejorador de la especificidad. Además, se realizó el aislamiento e identificación de micobacterias ambientales (MA) a partir de materia fecal y se probó el ELISA con sueros inmunoabsorbidos con MA mayormente identificadas.

Se trabajó sobre tres rodeos con infección endémica y sobre muestras de suero ingresadas al servicio de diagnóstico del CEDIVE. Se procesaron más de 2000 muestras con ELISA-u. Además, se obtuvo el índice urea (IU), el cuál mejora la interpretación de los resultados. El ELISA-u tuvo una sensibilidad del 52% y una especificidad del 91%. Con estadística Bayesiana se calculó un VPP de 62%, un VPN de 90%, un LR+ de 6 y el LR- de 0,46. La prueba de ROC determinó un AUC de 0.86 y de 0.90 para ELISA-u e IU respectivamente, sin que existan diferencias significativas ($p= 0.13$) entre pruebas. El odds ratio calculado para IU demostró que los individuos que presentan un IU por encima del 80 (expuestos) tienen 28 más probabilidades de tener PTBC, considerándose un fuerte factor de riesgo para el rodeo donde se encuentran esos individuos.

La presencia de MA en la materia fecal mostró asociación estadística significativa con la positividad al ELISA-u ($p=<0.00$), siendo *M.*

nonchromogenicum la cepa mayormente aislada; mientras que el uso de la urea como mejorador de la especificidad presentó diferencias estadísticas significativas comparado con la utilización de sueros inmuoabsorbidos con *M. phlei* y *M. nonchromogenicum*.

Tanto el ELISA-u como el IU mostraron características operativas y predictivas más que alentadoras para la detección de animales con paratuberculosis, principalmente en mayores de 2 años.

C) PALABRAS CLAVES: Paratuberculosis, diagnóstico, ELISA urea, micobacterias ambientales.

D) TÍTULO EN IDIOMA INGLÉS: Bovine paratuberculosis: effect of environmental mycobacteria in serological diagnosis.

E) RESUMEN EN IDIOMA INGLÉS:

This thesis aims to be a contribution for the serological diagnosis of bovine paratuberculosis through the development and optimizing of an indirect ELISA technique with the addition of urea (u-ELISA) as a chaotropic agent that improves specificity. In addition, the isolation and identification of environmental mycobacteria (AM) from fecal matter was carried out and also different immunosorbents were tested.

We worked on three herds with endemic infection and on serum samples admitted to the CEDIVE diagnostic service. More than 2000 samples were processed with u-ELISA. In addition, the urea index (UI) improves the interpretation of the results. With Bayesian statistics the u-

ELISA had a sensitivity of 52% and a specificity of 91%, PPV of 62%, NPV of 90%, LR + of 6 and the LR- of 0.46. The AUC calculated with ROC test were of 0.86 for u-ELISA and 0.90 for UI respectively, with no significant differences ($p = 0.13$) between tests. The odds ratio calculated for UI showed that individuals with a UI above 80 (exposed) are 28 more likely to have PTBC, which is considered a strong risk factor for the disease.

The presence of MA in fecal matter showed a statistically significant association with positivity to the u-ELISA ($p = <0.00$), with *M. nonchromogenicum* being the most isolated strain; while the use of urea as a specificity enhancer showed statistically significant differences compared to the immunosorbents (*M. phlei* and *M. nonchromogenicum*).

Both the u-ELISA and the UI showed more than encouraging operational and predictive characteristics for the detection of animals with paratuberculosis, mainly in those older than 2 years.

E) KEYWORDS: Paratuberculosis, diagnosis, ELISA urea, environmental mycobacteria.

1-INTRODUCCIÓN:



Esta sección tiene por objetivo aportar las bases teóricas sobre las cuales se sustenta el desarrollo de esta tesis. Para una mejor comprensión, será dividida en tres grandes apartados: 1.1 Características principales de la enfermedad, 1.2 Situación actual de la paratuberculosis en los rodeos de la cuenca deprimida del río Salado y 1.3 Objetivos y alcances de la tesis.

El apartado *características principales de la enfermedad*, incluye los puntos 1.1.1 Definición y aspectos básicos, 1.1.2 Características principales del agente etiológico, 1.1.3 La enfermedad en los bovinos, 1.1.4 Potencial zoonótico, 1.1.5 Métodos diagnósticos, y 1.1.6 Tratamiento y control. En su conjunto, estos tópicos, describen a la enfermedad en el aspecto más amplio, remarcando las características bacteriológicas, morfológicas, tintoriales y culturales de su agente causal, entre otras.

Además, el rango de especies susceptibles y su posible rol como enfermedad humana. También, se plantean las alternativas de diagnóstico *ante-mortem* y *post-mortem*; y las limitaciones que existen para su tratamiento y control a campo.

El apartado 1.2, denominado *situación actual de la paratuberculosis en los rodeos de la cuenca deprimida del río Salado*, describe, entre otros aspectos, el impacto económico que genera la enfermedad en la producción, el aumento de la prevalencia observada en los últimos años y el rédito económico que genera la implementación de un plan de control.

El apartado 1.3, denominado *objetivos y alcances de la tesis*, expone las aspiraciones de este trabajo y las hipótesis que dan origen a la investigación. Además, el punto 1.3.1 explica el diseño experimental utilizado para cumplir con los objetivos propuestos.

1.1 Características principales de la enfermedad:

1.1.1 Definición y aspectos básicos: La paratuberculosis (PTBC) es una enfermedad infectocontagiosa crónica de los rumiantes domésticos (vaca, oveja, cabra, camélidos y búfalos), y de algunos rumiantes silvestres (ciervos y antílopes). La principal lesión observada en los animales enfermos es una ileocolitis granulomatosa crónica; asociada a signos clínicos de pérdida de peso y diarrea crónica incoercible, que culmina con la muerte. Es producida por una micobacteria llamada *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* (Map). Este fue descubierto en el año 1894

por H. A. Johne y L. Frothingham; en honor a su descubridor, la enfermedad también se conoce como enfermedad de Johne.

1.1.2 Características principales del agente etiológico: Map, es un bacilo ácido alcohol resistente (BAAR), Gram positivo, perteneciente al género *Mycobacterium*, dentro del cual se incluyen 169 especies y 13 subespecies. Comparado con otras micobacterias es relativamente más pequeño, con un tamaño de 0,5 a 1,5 μm ; en las muestras clínicas presenta una particular tendencia al agrupamiento (Chiodini y col., 1984). Para su crecimiento *in-vitro* requiere de la micobactina, un agente quelante del hierro (Thorel, 1984). Esta exigencia metabólica, sumada al lento crecimiento y a la contaminación que naturalmente presenta la materia fecal (principal muestra para el aislamiento), hacen que el cultivo *in-vitro* sea dificultoso, lento y propenso a contaminarse con otras bacterias u hongos (Whitlock y col., 1991).

La velocidad de desarrollo en los medios de cultivo es una característica que se ha utilizado desde antaño para la clasificación clínica de las micobacterias (ver tabla 1). Las cepas de crecimiento lento (>7 días de incubación *in-vitro*) regularmente se encuentran asociadas a enfermedad en humanos y animales; mientras que las de crecimiento rápido (<7 días de incubación *in-vitro*) generalmente no son patógenas y suelen aislarse del medio ambiente, e inclusive, de la materia fecal de los rumiantes. Timpe y Runyon (1954) subdividieron a las especies de crecimiento lento en tres grupos, bajo el criterio de la velocidad de desarrollo y la producción visible de pigmento.

Tabla 1. Agrupación de las micobacterias según la velocidad de crecimiento y producción de pigmento (adaptado de Runyon, 1959 y de Bernardelli, 2007).

Velocidad de crecimiento	Grupo de Runyon	Ejemplos de especies
Crecimiento lento (>7 días)	Grupo I	<i>M. simiae</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M.</i>
	Fotocromógenas	<i>marinum</i> , <i>M. asiaticum</i> .
	Grupo II	<i>M. gordonae</i> , <i>M. flavescens</i> ,
	Escotocromógenas	<i>M. scrofulaceum</i> , <i>M. szulgai</i> .
	Grupo III	<i>M. avium</i> , <i>M. avium sub.esp.</i>
	No cromógenas	<i>paratuberculosis</i> , <i>M. gastri</i> , <i>M.</i>
		<i>intracellulare</i> , <i>M. terrae</i> , <i>M.</i>
		<i>nonchromogenicum</i> .
Crecimiento rápido (<7 días)	Grupo IV	<i>M. abscessum</i> , <i>M. chelonae</i> ,
	No cromógenas	<i>M. fortuitum</i> , <i>M. goodii</i> , <i>M.</i>
		<i>immunogenun</i> , <i>M. phlei</i> , <i>M.</i>
		<i>smegmatis</i> , <i>M. mucogenicum</i> .

La patogenicidad de Map no se halla ligada a la presencia de cápsula, ni de toxinas, como suele ocurrir con bacterias patógenas de otros géneros. El poder patógeno parece estar ligado a la capacidad que posee dicho agente de evadir al sistema inmune, sobreviviendo y multiplicándose dentro de las células del sistema fagocítico mononuclear, y al efecto inmunológico que desencadenan los lípidos presentes en su pared. Se reconoce que los lípidos tienen implicancia en la expresión del gen de IL10, disminución de la acidificación del fagosoma, fusión del fagolisosoma y muerte bacteriana. Además, participarían en la formación de biofilms e invasión intestinal (Thirunavukkarasu y col., 2014).

Su desarrollo *in-vitro* se lleva a cabo en el medio de cultivo de Herrold suplementado con micobactina (sideróforo quelante del hierro), incubado a 37°C. Las colonias bacterianas se pueden observar macroscópicamente en un lapso aproximado de 2 y 4 meses. Para considerar un cultivo como negativo debe esperarse un tiempo no menor a 6 meses. Su clasificación presuntiva se realiza en base a la dependencia de micobactina en el medio de Herrold, el aspecto pequeño de la colonia, el prolongado tiempo de crecimiento y la coloración de Ziehl Neelsen positiva (Chiodini y col., 1984). La identificación final se logra con la detección genética de la secuencia de inserción IS900 y F57 (Harris y Barletta, 2001; Sidoti y col., 2011), consideradas únicas de Map. La sobrevivencia de la bacteria en el ambiente puede ser de hasta 1 año, dependiendo de la presencia de materia orgánica, del pH del suelo y de la exposición a la luz ultravioleta (Larsen y col., 1956; Smith y col., 2011; Whittington y col., 2005). Algunos autores (Whittington y col., 2005; Fecteau y col., 2013) han descrito una forma de resistencia no esporulada de la bacteria en medio ambiente no favorable. Esta bacteria “durmiente” posee su metabolismo disminuido y es temporariamente imposible de multiplicar *in-vitro*.

1.1.3 La enfermedad en los bovinos: Los establecimientos ganaderos se infectan a partir de la introducción de animales enfermos subclínicos, o asintomáticos. Como se mencionó anteriormente, al tratarse de una enfermedad crónica y con un largo período de incubación (varía entre 2 y 8 años), la compra e introducción de animales aparentemente

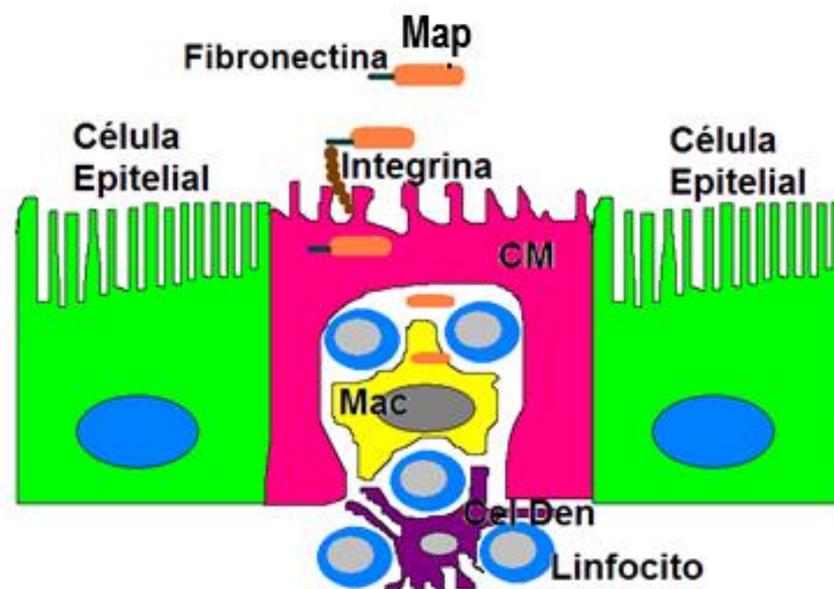
sanos, pero eliminadores de bacterias en la materia fecal, es el modo más importante por el cual se difunde la enfermedad de un rodeo a otro.

La principal vía de diseminación es la fecal, siendo la vía de transmisión fecal-oral la más habitual. Los animales más susceptibles son los jóvenes, en sus primeras semanas de vida. Normalmente, estos se contagian a partir del contacto con las heces de su madre enferma. Sin embargo, existen vías de infección secundarias como la leche, los alimentos o el agua contaminada con Map (Valentin-Weigand y Goethe., 1999). La alta susceptibilidad del ternero a la infección en sus primeros días de vida está demostrada a partir de la baja dosis infectante que requiere este para enfermar. Una vaca adulta con diarrea elimina aproximadamente 10^9 bacterias por gramo de materia fecal (Whitlock y col., 2005), mientras que solamente se requieren 10^3 bacterias por gramo de materia fecal para infectar a un ternero (Clarke, 1994 y 1997).

Luego de la infección inicial, los animales se mantienen asintomáticos (incubación) por un período de tiempo que, como ya fue mencionado, puede durar años. Esta variación depende, entre otros factores, de la edad de infección y de la dosis infectante; existiendo una relación directamente proporcional entre la edad al primer contacto y el tiempo de incubación. A menor edad, y a mayor dosis infectante, el período de incubación tiende a ser menor; mientras que en el caso contrario la incubación se prolonga. El largo e impredecible período de incubación es uno de los factores críticos para el diagnóstico de la enfermedad en los rodeos con infección endémica.

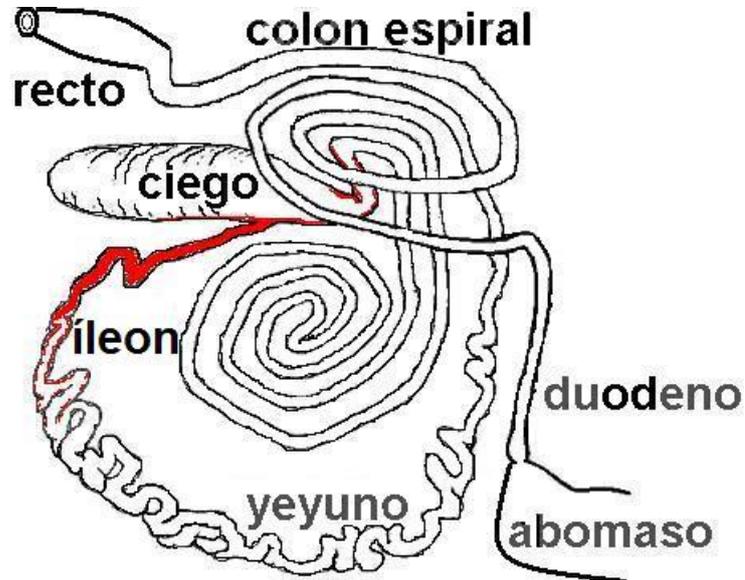
Tras su ingestión, y al alcanzar el medio ácido estomacal, la micobacteria activa sus proteínas de unión a la fibronectina, una proteína presente en la bilis (Valentin-Weigand y Goethe., 1999). Posteriormente, al transitar por el duodeno, toma contacto con la fibronectina de la bilis. El hecho de que Map se una a la fibronectina le facilita, a continuación, poder adherirse por intermedio de esta, con las integrinas de las células M de las placas de Peyer del íleon (Momotani y col.,1988). Desde aquí, pasa a los macrófagos en contacto con las células M, donde finalmente, se multiplica y se localiza en la mucosa del intestino delgado y órganos linfáticos (Momotani y col., 1988; Dennis y col., 2011).

Figura 1: Representación esquemática del ingreso de Map en la placa de Peyer del íleon, por medio de la fibronectina y la célula M.



Referencias: Map: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. CM: célula M. Cel Den: Célula dendrítica.

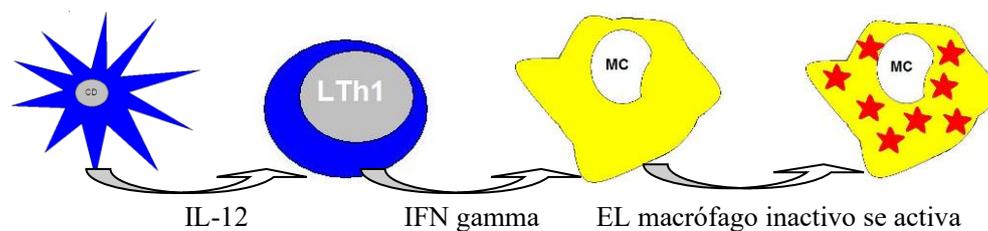
Figura 2: Esquema de localización de las lesiones primarias (color rojo) en el intestino delgado y en la primera del intestino grueso.



Transcurridos unos 8 meses post-infección, se comienza a visualizar la respuesta inflamatoria; el sistema inmune detiene la infección, pero no puede eliminar por completo a la micobacteria, la cual por distintos mecanismos evade la respuesta inmune. Por lo tanto, es capaz de sobrevivir y proliferar dentro de los macrófagos, ocasionando una gran infiltración de macrófagos cargados de micobacterias, afectando la submucosa intestinal, y originando diarrea crónica con mala absorción de nutrientes y, finalmente, la muerte. La necropsia permite observar linfangiectasia de los vasos linfáticos de la serosa del íleon y colon, hipertrofia de los linfonodos asociados, engrosamiento y corrugación de la mucosa intestinal y, en algunos animales, es posible de observar la válvula ileoceal aumentada de tamaño y edematosa (Buergelt y col., 1978).

Es pertinente remarcar que la respuesta inmune desarrollada por los animales durante la enfermedad es altamente compleja. A modo introductorio, podemos decir que los animales jóvenes asintomáticos responden ante la enfermedad con una respuesta primaria de tipo celular, basada en la activación de linfocitos Th1. Estos liberan interferón gamma (IFN- γ) e interleuquina 2 (IL-2), el efecto de estas citoquinas es la activación macrofágica. El macrófago activado aumenta el estallido respiratorio, la hipersensibilidad de tipo retardada y la necrosis caseosa.

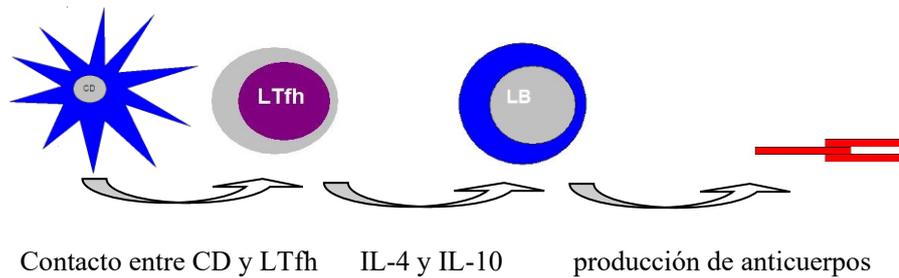
Figura 3: Representación de la inmunidad celular.



Referencias: CD: Célula dendrítica. LTh1: Linfocito T helper 1. MC: macrófago.

En los estadios más avanzados de la enfermedad, la inmunidad celular declina, dando paso a la inmunidad humoral, mediada por anticuerpos (Ac). En este caso, la subpoblación de linfocitos Th2 activa la liberación de las IL-4 y IL-10, estimulando así la producción de Ac. La concentración creciente de IL-10 inhibe el efecto de los linfocitos Th1, y por consiguiente inhibe la inmunidad celular.

Figura 4: Representación de la inmunidad humoral.



Referencias: LTfh: Linfocitos T cooperadores foliculares. IL: interleuquinas.

En base al tipo de respuesta inmune, a la presencia de signos clínicos y a la eliminación de micobacterias, la enfermedad puede dividirse en 4 estadios:

1° Estadio: Enfermedad silente, los animales no presentan ningún tipo de signo clínico a pesar de estar infectados a edad temprana. No eliminan Map por la materia fecal o lo hacen a niveles difíciles de detectar, y no presentan respuesta inmunológica humoral. Este grupo se encuentra conformado por los terneros desde su nacimiento hasta aproximadamente los 10 meses de edad.

2° Estadio: Enfermo subclínico, en este grupo tampoco es factible observar signos clínicos. Los animales pueden tener respuesta celular o humoral, y eliminan bacterias en forma intermitente.

3° Estadio: Enfermedad clínica, estos animales presentan diarrea intermitente, pérdida progresiva de peso y eliminan bacterias por materia fecal. Se pueden detectar por inmunidad humoral, y pueden,

temporariamente, mejorar su estado y volver al segundo estadio o avanzar al 4° estadio.

4° Estadio: Enfermedad clínica avanzada, estos presentan emaciación, edema submandibular y diarrea incoercible. Son supereliminadores de micobacterias por la materia fecal, y mueren en pocas semanas producto de la deshidratación y caquexia.

En base a los estadios anteriormente mencionados y a modo de estimar la prevalencia de la enfermedad en un rodeo se creó el concepto de “Efecto iceberg”, este fenómeno hace referencia a cómo se comporta epidemiológicamente la enfermedad en un rodeo cerrado¹. En este caso la prevalencia aproximada de la enfermedad se puede estimar tomando en cuenta los siguientes datos: por cada animal que se muere de paratuberculosis en el estadio 4°, se encontrarán 1-2 animales en el estadio 3°, otros 4-8 en el estadio 2° y unos 10-15 animales afectados en el estadio 1°, en resumen si sumamos todos los animales de los diferentes estadios, por cada animal que muere de paratuberculosis tendremos otros 15-25 animales enfermos, de los cuales con los métodos de diagnóstico actuales solo podremos detectar aproximadamente la mitad.

¹ Rodeo en el cuál se reponen los animales a partir de las crías que allí nacen, sin compras externas.

Figura 5: Representación del llamado “efecto iceberg” de la PTBC bovina, donde los enfermos visibles son el menor número de casos.



1.1.4 Potencial zoonótico: Los conocimientos actuales no son concluyentes en cuanto a la relación de Map como una de las causas de la enfermedad de Crohn, en humanos, muy similar a la paratuberculosis de los rumiantes (Aitken y col, 2021; Dow y Sechi, 2019; Dow, 2012; Hermon-Taylor, 2004, Chiodini y col 1984a). Además, se ha investigado la posible asociación de este agente etiológico con la diabetes tipo 1 (Manca y col, 2012) y con otras enfermedades autoinmunes como la tiroiditis de Hashimoto y el síndrome de Melkersson–Rosenthal (D’Amore y col, 2010). Map pudo ser aislado e identificado por técnicas moleculares (PCR- IS900) a partir de muestras de tejido intestinal de humanos afectados por la enfermedad de Crohn en varios países del mundo (Gajendran y col, 2018). La exposición humana a Map se produce a partir del consumo de alimentos

contaminados (Chiodini y col 1993; Stabel y col., 2001). Un trabajo publicado por Cirone y col. (2004) logro demostrar, utilizando PCR-IS900, que en el 1,56% (6/384) de las muestras de leche comercial pasteurizada se halló presente la bacteria, similares resultados obtuvo Paolicchi y col. (2012). Estudios similares realizados en Alemania pudieron demostrar la presencia de Map en el 39% (56/143) de las muestras de musculo esquelético recolectadas durante la faena de bovinos infectados (Dahmen y col., 2018). Actualmente, se está investigando el microbioma intestinal como factor protector contra la infección por Map (Matthews y col., 2021).

A pesar de lo postulado anteriormente, hoy se la sigue considerando una enfermedad no zoonótica; aunque un trabajo recientemente publicado por Aitken y col. (2021) muestra discrepancias con esta afirmación.

1.1.5 Métodos diagnósticos: En función de lo expuesto en el apartado 1.1.3, queda claramente demostrado que detectar a los animales clínicos silentes y subclínicos plantea todo un desafío desde el punto de vista del diagnóstico. En efecto, la patogenia compleja de la enfermedad, sumada al largo período de incubación (2-8 años) obliga a recurrir a la combinación de distintas técnicas diagnósticas aplicadas estratégicamente sobre el rodeo para obtener la mayor sensibilidad (Se). La Se de las pruebas aumenta conforme progresa la enfermedad (Collins, 1996; Nielsen y Toft, 2005). La combinación puede hacerse de dos maneras: a- en paralelo y b- en serie. La interpretación de los resultados depende de la secuencia con que fueron utilizadas y de la manera en que los resultados son integrados (León y Duffy, 2006). Las pruebas en paralelo son dos o

más pruebas que se realizan sobre una muestra y buscan aumentar la sensibilidad. Un individuo para ser positivo tiene que reaccionar al menos a una de las pruebas realizadas. En cambio, las pruebas en serie buscan aumentar la especificidad, son dos o más pruebas aplicadas en forma consecutiva, en donde sólo las muestras que resultan positivas a una prueba son procesadas por la prueba siguiente. Un individuo es considerado como positivo cuando reacciona de manera positiva a todas las pruebas realizadas.

El diagnóstico puede hacerse sobre el animal vivo o la población afectada, y a partir del cadáver (diagnóstico *post-mortem*). A continuación, se detallan las principales técnicas diagnósticas disponibles actualmente:

1.1.5.1 Diagnóstico clínico: Como se mencionó oportunamente, los terneros se infectan a los pocos días de nacidos, pero no mostrarán signos hasta transcurridos como mínimo los 2 años. Pasado el período de incubación, los primeros signos consisten en diarrea acuosa, al principio intermitente, y finalmente crónica, incoercible, sin respuesta a los tratamientos. El estado general se deteriora progresivamente por la pérdida de peso, lo que conlleva a emaciación, caquexia y muerte. El apetito se mantiene normal, pero por la diarrea hay deshidratación, y por la pérdida de proteínas hay edema sub-mandibular (Clarke, 1997; Whitlock, 1996). Existe bibliografía internacional que correlaciona la prevalencia de la enfermedad, con el pH del suelo. Los suelos ácidos se asocian con una mayor prevalencia de PTBC, comparados con los alcalinos (Kopecky, 1971; Norby y col. 2007).

Figura 6: Vaca que formó parte de la tesis (ID: U932) con signos clínicos avanzados de PTBC. Puede observarse adelgazamiento marcado, diarrea crónica y mal aspecto general.



1.1.5.2 Diagnóstico post-mortem: A partir de las lesiones macroscópicas es posible realizar histopatología, inmunohistoquímica, coloración de Ziehl Neelsen, cultivo de materia fecal y/o tejidos y, posteriormente técnicas moleculares para la identificación de cepa (PCR-secuenciación).

1.1.5.3 Patología macroscópica: Las lesiones intestinales pueden ser difusas o segmentadas, hallándose limitadas al íleon, colon y sus linfonodos asociados, o comprometiendo toda la extensión del intestino. En la serosa intestinal se pueden observar los vasos linfáticos engrosados y dilatados (linfangiectasia); la pared intestinal se encuentra engrosada por el infiltrado inflamatorio y el edema, lo que hace remarcar los pliegues intestinales, la válvula ileocecal puede estar enrojecida o aumentada de tamaño por el edema y la infiltración celular (Buergelt y col., 1978).

Figura 7: Vasos linfáticos dilatados y engrosados (linfangiectasia) en la serosa intestinal.

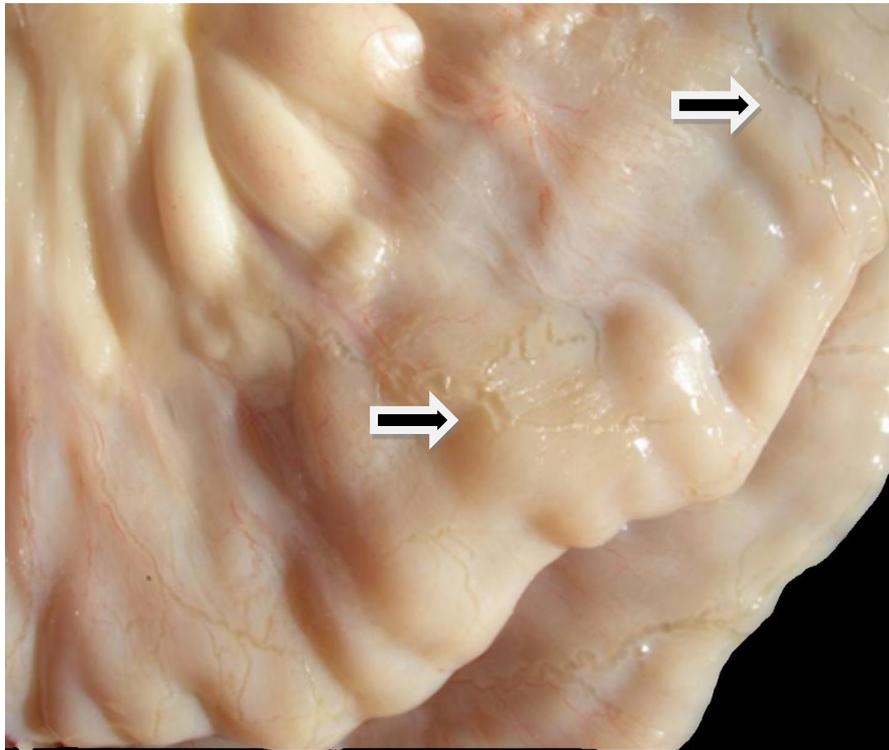
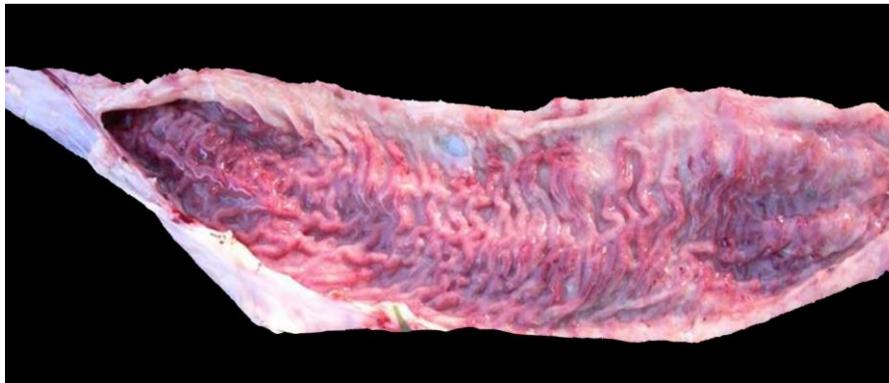


Figura 8: Mucosa de íleon engrosada por el infiltrado inflamatorio y el edema “aspecto cerebroide”.



1.1.5.4 Histopatología: La lesión se caracteriza por ser una inflamación granulomatosa difusa o multifocal, localizada principalmente en el intestino y en los linfonodos mesentéricos. En enfermos clínicos, con lesiones difusas, se mencionan dos formas patológicas principales, la

paucibacilar y la multibacilar. La primera se caracteriza por la presencia de un infiltrado linfocítico y pocos macrófagos conteniendo pocas o ninguna micobacteria en su interior y en la segunda por la gran cantidad de macrófagos cargados de micobacterias (Carrigan y Seaman, 1990; Pérez y col. 1996; Clarke, 1997; Corpa y col. 2000). Buergelt y col., (1978) utilizó criterios similares a los mencionados y clasificó las lesiones como incipientes, moderadas y marcadas. Las lesiones incipientes se encuentran en las vellosidades y en la zona paracortical de los linfonodos, con escasos macrófagos y células gigantes tipo Langhans; en donde es raro observar bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR). En las lesiones moderadas se observan varias células gigantes tipo Langhans acompañadas o no por grupos de macrófagos, localizados en la mucosa y submucosa, y en los linfonodos mesentéricos. Las lesiones marcadas se caracterizan por numerosas células tipo Langhans y macrófagos infiltrando todas las capas de la pared intestinal y la luz de los conductos linfáticos. Las vellosidades se encuentran fusionadas y las criptas distendidas. Las células inflamatorias ocupan el seno subcapsular y la zona paracortical de los linfonodos mesentéricos. Se observan numerosos BAAR en los macrófagos y células de Langhans (Buergelt y col., 1978; Clarke, 1997). La histopatología presenta baja sensibilidad comparada especialmente con el cultivo de linfonodos. La baja sensibilidad se debe, entre otras cosas, a la distribución multifocal de pequeños granulomas en la mucosa intestinal (Martinson y col., 2008).

1.1.5.5 Diagnóstico microbiológico: El cultivo bacteriológico es altamente específico, y es considerado la prueba de oro en el diagnóstico de la paratuberculosis bovina. Presenta como inconvenientes el alto costo, la laboriosidad y el tiempo de incubación prolongado (aproximadamente 4 meses). El medio de cultivo utilizado de modo convencional es el de Herrold, con un límite de detección de 100 bacterias por gramo de materia fecal (Merkal, 1970; Jorgensen, 1982). El aislamiento de la micobacteria se considera diagnóstico. Para la identificación definitiva del género *Mycobacterium* se utiliza la prueba de PCR, la cual detecta las secuencias de inserción IS900, ISMap02 (Collins y col, 1990; Garrido y col., 2000; Stabel y col., 2005).

La detección de micobacterias no tuberculosas o ambientales (MA), definidas así por la Organización Mundial de la Salud (2004), se realiza a partir de la comparación de segmentos variables del genoma, dado que estos presentan una relativa gran diferencia entre especies y baja variabilidad dentro de las mismas. Los genes más utilizados con fines taxonómicos son 16S ARNr y *hsp65*.

1.1.5.6 Diagnóstico de inmunidad serológica: Las pruebas serológicas disponibles abarcan dos técnicas, por un lado, se halla la técnica de ELISA y por otro la inmunodifusión en gel de agar (AGID). A continuación, se describen las principales características de cada una.

ELISA: Posee como característica principal que es altamente sensible, de realización rápida y de bajo costo. Es la prueba de elección

para el diagnóstico de PTBC en la mayoría de los países, porque se obtiene un resultado rápido que permite apartar a los animales enfermos. El principal inconveniente que muestra se relaciona con la especificidad. Numerosas investigaciones (Norby y col., 2007; Osterstock y col., 2006; Biet y Boschioli, 2014) hacen referencia a que la presencia de MA en ciertas regiones geográficas, sensibilizan a los bovinos y generan falsas reacciones positivas (afectan la especificidad) a diversos ELISA. Osterstock y col. (2006) han demostrado que la inoculación vía subcutánea de MA inactivadas, aisladas de materia fecal, sensibilizan a los bovinos y generan falsos positivos en los ELISA comerciales.

Los avances para mejorar la especificidad estuvieron a cargo del Dr. Yokomizo, quién incorporó la absorción de los sueros al *Mycobacterium phlei*, previo a la realización de la prueba de ELISA, con el fin de absorber los anticuerpos inespecíficos. El razonamiento que lo llevó a este proceso fue buscar una micobacteria ambiental comúnmente presente en los animales, que pudiera ser responsable de la aparición de anticuerpos inespecíficos a PTBC capaces de reaccionar en la prueba de ELISA.

Con el fin de aumentar la especificidad, además del uso de absorbentes, se desarrollaron otras modificaciones aplicadas al ELISA convencional. Existen antecedentes de que el agregado, en un paso extra, de un agente caotrópico² como la urea o el NaCl separan las uniones Ag-

² Un agente caotrópico es una sustancia que desorganiza la red tridimensional del agua influyendo en la organización de sus moléculas a través de sus enlaces de hidrógeno, y en la interacción de estas con otros solutos como macromoléculas tales como proteínas, ADN o ARN, tendiendo a desnaturalizarlas o disolverlas.

Ac lábiles logrando aumentar la especificidad (Fialová y col., 2017). La urea actúa afectando los enlaces de hidrógeno y las fuerzas de Van Der Waals, desestabilizando las fuerzas hidrófobas que actúan en la unión Ag-Ac, las uniones débiles se desprenden, quedando unidas las que tienen mayor afinidad funcional; mientras que el NaCl actúa sobre la disociación de las uniones electrostáticas. El ELISA con caotrópicos se ha utilizado para determinar la afinidad de los anticuerpos con respecto al antígeno. Este tipo de prueba ha sido aplicada principalmente en enfermedades parasitarias, víricas y algunas bacterianas (Sager y col., 2003; Marcipar y col., 2001; Aguado-Martinez y col., 2005). La afinidad se incrementa con el tiempo de exposición del anticuerpo con el patógeno, y se relaciona con la cronicidad de la infección. Las uniones Ag-Ac recientes o inespecíficas presentan baja afinidad, por lo tanto, se desacoplan fácilmente por el efecto de la urea. Podemos considerar que las uniones de baja afinidad también son inespecíficas; mientras que las uniones específicas y de largo tiempo, poseen alta afinidad, están relacionadas a infección, y no se ven alteradas por la presencia del caotrópico. En esta tesis se utilizó la urea a una concentración de 8 M, la cual además de desestabilizar las uniones débiles, nos permite predecir aproximadamente el estadio que cursa un bovino enfermo de PTBC en base a la mayor o menor afinidad.

Inmunodifusión en gel de agar. Esta técnica posee menor sensibilidad que la prueba de ELISA; y generalmente se utiliza en animales con signos clínicos evidentes para confirmar la enfermedad. En esta tesis

se utilizó como prueba complementaria en algunos de los sueros analizados.

1.1.5.7 Diagnóstico de inmunidad celular: Las técnicas utilizadas detectan reacciones inmunes mediadas por células, tanto *in-vivo* (prueba intradérmica o tuberculina) como *in-vitro* (interferón gamma y proliferación celular).

Prueba intradérmica: Esta técnica diagnóstica es la herramienta oficial, determinada por SENASA para el control de la tuberculosis; y también es aplicable al diagnóstico de paratuberculosis. Se trata de una prueba *in-vivo* utilizada en los animales jóvenes para detectar la inmunidad celular en las primeras etapas de la enfermedad. Como antígeno se suele utilizar la tuberculina aviar a una concentración de 0,5 mg/ml, obteniéndose resultados con buena especificidad (Kalis y col., 2003; Cicuta 1999). Las vías de aplicación varían según la enfermedad que se desee diagnosticar y la especie sobre la cual se aplique. Generalmente se inocula en el pliegue anocaudal interno; aunque está comprobado que aplicándola en el tercio medio de la tabla del cuello aumenta la sensibilidad (Good y col., 2011a). La lectura se realiza a las 72 hs de la aplicación, comparando el espesor de los pliegues cutáneos anocaudales, o del espesor de la piel del cuello en los lugares de inoculación (Körmendy, 1988).

Las MA presentes en los ecosistemas donde viven los bovinos pueden sensibilizar a los animales y alterar la especificidad de la técnica. La presencia de estas está ligada a condiciones particulares del suelo y a

otros factores ambientales; lo que fue documentado en el país (Oriani y Sagardoy, 2002; Oriani y col., 2019) y en el exterior (Norby y col., 2007). Por lo tanto, el aumento de reactantes inespecíficos es más frecuentes en algunas regiones que en otras.

Figura 9: Reactante a la prueba intradérmica con PPD Aviar luego de 72 hs. de inoculación. Nótese el engrosamiento del pliegue anocaudal interno izquierdo.



Prueba de Interferón gamma: Es una prueba *in vitro*, se extrae sangre entera de los animales y en el laboratorio se estimula con antígenos para determinar la presencia de linfocitos sensibilizados, se realiza en kits comerciales que detectan la liberación de Interferón gamma por los

linfocitos previamente expuestos a los antígenos testeados (Stabel y col., 1996, 2000 y 2007).

Prueba de proliferación celular: También se trata de una prueba *in vitro*, en donde previa extracción de sangre entera, se separan los linfocitos y se los estimula con antígenos y mitógenos, posteriormente se detecta la proliferación celular de las células sensibilizadas con sales de tetrazolium (Kurade y Tripathi, 2008).

1.1.6 Tratamiento y control: La enfermedad clínica progresa indefectiblemente hacia la muerte. Por el momento no se conocen tratamientos curativos. El tratamiento sintomático en base a antibióticos de amplio espectro puede, en algunos casos, lograr mejoras temporarias de la salud. Debido a la baja expectativa de curación con antibióticos, y a la imposibilidad de usar vacunas para prevenir la enfermedad en Argentina³, los únicos métodos de control disponibles son las medidas de manejo tendientes a disminuir su diseminación y el diagnóstico y eliminación de los animales enfermos (Paolicchi y col., 2002).

1.2 Situación actual de la paratuberculosis en los rodeos de la cuenca deprimida del río Salado:

La cuenca deprimida del Río Salado incluye una región de aproximadamente unas 6,2 millones de ha de superficie principalmente ganadera. La producción anual de terneros está estimada en 2 millones, lo que representa el 16 % de la producción del país.

³ En Argentina la vacunación de paratuberculosis no está permitida por interferir en el diagnóstico de la tuberculosis bovina, en donde se utiliza la prueba tuberculínica.

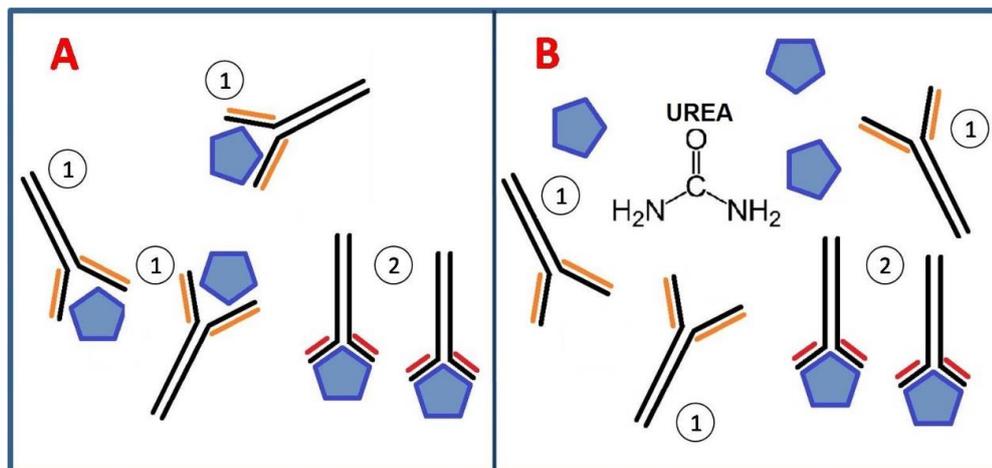
Un estudio publicado por nuestro grupo de investigación (Alvarado Pinedo y col., 2019) deja ver que la enfermedad es endémica en los rodeos de la Pcia. de Buenos Aires. Sobre un análisis serológico con la técnica de ELISA-u (ELISA urea) de 10.749 muestras de sangre de bovinos de 35 rodeos de cría y 3 tambos, se obtuvo una prevalencia individual del 6% para bovinos de carne y del 17% para bovinos lecheros. La prevalencia predial fue del 97,8%. Esto demuestra que la enfermedad está virtualmente presente en todos los rodeos de la región, e impacta de mayor manera sobre los tambos. En consecuencia, con la alta seroprevalencia, y tomando como base epidemiológica el efecto iceberg anteriormente descrito, se presume que por cada bovino con signos clínicos avanzados existen al menos entre 15 y 25 animales enfermos inaparentes, las tasas reales de infección y de pérdidas en los establecimientos ganaderos parecieran ser elevadas y a la vez difíciles de estimar. En Argentina la enfermedad en los bovinos es conocida desde 1932 (Rosenbusch, 1937). Su evolución silenciosa (debido a la incubación prolongada) a través de los años, sumada a la falta de técnicas diagnósticas eficaces ha hecho que en la actualidad los principales centros de diagnóstico de la región, como lo son INTA Balcarce (Späth y col., 2012; Moreira y col., 1994; Fernández-Silva y col., 2014) y CEDIVE (FCV-UNLP) (Costa y col., 2004; Di Paolo, datos sin publicar), la mencionen como una de las principales causas de mortandad dentro de las muertes ocasionadas por agentes infecciosos. Año tras año, los establecimientos regionales pierden, ya sea por descarte y/o muertes, aproximadamente el 3% de su stock producto de la enfermedad. Por ello,

resulta de suma relevancia la detección precoz de los animales afectados y su posterior destino a faena, de modo tal de minimizar las pérdidas económicas y evitar, al menos en parte, la difusión de la enfermedad.

1.3 Objetivos y alcances de la tesis:

Dada las limitaciones ya expuestas que presentan las técnicas diagnósticas disponibles y las complicaciones existentes para controlar la enfermedad con vacunas o tratamientos, resulta sumamente importante detectar precozmente a los animales enfermos y eliminarlos del rodeo. Con esta motivación es que nos proponemos trabajar sobre la base de los siguientes objetivos; en primer orden, desarrollar una técnica de ELISA con el agregado de urea que sea capaz de aumentar la especificidad con relación al ELISA tradicional; para así poder detectar con mayor exactitud los enfermos subclínicos y disminuir los falsos positivos. La urea afecta a los enlaces de hidrógeno, desestabilizando las fuerzas hidrófobas que actúan en la unión Ag-Ac. Las uniones débiles se desprenden, quedando unidas las que tienen mayor afinidad funcional. La afinidad de los anticuerpos con respecto al antígeno se incrementa con el tiempo, lo que se relaciona con la cronicidad de la infección (ver figura 10).

Figura 10: Efecto pre (A) y post (B) agregado de urea sobre el suero bovino.
1: Ac de baja avidez. 2: Ac de alta avidez.



En segundo orden, intentar el aislamiento de micobacterias ambientales de la materia fecal de bovinos provenientes de rodeos infectados con PTBC. En tercer, y último orden, emplear las cepas aisladas como absorbentes en la técnica de ELISA, con el objetivo de eliminar los Ac inespecíficos (absorbentes) y su efecto será contrastado con la utilización de la urea.

Consecuentemente con los objetivos, formulamos las 3 hipótesis (H) centrales sobre las que se desarrollará la investigación:

H₁: Las micobacterias ambientales existentes en los rodeos sensibilizan a los bovinos, y estos montan una respuesta inmune inespecífica que da falsos positivos a la técnica de ELISA convencional. La especificidad de esta técnica varía si se trata de muestras provenientes de animales jóvenes o adultos; ya que los jóvenes poseen menos Ac con reacción cruzada (inespecíficos) que los adultos. El ELISA-u mejora la especificidad del ELISA convencional.

H₂: La utilización de absorbentes en la prueba de ELISA mejora la especificidad; y por ende la detección de animales infectados con Map. Puede utilizarse como alternativa al ELISA-u.

H₃: Las MA aisladas de la materia fecal, capaces de sensibilizar, presentan variaciones entre individuos, rodeos y establecimientos.

La metodología se orientó a resolver estos problemas del diagnóstico y a contribuir en el control de la enfermedad en los rodeos. Esto minimizaría las pérdidas económicas - productivas; ya que permitiría vender animales enfermos subclínicos, que aún conservan su valor de mercado en el frigorífico.

1.3.1 Diseño experimental:

Se trabajó principalmente sobre tres rodeos comerciales de la cuenca del río Salado, que previamente fueron diagnosticados como infectados con PTBC en base a test serológicos, cultivos y necropsias. Considerando que se trata de una enfermedad crónica, y que se trabajó sobre rodeos comerciales, se realizaron muestreos longitudinales y/o transversales según fue posible; ya que una vez que los animales se diagnostican como positivos suelen ser vendidos por los productores. Además, se realizaron muestreos transversales en otros establecimientos de la región, con el objetivo de obtener mayor representación en los resultados y poder hacer más abarcadoras las conclusiones.

De los animales bajo estudio se extrajeron muestras de sangre y de materia fecal del recto. Las muestras de suero sanguíneo se procesaron

por la técnica de ELISA-su y ELISA-u para calcular, posteriormente, el índice urea (IU). La sensibilidad y especificidad del ELISA-u se evaluó junto a la covariable edad. Las muestras de materia fecal fueron sembradas en medios de cultivo específicos para Map y MA. El desarrollo de colonias compatibles con Map fue interpretado como infección, mientras que el desarrollo de colonias de MA se consideró como un posible indicador indirecto de infección; ya que la confirmación de infección por estos agentes es dificultosa.

Los aislamientos MA se analizaron por técnicas moleculares (PCR-secuenciación), y se utilizaron como absorbentes en la técnica de ELISA. También, se utilizó como absorbente al *M. phlei*, tal como lo recomienda la bibliografía internacional (Yokomizo y col., 1991). Al exponer los sueros problema a estos absorbentes se pretendió neutralizar o eliminar los Ac de reacción cruzada con PTBC. Se compararon los resultados del ELISA con y sin absorbentes versus el ELISA-u, para así poder extraer conclusiones sobre la conveniencia de utilizar un procedimiento u otro.

2- MATERIALES Y MÉTODOS

“ Si sirves a la naturaleza, ella te servirá a tí”
(Confucio)



2.1 Rodeos estudiados:

Se realizaron muestreos longitudinales y transversales en diferentes rodeos de la provincia de Buenos Aires, ubicados dentro de la región pampeana, en la pampa deprimida. La misma se caracteriza por un relieve con escasa pendiente y suelos con deficiente infiltración, y generalmente alcalinos, que habitualmente permanecen con altos tenores de humedad durante el período otoño invierno. El muestreo longitudinal se concentró sobre animales de 3 establecimientos infectados endémicamente por PTBC, llamados “El Amanecer”, “Don Joaquín” y “Manantiales”, cuyas características se describen más abajo. La presencia de paratuberculosis fue demostrada a través de estudios de necropsias (Di Paolo, comunicación personal), chequeos serológicos con ELISA indirecto y cultivos (Alvarado

Pinedo y col., 2014; Di Paolo y col., 2018). La cantidad de muestreos realizados y la periodicidad con la que se tomaron las muestras fue variable, viéndose influenciada por las características comerciales de los animales estudiados, por las condiciones climatológicas, por las rutinas de manejo de los campos, etc. En todos los casos se realizaron al menos tres pruebas serológicas de ELISA por animal, con un intervalo entre sí no menor a 60 días y no mayor a 180. Los muestreos transversales se realizaron sobre establecimientos ubicados en la misma región geográfica que los anteriores, pero a partir de muestras que ingresaron al servicio de diagnóstico del CEDIVE.

A continuación, se describen las características principales de los rodeos analizados:

Establecimiento “El Amanecer”: El campo se encuentra ubicado sobre la ruta provincial 36, km 105, en la localidad de Vieytes, partido de Magdalena. Se accede al mismo por la mencionada ruta y dista aproximadamente 70 km desde la ciudad de La Plata. Cuenta con una superficie de 254 ha donde se realiza la cría de ganado vacuno de raza Aberdeen Angus conformado por un plantel de 200 vientres. En el establecimiento se realiza, además, un intenso programa de mejoramiento animal, por medio de Breed plan, por lo tanto, la reposición interna, es una característica para destacar.

Establecimiento “Don Joaquín”: Se encuentra ubicado sobre la ruta provincial 36, km 83.5, localidad de Bartolomé Bavio, Partido de Magdalena. Tiene una superficie de 426 ha sobre las que se desarrollan

actividades agrícolas y ganaderas. En el mismo se completan las actividades ganaderas de los otros campos de la misma firma. Se realiza la recría y engorde del ternero Holando buscando una salida productiva a este subproducto del tambo; también la recría y servicio de la vaquillona de la misma raza. La recría de reproductores Aberdeen Angus producidos en el establecimiento “El Amanecer” y la internada del ternero macho de dicho establecimiento. También se realiza agricultura para cosecha, con la tecnología de siembra directa, estableciéndose una rotación de cultivos con maíz, soja y trigo.

Establecimiento “Manantiales”: Se encuentra ubicado en el partido de Chascomús, distante unos 25 km de la ciudad homónima. Se trata de una unidad demostrativa de producción lechera, cuyo objetivo es medir, si es posible, lograr “niveles competitivos” de rentabilidad en la zona manejando un rodeo lechero sobre base pastoril con el uso de silajes, suplementación con granos y concentrados. La superficie productiva consta de 210 ha, con una producción diaria de 5000 Lt de leche.

2.2 Pruebas serológicas:

Es pertinente remarcar que las pruebas que se describen a continuación son las utilizadas por el CEDIVE para los diagnósticos de PTBC que de rutina ingresan al servicio. El ELISA que utilizamos fue desarrollado por el Dr. Gabriel Travería durante su tesis doctoral (Travería, 2003) con algunas modificaciones (Cox y col, 1991). Con esta técnica “*in house*” se procesan anualmente entre 7.000 y 10.000 muestras de sueros ingresados al servicio de diagnóstico. Por otro lado, el antígeno utilizado

para ambas pruebas (ELISA y AGID), también es de elaboración propia, y se describe en el párrafo siguiente, dentro del apartado de la técnica de ELISA. Las muestras utilizadas fueron sueros extraídos por centrifugación a 3000 rpm.

2.2.1 ELISA:

Para realizar la prueba de ELISA las placas se sensibilizan con 100 μ L por pocillo de antígeno formado por un lisado protoplasmático de *Mycobacterium avium* subsp *avium* (MAA) (cepa D4 ER). Como ya fue mencionado, la cepa se sembró en caldo glicerinado, y se incubó a 37°C hasta la formación de una película densa durante aproximadamente 2 meses. El soma bacteriano se filtró y se irradió a 25 kGry. Posteriormente se pasó por un disruptor de células Constant Systems® a una presión de 40.000 psi. El soma lisado se centrifugó a 10.000 rpm durante 20 minutos, el sobrenadante se usó como antígeno y se denominó lisado entero. El antígeno se diluyó 1:160 en solución buffer de carbonato 0,05 M (pH 9,6), y se colocaron 100 μ L por pocillo en placas Greiner Maxisorb®. Estas se incubaron toda la noche a 4°C. Luego se lavaron 3 veces con solución buffer de lavado (PBS con 0,05% de Tween 80). A continuación, 100 μ L de los sueros control y problema diluidos 1/180 en ELISA-PBS se incubaron a temperatura ambiente (21°C aproximadamente) durante 40 minutos, las placas se lavaron 3 veces y se transfirieron 100 μ L de conjugado anti Ig G bovina (Dako Denmark) en dilución 1:5.000 en ELISA-PBS. Después de incubar durante 40 minutos a temperatura ambiente, la placa se volvió a lavar 3 veces y se adicionó 100 μ L de solución de substrato conteniendo 2

mM de peróxido de hidrógeno y 0,4 mM 2,2-azino-bis (ácido 3-etil-benzotiazolina-6-sulfónico) (Sigma Chemical Co.) en 0,05 M de buffer citrato (pH 5). Aproximadamente después de 30 minutos se realizó la lectura de la densidad óptica con un espectrofotómetro (Labsystems Multiskan® Plus) con filtro de 405 nm. El suero control positivo se extrajo de un animal clínicamente afectado, del cual se aisló *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*. Se consideraron positivos a aquellos valores de PPRC (Porcentaje de positividad en relación con los controles) iguales o superiores al 70% (Yokomizo y col., 1970; 1983; 1984; 1986; 1991). Para establecer el punto de corte, “valor por encima del cual se considera a una muestra como positiva”, se utilizó la prueba de ROC.

$$\text{PPRC} = \frac{(\text{DO muestra} - \text{DO control negativo})}{(\text{DO control positivo} - \text{DO control negativo})} \times 100$$

PPRC= Porcentaje de positividad en relación con los controles.

DO= Densidad óptica del suero.

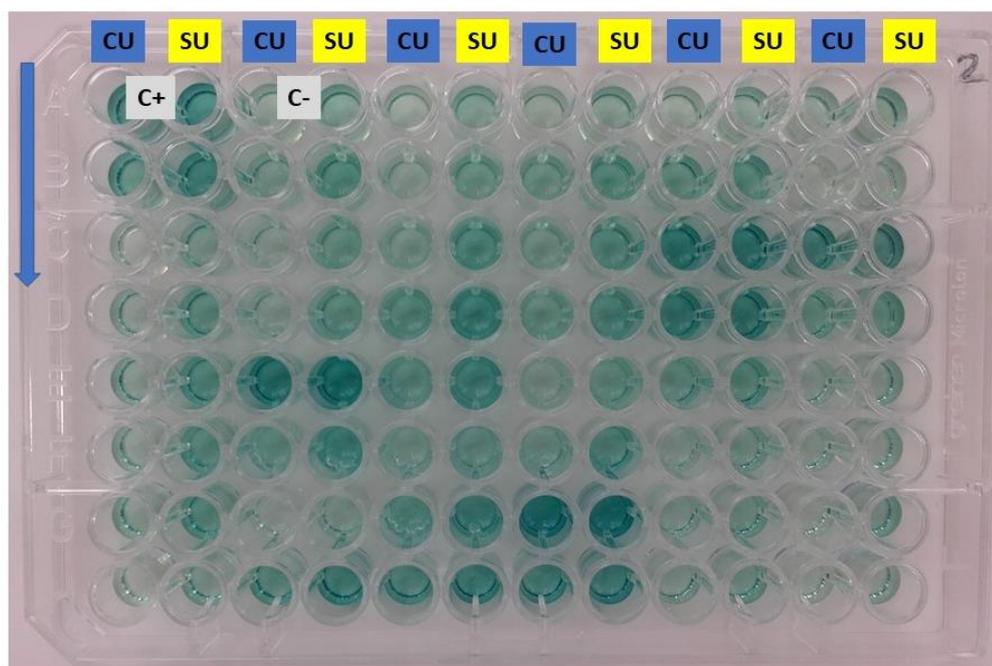
2.2.2 ELISA UREA:

Al protocolo del ELISA indirecto desarrollado en el CEDIVE (Travería, 2003), y descrito en detalle anteriormente, se le agregó la exposición de los sueros a la urea (Biopack®).

Cada suero se sembró por duplicado. A uno de los pares no se le agregó urea, mientras que el otro se incubó con urea en una concentración de 8M durante 4 minutos culminada la incubación para la unión Ag-Ac, y antes de agregar el conjugado. La solución de urea se preparó colocando 10 mL de solución de lavado PBS y agregándole 4,8 gr de urea (PM 60,024 g/mol). El IU se calculó sobre los promedios de las DO de los sueros sin urea y con urea, en base a la siguiente formula:

$$\text{Índice urea} = (\bar{x}\text{DO suero con urea} / \bar{x}\text{DO suero sin urea}) \times 100$$

Figura 11: Ejemplo de un esquema de siembra en la placa de ELISA. Obsérvese que en los pocillos donde actuó la urea generalmente se presentan menos coloreados, y por ende presentan menor valor de DO debido a la eliminación de reacciones Ag-Ac inespecíficas.



Referencias: CU: Pocillo con urea; SU: Pocillo sin urea; C+: Suero control positivo; C-: Suero control negativo. La flecha azul indica la dirección de siembra.

2.2.3 ELISA CON ABSORBENTES (*M. phlei* y *M. nonchromogenicum*):

Las cepas se obtuvieron por siembra en caldo glicerinado, posteriormente se procesaron como el antígeno holo lisado de MAA previamente descrito en el apartado 2.2.1. Se realizó una dilución de este antígeno en PBS (1/480). Luego se diluyeron los sueros problema (1/180) y se procedió a la ejecución del ELISA con las siguientes variantes: A) Pre-adsorción con *M. phlei* durante 30' (phlei30). B) Pre-adsorción con *M. phlei* durante 4' (phlei4). C) Pre-adsorción con *M. nonchromogenicum* durante 30' (nonchrom30). D) Pre-adsorción con *M. nonchromogenicum* durante 4' (nonchrom4) y E) Sin pre-adsorción con el uso de urea (CU).

Figura 12: Método de producción de antígeno para uso como inmunoabsorbente. En las botellas con caldo glicerinado se observa el desarrollo de *M. phlei* luego de la incubación.



2.2.4 AGID:

Sobre placas de Petri de 90 mm de diámetro x 15 mm de alto, se depositaron 17 mL de una solución tibia de agar noble al 1% en buffer boratos 0,9%. Las placas se dejaron enfriar hasta que tomaron consistencia firme. Posteriormente, con sacabocado de 5,3 mm de diámetro y 2,4 mm de separación se marcaron las rosetas de un orificio central y 6 periféricos. En el pocillo central se sembró el antígeno (35 μ L de antígeno protoplasmático de *MMA*) y en los periféricos el suero control positivo por triplicado, y los sueros problema flanqueados por los controles positivos (Sherman y col., 1984; 1989; 1990).

La incubación de las placas se realizó a 20°C (temperatura ambiente) en cámara húmeda. La lectura se realizó observando las líneas de precipitados, y corroborando la identidad entre líneas (SENASA) generalmente visibles a las 24 hs de incubación.

2.3 Tuberculinización con la PPD Aviar:

Con el objetivo de mejorar el porcentaje de diagnósticos y de aumentar el caudal de información de los animales estudiados se inoculó, en algunos casos, PPD aviar intradérmica para detectar hipersensibilidad retardada a PTBC. Se utilizó PPD Tuberculina Aviar DILAB-SENASA, a una concentración de 0,5 mg/mL, aplicada por vía intradérmica en pliegue anocaudal interno. La aplicación intradérmica se efectuó con una jeringa semiautomática McLintock; la cual carga hasta 20 dosis, de 0,1 mL. Para evitar errores de dosificación se descartó la primera y última dosis.

Previo a la inoculación se midió con calibre el espesor de ambos pliegues anocaudales. La lectura se realizó a las 72 hs post-inoculación midiendo el engrosamiento de dicho pliegue en el lugar de la aplicación (OIE, 2004).

2.4 Cultivo e Identificación de Map y MA:

Cultivos bacteriológicos: Se realizaron a partir de muestras de materia fecal extraídas del recto de cada individuo, con la utilización de un guante de exploración rectal (guante de tacto) descartable por animal.

Cultivo para Map: La descontaminación se realizó con cloruro de hexadecilpiridinio (HPC) a una concentración de 0,9%, el cuál elimina la mayoría de las micobacterias no patógenas, con escasos efectos dañinos sobre Map (Collins, 1996; Whipple y col., 1991). Previo a la siembra se realizó la descontaminación con el método de doble incubación (Stabel y col, 1997), colocando 2 g de muestra (materia fecal o tejido, según el caso) en 30 mL de agua destilada estéril. Las muestras posteriormente se agitaron y dejaron reposar por 30 minutos. Se extrajo 5 mL del sobrenadante y se colocó en 25 mL de solución de HPC, y se incubó en estufa a 37°C durante 24 hs. Pasado este lapso se centrifugó a temperatura ambiente durante 30 minutos a 1.000 rpm, se descartó el sobrenadante, se agregó 1 mL de mezcla antibiótica (ácido nalidíxico, vancomicina y anfotericina B) y se mantuvo durante 24 hs a 37°C. Para la siembra se utilizó el medio de cultivo de Herrold con el agregado de micobactina y un medio de cultivo líquido modificado a partir del medio Middlebrook M7H9C-

DIFCO/BD ® (Whittington y col., 2013). La principal modificación consistió en el agregado de agar al 0,185%. Además, se utilizó ácido nalidíxico y nistatina para evitar la contaminación (Romero y col., 2018). El medio se fraccionó de a 3 mL en tubos de vidrio de 7mL de volumen. Se inoculó 100 μ L de cada muestra en el medio líquido (Romero y col., 2018) y se incubó en estufa a 37°C.

Cultivo para MA: En las etapas iniciales del procesamiento de las muestras realizamos la descontaminación utilizando HPC a una concentración inicial del 0,9% según el protocolo de doble incubación (Stabel y col, 1997), tal como como se utilizó para el cultivo de MAP. Utilizando este protocolo de descontaminación, no obtuvimos buenos resultados, lo cuál coincide con estudios previos que demostraron que el HPC en concentración final de 0,75% inhibe el desarrollo de gérmenes contaminantes comunes e impide el crecimiento de micobacterias atípicas (Glanemann y col., 2004).

A consecuencia de lo mencionado en el párrafo previo, las materias fecales se sometieron a la descontaminación mediante el uso de ácido oxálico concentrado al 10% e hidróxido de sodio al 4%. De cada muestra se procesaron 2 gr de materia fecal en tubos de 50 mL de capacidad conteniendo 30 mL de agua destilada estéril. La mezcla se agitó durante 1-2 minutos hasta que la solución se observó homogénea. Posteriormente, los tubos se dejaron reposar a temperatura ambiente por 30 minutos. Pasado este tiempo, 5 mL del sobrenadante se volcaron en tubos de 50

mL, que contenían 5 mL de ácido oxálico estéril al 10%. Luego se incubó en estufa a 37°C durante 30 minutos. Pasada la incubación se centrifugaron a 1.000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante se descartó, y al culot se le agregó 5 mL de hidróxido de sodio al 4%. Se incubó nuevamente a 37°C durante 20 minutos. Luego se agregó una solución de fosfatos, con azul de bromotimol como indicador de pH (vira de amarillo “ácido” a verde “neutro” hasta azul “alcalino”) hasta que se observó color verde. Se volvió a centrifugar a 1.000 rpm durante 20 minutos más. Finalmente se volcó el sobrenadante, y posteriormente se le agregó 0,5 mL de agua destilada estéril, se homogeneizó bien y se realizó la siembra en medio de cultivo bifásico (ver anexos), con el agregado de agar al 1,5%, sin antibióticos y pH neutro. Esto se logró sustituyendo el fosfato de potasio monobásico por el fosfato de sodio dibásico; obteniendo así un medio con pH 7. Se incubaron en estufa a 37°C y se realizaron controles de contaminación mediante coloraciones de Ziehl Neelsen inmediatamente después la siembra para evaluar contaminación. Todos los cultivos se colorearon con Ziehl Neelsen antes de los 7 días para poder detectar las MA de crecimiento rápido. A los cultivos que por algún motivo no se los llegó a colorear antes de los 7 días, se les realizaron extendidos antes de ese tiempo y se colorearon posteriormente. Los cultivos fueron observados minuciosamente todas las semanas para detectar la aparición de colonias y evaluar sus características fenotípicas (pigmentación, color y tamaño). A las colonias se les realizaron coloraciones de Ziehl Neelsen para corroborar la presencia de BAAR y su disposición y tamaño. El no desarrollo dentro de

los 6 meses de la siembra se consideró negativo. En los que se observó desarrollo de BAAR se repicaron a un medio de cultivo sólido, sin micobactina (ver anexos).

2.5 Bacterioscopía e identificación fenotípica: Para la identificación presuntiva de las micobacterias ambientales aisladas se realizó coloración de Ziehl Neelsen.

La disposición, tamaño, pigmentación, y velocidad de crecimiento de los BAAR se utilizaron, junto con otras observaciones, para la clasificación presuntiva de la cepa aislada.

Los aislamientos fueron sometidos a diversas pruebas para su identificación fenotípica presuntiva dentro del algoritmo clasificatorio del género *Mycobacterium*. El primer paso consistió en agruparlas según la velocidad de crecimiento y la producción de pigmento en la oscuridad y en la exposición a la luz (Runyon, 1959). Posteriormente se utilizaron los procedimientos descritos por Bernardelli (2007) en el Manual “Clasificación Fenotípica de las Micobacterias”. Las pruebas utilizadas fueron las mencionadas a continuación: desarrollo en medio MacConkey sin cristal violeta, prueba de ureasa, reducción de nitratos, catalasa, tolerancia al NaCl al 5%, toma de hierro (transformación de citrato férrico amoniacal) e hidrolisis de Tween 80.

Figura 13 y 14: Desarrollo de colonias de MA en medio sólido. Obsérvese la presencia de colonias con pigmentos amarillos y anaranjados.

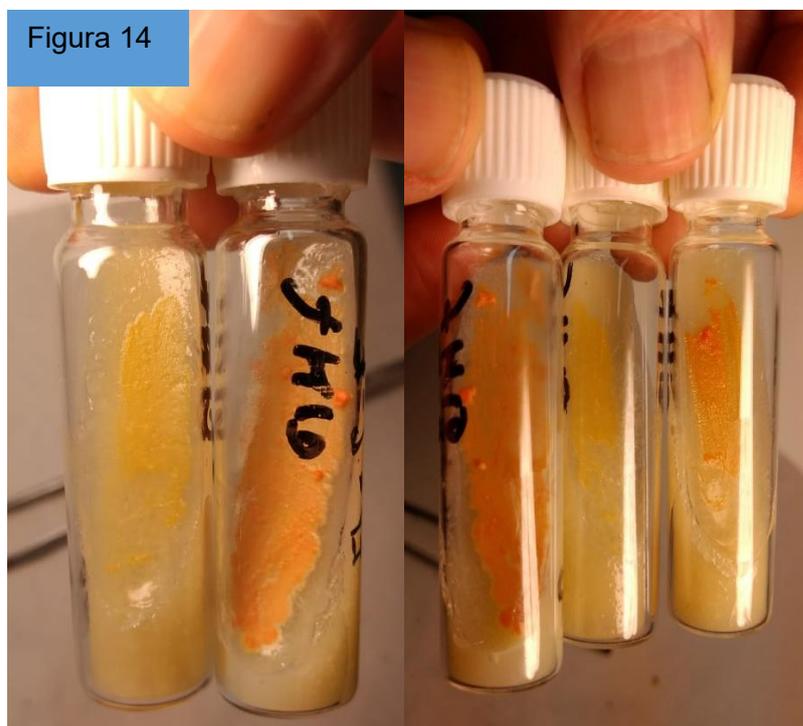
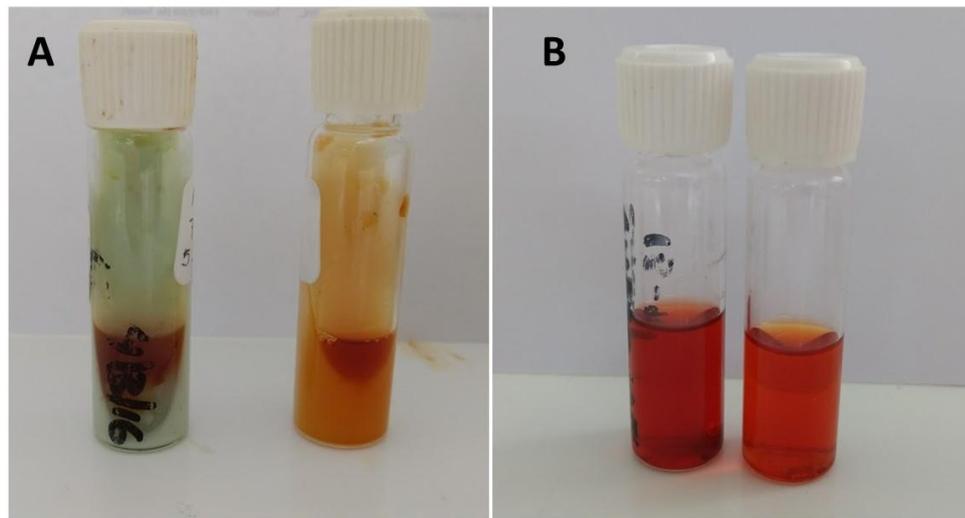


Figura 15: Dos de las pruebas utilizadas para la clasificación fenotípica de MA. La imagen A corresponde a la captación de Fe: El tubo de la izquierda es +, y el de la derecha el control. La imagen B corresponde a la Hidrolisis de Tween 80 negativa.



2.6 Identificación de cepas:

Se realizó en base la identificación de los genes que codifican para 16S ARNr y *hsp65*. Para la secuenciación de 16S ARNr se utilizó el método descrito por Kirschner y Bottger (1998), y para *hsp65* se utilizó el descrito por Telenti y col. (1993). Las secuencias de estos genes son útiles para diferenciar entre la mayoría de las micobacterias atípicas, sin embargo, no permiten hacer diferenciaciones de los miembros del complejo tuberculosis (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. canetti*, *M. africanum* y *M. microti*) y tampoco de las especies *M. kansasii*, *M. gastri*, ni las subespecies de la especie *avium*.

A las cepas aisladas se les extrajo el material genético por lisis térmica. Se tomó una colonia con el ansa y se re suspendió en 200 μ L de agua y se colocó en un tubo con tapa a rosca, posteriormente se incubó a 95°C durante 40 min. Luego se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 min, para finalmente extraer 5 μ L del sobrenadante para PCR.

La amplificación de 16S ARNr permite extraer un fragmento de 10.037 bp utilizando los primers 285 y 264, descritos por Kirschner y Bottger (1998), con el siguiente programa: desnaturalización de 96°C 3 minutos seguida luego por 35 ciclos de amplificación (1 minuto a 96°C, 1 minuto a 55°C, 2 minutos a 72°C) y 10 minutos de extensión final a 72°C.

La amplificación de *hsp65* permite extraer un fragmento de 440 pb, utilizando los primers Tb11 y Tb12, descrito por Telenti y col. (1993), con el siguiente programa: 96°C 3 minutos, seguida luego por 45 ciclos de amplificación (1 minuto a 96°C, 1 minuto a 60°C, 1 minuto a 72°C) y 10 minutos de extensión final a 72°C.

Posteriormente a la realización de PCR se realizó la corrida electroforética en gel de agarosa (20 min aprox.) para detectar la presencia de amplificación. Las muestras que no amplificaron fueron descartadas. Las que mostraron amplificación se purificaron con un kit comercial (GE Healthcare, General Electric. GFX PCR DNA and gel band purification kit®) para remover la Taq polimerasa y los dNTPs. La medición de la concentración de ADN se hizo por espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm con Nanodrop 2.000®. Las muestras que amplificaron para 16S ARNr se secuenciaron utilizando los primers directos y reversos, mencionados anteriormente, en el Instituto de Biotecnología de la Unidad de Genómica, del INTA Castelar.

Los cromatogramas de la secuencia directa, en primera instancia, y luego los de la reversa, se analizaron y corrigieron utilizando el programa

Chromas Lite (<http://chromas-lite.software.informer.com./2.0/>). Las secuencias obtenidas se copiaron en formato FASTA y se pegaron en el programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tolls/msa/clustalw2/>). Finalmente, una vez editadas las secuencias obtenidas con ambos primers se comparó con la base de datos.

Las muestras que amplificaron para *hsp65* fueron sometidas a la técnica de PRA (del inglés PCR-Restriction Enzyme Analysis), utilizando la enzima de restricción *HaeIII*. Para la separación de los fragmentos de restricción se realizó una corrida electroforética en gel de agarosa al 4%, utilizando como patrón de control al amplificado de 440 pb. Para determinar una aproximación a la especie identificada, se observó el tamaño aproximado de los fragmentos obtenidos y se comparó con el algoritmo descrito por Telenti y col. (1993).

2.7 Análisis estadístico

Las pruebas estadísticas utilizadas en esta investigación pertenecen principalmente a la llamada estadística frecuentista. Los análisis realizados partieron de la realización de observaciones principalmente transversales, sin embargo, en los casos donde fue posible, se analizaron datos recolectados de estudios longitudinales. Estos últimos resultan ser difíciles de llevar a cabo en rodeos comerciales como los aquí estudiados, debido a que los animales diagnosticados con la enfermedad se eliminan rápidamente de los establecimientos. Además, las condiciones climatológicas, socioeconómicas y de manejo, plantean inconvenientes adicionales.

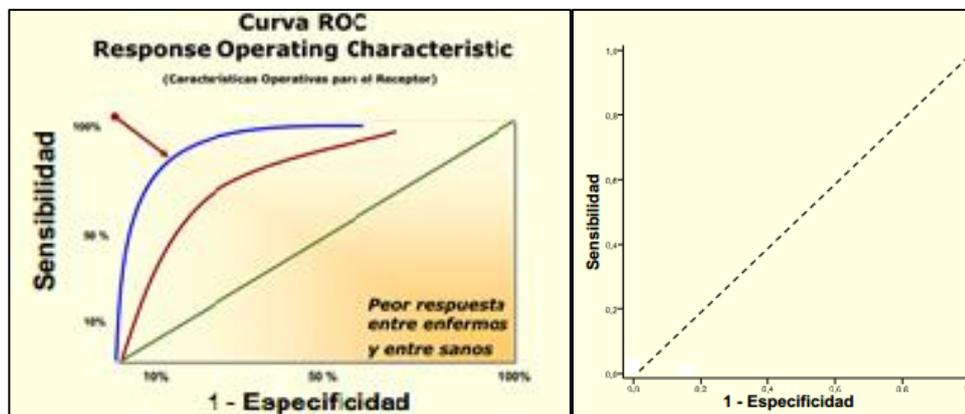
A continuación, se describen brevemente las principales pruebas estadísticas utilizadas en esta tesis.

2.7.1 Curvas de ROC:

En la teoría de detección de señales una curva ROC (acrónimo de Receiver Operating Characteristic, o Característica Operativa del Receptor) es una representación gráfica de la sensibilidad frente a (1 – especificidad) para un sistema clasificador binario según se varía el umbral de discriminación.

Otra forma de interpretar la curva ROC, es la representación de la razón de verdaderos positivos (VPR = Razón de Verdaderos Positivos) frente a la razón de falsos positivos (FPR = Razón de Falsos Positivos) también según se varía el umbral de discriminación (valor a partir del cual decidimos que un caso es un positivo). El uso de esta gráfica en diagnóstico de laboratorio consiste en evaluar pruebas diagnósticas en las que existe una variable dicotómica para clasificar casos y una variable cuantitativa, y se quiere averiguar el valor de corte que mejor clasifique a estos dos grupos.

Figura 16: Curvas ROC. La sensibilidad y la 1 - especificidad se expresan en porcentaje (Figura izquierda) o en valores entre el 0 y el 1 (Figura derecha). El valor máximo de sensibilidad y especificidad se encuentra en el extremo superior izquierdo (modificado a partir de Bargueño M y col., 1995).



Las curvas ROC son independientes de la prevalencia de la enfermedad en la población, permiten comparar y valorar los posibles puntos de corte de una prueba continua y permiten comparar la exactitud (eficiencia) de pruebas continuas alternativas, a mayor área bajo la curva mayor exactitud. La principal debilidad de este estadístico es que requiere contar con una prueba de referencia o *Gold Standard* de la enfermedad en la población a estudiar (Pfeiffer, 2002).

En resumen, para la elección entre dos pruebas diagnósticas distintas, será mejor aquella que muestre la mayor área bajo la curva (AUC). Esta área posee un valor comprendido entre 0,5 y 1, donde 1 representa un valor diagnóstico perfecto y 0,5 es una prueba sin capacidad discriminadora diagnóstica. Por ejemplo, un AUC para una prueba diagnóstica de 0,8 significa que existe un 80% de probabilidad de que el diagnóstico realizado a un enfermo sea más correcto que el de un individuo

sano escogido al azar. Se considera que una prueba posee una capacidad de discriminación aceptable cuando su AUC es superior a 0,7.

En esta tesis la curva ROC se utilizó para para determinar el punto de corte con mejor poder discriminativo del IU, con relación al *Gold Standard* (cultivo de Map). También, se utilizó para comparar las AUC de las pruebas de ELISA-su, ELISA-u e IU; para determinar cuál de las tres presenta el mayor poder discriminador para detectar paratuberculosis. El paquete estadístico utilizado fue el software IBM SPSS Statistics Base 22.0. La determinación del punto de corte se obtuvo a través del cálculo del índice de Youden, cuya fórmula es la siguiente:

Índice Youden: $J: \text{Especificidad} + \text{Sensibilidad} - 1$

$J: \frac{\text{Verdaderos positivos}}{\text{Verdaderos positivos} + \text{Falsos negativos}} + \frac{\text{Verdaderos negativos}}{\text{Verdaderos negativos} + \text{Falsos positivos}} - 1$
--

2.7.2 Análisis de correlación de Pearson:

Se utilizó para comprobar la asociación existente entre las variables cuantitativas continuas IU y densidad óptica. El resultado del análisis es un coeficiente de correlación que puede tomar valores entre -1 y +1. El signo indica el tipo de correlación entre ambas variables. Un signo positivo indica que existe una relación positiva entre las variables, un signo negativo indica que existe una relación negativa. Cuando las dos variables son independientes, el coeficiente de correlación es cero. La fuerza de la

relación lineal se incrementa a medida que el coeficiente de correlación se aproxima a -1 o a +1 (Alquicira, 2020).

Figura 17: Interpretación de los valores que entrega el coeficiente de correlación de Pearson. Extraído de *Cuellar y col; 2018*.



2.7.3 Prueba de χ^2 (X^2):

Este estadístico permite evaluar la existencia o no de asociación entre dos variables cualitativas. En esta tesis se analizó por el grado de independencia entre las variables cualitativas cultivo bacteriológico (positivo y negativo) e IU (alto y bajo). La prueba parte de la hipótesis de independencia entre las variables. En otras palabras, la H_0 (hipótesis nula), dice que las variables X e Y son independientes entre sí, por lo tanto, el rechazo de dicha hipótesis lleva a la aceptación de la H_a (hipótesis alternativa), que dice que existe asociación estadística significativa entre las variables.

A menor valor de X^2 , mayor grado de asociación; cuando la independencia entre variables es inexistente el valor es cero. Por el otro lado, a mayor valor de X^2 , mayor será la independencia. El nivel de significancia usado fue de $p = <0.05$ y se utilizó la corrección de YATES en

los casos donde al menos una de las frecuencias esperadas fue menor de 5.

2.7.4 Análisis de varianza (ANOVA):

Este estadístico parte del supuesto de que las medias de dos o más poblaciones son iguales. Compara las medias de la variable de respuesta en los diferentes niveles de los factores. La hipótesis nula establece que todas las medias de la población (medias de los niveles de los factores) son iguales mientras que la hipótesis alternativa establece que al menos una es diferente.

El procedimiento funciona comparando la varianza entre las medias de los grupos y la varianza dentro de los grupos como una manera de determinar si los grupos son todos parte de una población más grande o poblaciones separadas con características diferentes. Para realizar el ANOVA es primordial realizar previamente la verificación de la varianza. Se utilizó la prueba de Levene, con una significancia de $p = >0.05$, cuya interpretación permite aseverar que todas las muestras pertenecen a la misma población (no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones estándar, con un nivel del 95,0% de confianza). Al realizar el ANOVA se utilizó como variable de respuesta continua al IU, y como factor categórico al cultivo bacteriano, tomándose como nivel de significancia un valor $p = <0.05$.

2.7.5 Test de Friedman:

Es una prueba no paramétrica desarrollado por el economista Milton Friedman. Equivalente a la prueba ANOVA para medidas repetidas en la versión no paramétrica, el método consiste en ordenar los datos por filas o bloques, reemplazándolos por su respectivo orden. Al ordenarlos, debemos considerar la existencia de datos idénticos. La hipótesis nula que se contrasta es que las respuestas asociadas a cada uno de los "tratamientos" tienen la misma distribución de probabilidad o distribuciones con la misma mediana, frente a la hipótesis alternativa de que por lo menos la distribución de una de las respuestas difiere de las demás. Para poder utilizar esta prueba las respuestas deben ser variables continuas y estar medidas por lo menos en una escala ordinal.

2.7.6 Test de Wilcoxon:

Es una prueba no paramétrica para comparar el rango medio de dos muestras relacionadas y determinar si existen diferencias entre ellas. Se utiliza como alternativa a la prueba t de Student cuando no se puede suponer la normalidad de dichas muestras. Es una prueba no paramétrica de comparación de dos muestras relacionadas y por lo tanto no necesita una distribución específica. Usa más bien el nivel ordinal de la variable dependiente. Se utiliza para comparar dos mediciones relacionadas y determinar si la diferencia entre ellas se debe al azar o no (en este último caso, que la diferencia sea estadísticamente significativa). Se utiliza cuando la variable subyacente es continua pero no se presupone ningún tipo de distribución particular.

2.7.7 Análisis Bayesiano:

Los resultados obtenidos se analizaron, además de por estadística frecuentista, bajo la óptica de la estadística bayesiana. Esta posee como principal característica resaltar al muestreo por sobre el tamaño muestral; dicho en otras palabras, en la estadística frecuentista muchas veces el “valor P” o “diferencia significativa” está directamente influenciado por el tamaño de la muestra, lo que puede llevar a errores al momento de rechazar o no una hipótesis nula. Quizás una hipótesis rechazada por un valor p no significativo, podría ser aceptada si el tamaño de la muestra se aumenta. (Savage, 1957; Silva y Benavides, 2001) Bayes consideró sumamente importante a los antecedentes, o información previa asociada a la hipótesis sobre la que se desea trabajar. Su perspectiva se basa en tomar una muestra y hacer girar a su alrededor todas las ideas, hipótesis y parámetros. Esto nos da la ventaja de que comenzamos la investigación desde una evidencia (“la muestra”) y no desde una teoría. En base a lo mencionado se establece la “*probabilidad condicional*”, basada en que siempre existe algún conocimiento previo acerca del fenómeno a estudiar que vale la pena incorporar en el análisis (Bolstad, 2007).

La fórmula más simplificada del teorema Bayesiano es:

$$P(A/B) = P(A) \times P(B/A)$$

Aplicando esta teoría el investigador puede pasar de una probabilidad a priori o inicial, prueba de hipótesis o $P(H)$, de una hipótesis H a una probabilidad a posteriori o actualizada, $P(H|D)$, basado en una

nueva observación D. De la combinación de la “probabilidad a priori” que es subjetiva, con la “probabilidad a posteriori” (Verosimilitud o Likelihood), que es objetiva, el investigador puede enunciar un juicio de probabilidad ajustado a su nueva información sobre el fenómeno estudiado.

La estadística Bayesiana utiliza intervalos de confianza en lugar de un valor-p. Esto permite asegurar que, si se repitiera muchas veces el muestreo, utilizando el mismo procedimiento, el parámetro estudiado estaría incluido en 95 de cada 100 intervalos. Este fenómeno se conoce como intervalo de credibilidad bayesiana al 95% (ICB 95%) (Burton, 1994).

Se utilizaron los conceptos de análisis Bayesiano para analizar y comparar algunos parámetros de las técnicas diagnósticas, en particular el ELISA-su, el ELISA-u y el IU. Se realizaron cálculos de sensibilidad, especificidad y capacidad predictiva. En la tabla 2, se pueden ver algunos parámetros de importancia para el análisis de las características operativas de las técnicas de diagnóstico que se plantean en una tabla de contingencia de 2 x 2.

Tabla 2: Tabla de contingencia para evaluar una técnica diagnóstica con relación al *Gold Standard*.

		Gold standard		Total
		Enfermo	Sano	
Prueba diagnóstica	Positivo	Verdaderos positivos (VP) (a)	Falsos positivos (FP) (b)	N° positivos
	Negativo	Falsos negativos (FN) (c)	Verdaderos negativos (VN) (d)	N° negativos
		N° Enfermos	N° Sanos	Total

Sensibilidad: Es la proporción de individuos enfermos en los que la prueba es positiva y se obtiene a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Sensibilidad} = a/(a+c)$$

Especificidad: Es la proporción de individuos sanos en los que la prueba es negativa y se obtiene de la siguiente fórmula:

$$\text{Especificidad} = d/(b+d)$$

Valor de predicción positivo: Es la capacidad que tiene una prueba, cuando es positiva, de predecir que el paciente tiene la enfermedad y se calcula a partir de la fórmula: $\text{VPP} = a/(a+b)$

Valor de predicción negativo: Es la capacidad de una prueba diagnóstica, cuando es negativa, de predecir que el paciente no tiene la enfermedad y calcula a partir de la siguiente fórmula: $\text{VPN} = d/(c+d)$.

Razón de Verosimilitud (Likelihood Ratio): Se define como la razón entre la posibilidad de observar un resultado en los pacientes con la enfermedad en cuestión versus la posibilidad de ese resultado en pacientes sin la patología (Silva Fuente-Alba y Molina Villagra, 2017). Su resultado es sumamente útil para que el clínico pueda definir con mayor certeza si el animal presenta la enfermedad o no. Puede calcularse tanto para los resultados positivos como para los negativos a través de las siguientes fórmulas:

LR+= Sensibilidad / (1-Especificidad)

Indica cuántas veces aumenta la posibilidad de estar enfermo, que no estar enfermo, ante un resultado positivo (+).

LR- = (1-Sensibilidad) / Especificidad

Indica cuántas veces aumenta la posibilidad de estar enfermo, que no estar enfermo ante un resultado negativo (-).

3. RESULTADOS



3.1 Análisis de resultados serológicos:

Se analizaron los resultados de las dos técnicas serológicas utilizadas (ELISA-su y ELISA-u) y, en algunos casos se utilizó el IU como un tercer factor de análisis.

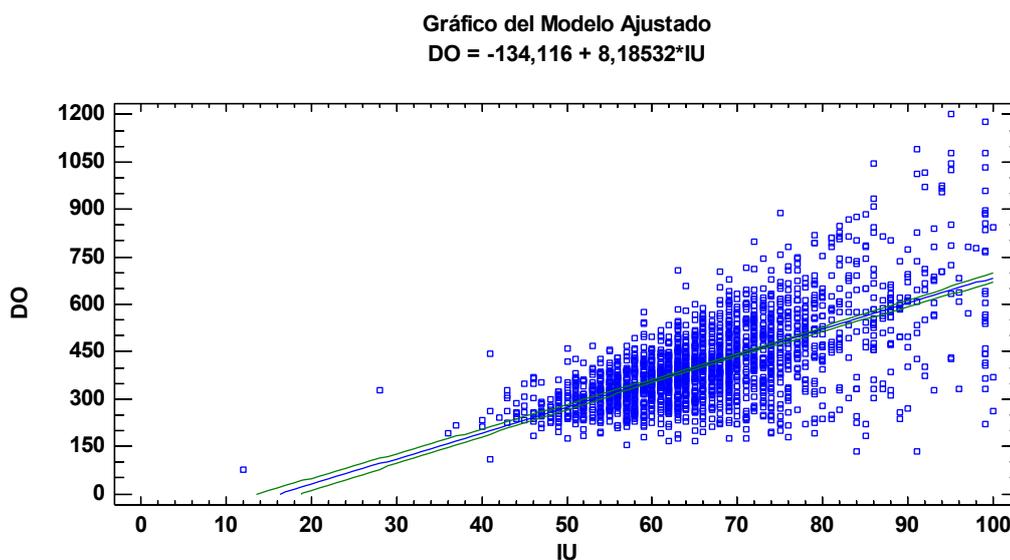
3.2 Analisis de prevalencia y antecedentes sanitarios:

Los establecimientos en los que se realizaron seguimientos longitudinales registran en nuestra casuística numerosas pérdidas producto de la enfermedad durante años. Con fines del desarrollo de esta tesis se estimó la seroprevalencia de PTBC en los rodeos endémicos, hallándose valores de 3,2% para el Est. “El amanecer”, 3,4% para el Est. “Don Joaquín” y 16,4% para el Est. “Manantiales.

3.3 Análisis de correlación:

En primera instancia se analizaron 2134 muestras de suero de la base de datos, provenientes de 8 establecimientos ganaderos comerciales, 7 campos de cría y 1 tambo. Se utilizó el software analítico Statgraphics Centurión XVIII (<https://statgraphics.net/descargas/>) para obtener la correlación de Pearson. Se obtuvo un coeficiente de correlación de 0,64 ($p= 0,01$) y un R-cuadrada igual a 41,6%, lo que indica una relación moderadamente fuerte entre las variables DO e IU.

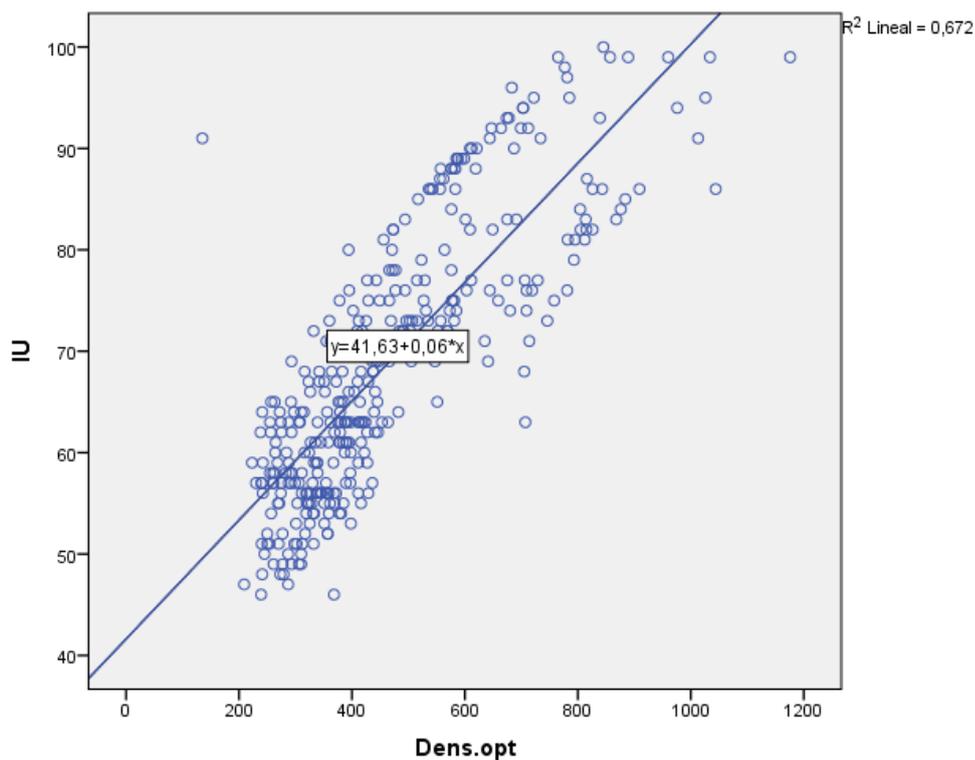
Figura 18: Correlación de Pearson. Análisis de asociación entre la densidad óptica (DO) y el índice urea (IU) de 2134 sueros analizados por ELISA.



Cuando se realizó el mismo análisis sobre las muestras serológicas de los tres establecimientos con PTBC endémica estudiados, y que estuvieron asociadas a un cultivo bacteriológico, ya sea con resultado positivo o negativo a PTBC, se halló una mayor correlación (coeficiente de

correlación de 0,81 ($p=0,01$) y un R-cuadrada igual a 67,1% entre las variables.

Figura 19: Correlación de Pearson. Análisis de asociación entre la densidad óptica (DO) y el índice urea (IU) de sueros con cultivo negativo o positivo a PTBC.



La correlación obtenida a partir del análisis de cada uno de los tres establecimientos con paratuberculosis endémica estudiados puede verse en la siguiente tabla y gráficos.

Tabla 3: Coeficiente de correlación por establecimiento con infección endémica

	“El amanecer”	“Don Joaquín”	“Manantiales”
Coef. De correlación	0,68	0,43	0,73
R-Cuadrada (%)	47,2	18,7	54

Figura 20: "El Amanecer". Correlación entre DO e IU.

Gráfico del Modelo Ajustado
 $DO = -163,455 + 8,92752 \cdot IU$

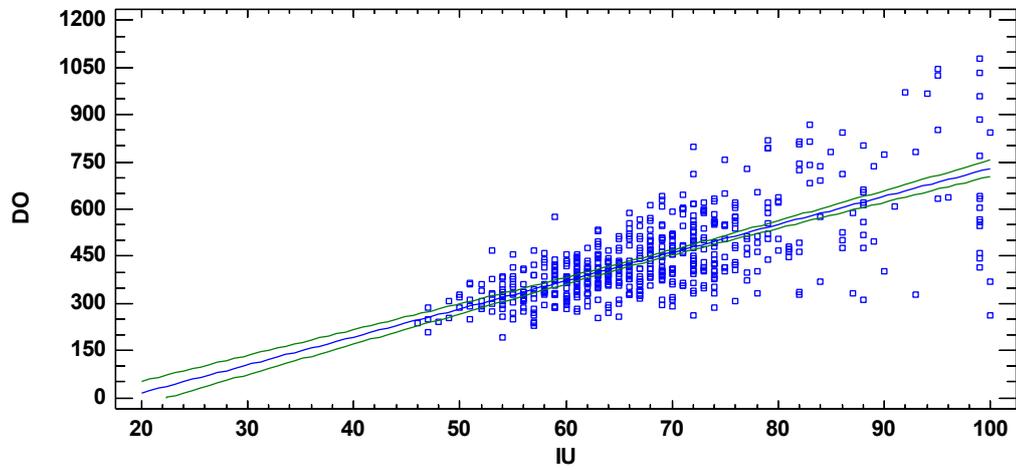


Figura 21: "Don Joaquín". Correlación entre DO e IU.

Gráfico del Modelo Ajustado
 $DO = 52,6055 + 5,06028 \cdot IU$

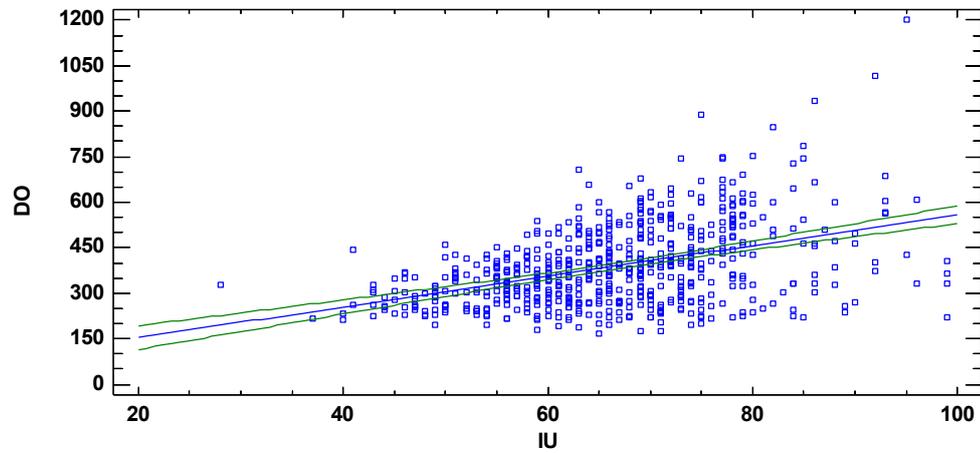
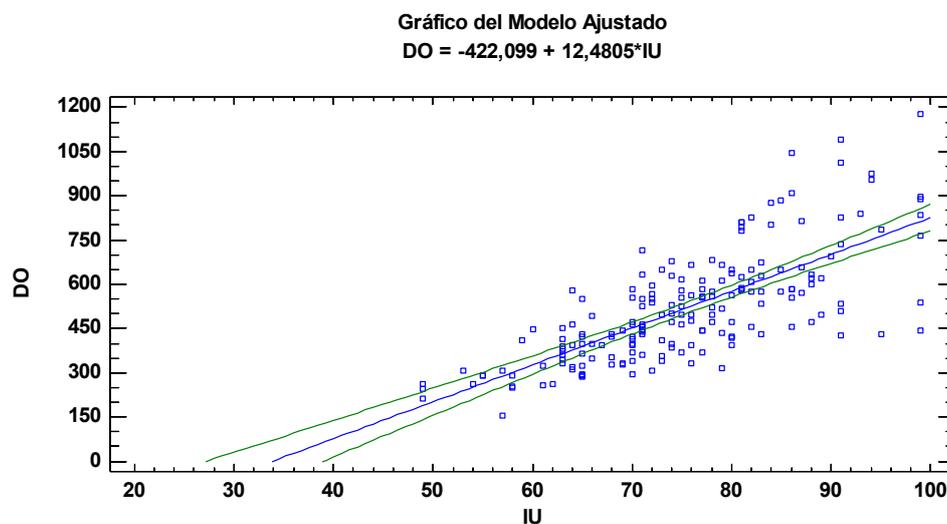


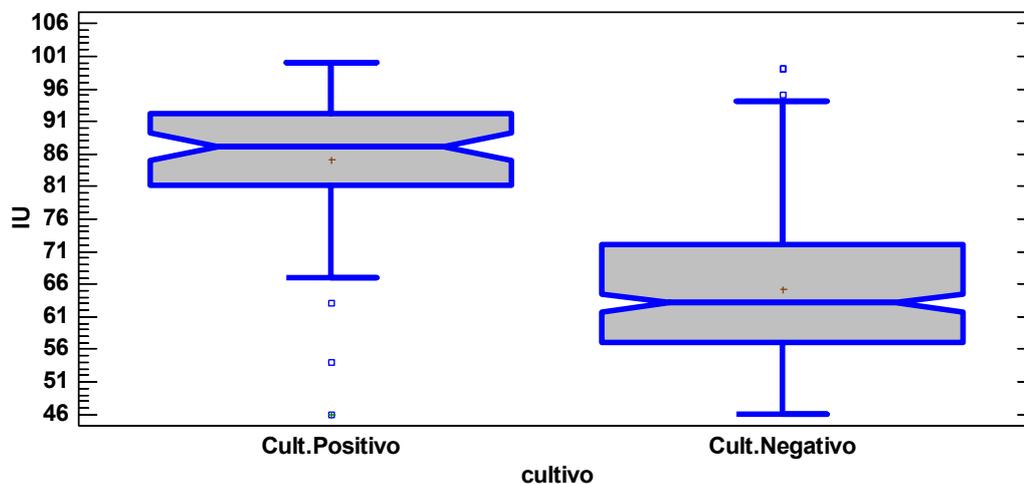
Figura 22: "Manantiales". Correlación entre DO e IU.



3.2 Análisis de varianza (ANOVA):

Se analizaron los resultados de 347 cultivos (19,3% positivos y 80,6% negativos) para Map utilizando el software analítico Statgraphics Centurión XVIII. Se realizó el ANOVA para evaluar la hipótesis de que la desviación estándar de IU dentro de cada uno de los 2 niveles de cultivo fuera la misma. Se utilizó la prueba de Levene's para la verificación de la varianza ($p=0,34$). El ANOVA arrojó diferencias significativas ($p<0,01$) con 95% de confianza entre la media de IU para los dos niveles de cultivo. Ver gráfico.

Figura 23: Gráfico de caja y bigotes que permite observar las diferencias estadísticas significativas con relación al IU entre los grupos cultivo positivo y negativo a PTBC.



A través del estadístico χ^2 se contrastó la hipótesis (H_0) de que las variables cultivo e IU (dicotomizada por punto de corte) sean independientes, con la hipótesis alternativa (H_1) de que estas variables estén relacionadas. Se obtuvo un valor de X^2 : 128,12 ($p < 0,000$) lo que permite asegurar la asociación existente entre el IU alto y el cultivo positivo.

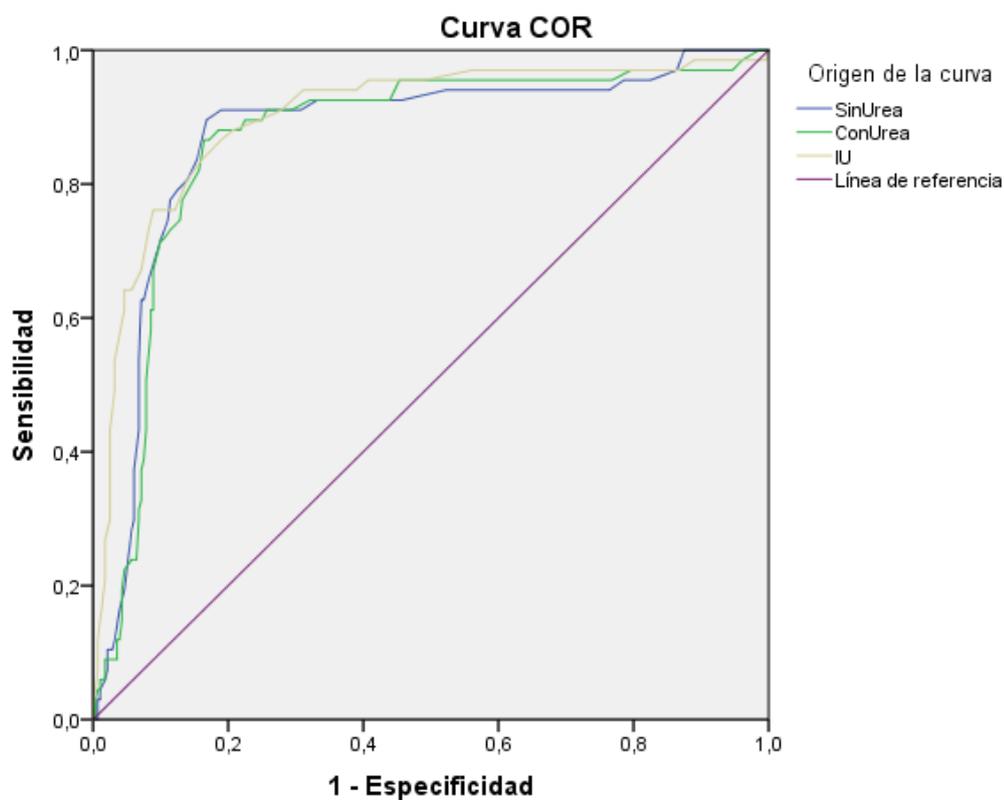
3.4 Análisis de punto de corte para IU:

Con el objetivo de establecer un punto de corte de IU para los distintos niveles de sensibilidad y especificidad con relación al cultivo bacteriológico, se analizaron los resultados de 347 cultivos (67 positivos y 280 negativos), utilizando el paquete pROC (Estadística con R Versión 3.5.3).

A continuación, se observan las áreas bajo la curva obtenidas, con un IC 95%, para ELISA-su, ELISA-u e IU. Los resultados fueron 0.90 (0,85-

0,94) para IU; 0.87 (0,81-0,92) para ELISA-su y 0.86 (0,81-0,91) para ELISA-u. Mediante el estadístico De Long's test no se observaron diferencias significativas entre las AUC para ELISA-u e IU ($p= 0.13$) ni para ELISA-u y ELISA-su ($p= 0.69$).

Figura 24: Curva ROC (=COR) donde se observan las AUC (áreas bajo la curva) del ELISA-u, ELISA-su y del IU.



A partir de la curva ROC se estableció un punto de corte operativo que pueda discriminar entre muestras con IU "alto" de "bajo". Para esto se utilizó el índice de Youden, con el cual se obtuvo un valor de IU= 80, para una sensibilidad de 0.76 y una especificidad de 0.91.

Tomando como referencia el valor de IU=80 y de DO ≥ 65 para ELISA-u y ELISA-su se clasificaron los sueros de forma dicotómica en “alto” y “bajo” con relación al cultivo positivo o negativo en una tabla de 2 x 2, y se calcularon las características operativas de las técnicas diagnósticas. Los resultados para un ICB del 95% pueden observarse en la siguiente tabla 4.

Tabla 4: Características operativas y predictivas de las técnicas.

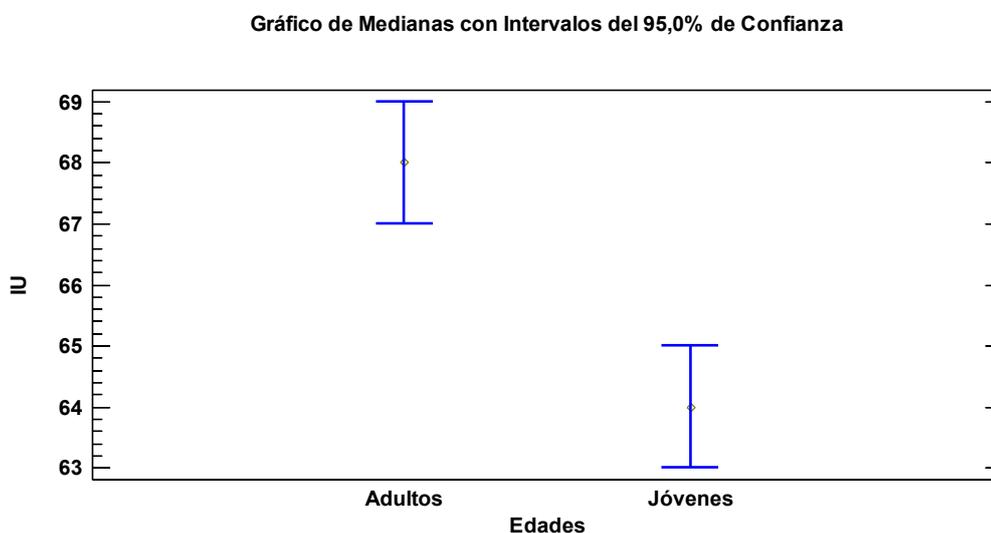
	ELISA-u	ELISA-su	IU
Sensibilidad	58,2 % (46,4-70)	81,1 % (80,3-95,8)	76,1 % (65,9-86,3)
Especificidad	91,4 % (88,1-94,7)	83,9 % (79,6-88,2)	89,6 % (86,1-93,2)
VVP	61,9% (49,9-93,6)	56,7% (47,2-66,5)	63,8% (53,2-74,3)
VPN	90,1% (86,7-93,6)	96,7% (94,5-99)	94 % (91,2-96,9)
LR+	6	5	8
LR-	0,46	0,22	0,26

Además, se analizó el Odds Ratio para IU. En otras palabras, se evaluó si el IU actúa como posible factor de riesgo en la PTBC utilizando el software libre Working in Epidemiology (<http://www.winepi.net/sp/index.htm>). El Odds, con un nivel de confianza del 95%, arrojó un valor de 28 con un intervalo que varía entre 13.97 y 54.49 por lo que se puede considerar como un factor de riesgo obtener un resultado alto de IU en la PTBC bovina.

Otra variable analizada fue la edad con relación al IU. Se trabajó bajo la Ho de que el IU como factor de riesgo no se relaciona con la edad de los bovinos. Como la distribución de los datos no se adaptó a una distribución normal, se utilizó el estadístico de Kruskal Wallis. Ambas variables se

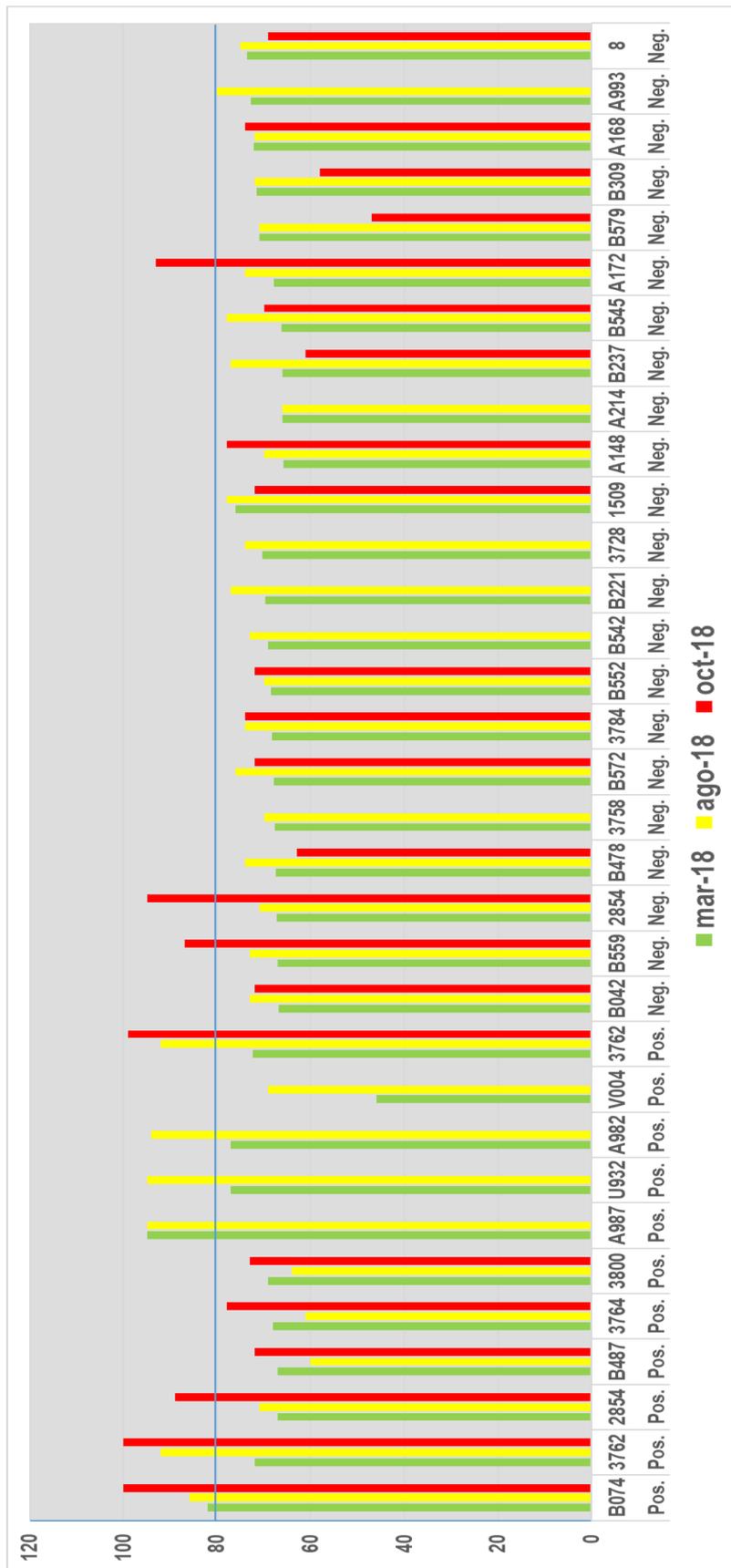
dicotomizaron, conformándose los grupos IU (alto/bajo) y edad (joven ≤ 24 meses/adulto >24 meses). Se hallaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0.00$) con relación al IU entre los grupos etarios, siendo más alto en los adultos que en los jóvenes.

Figura 25: El gráfico de medias permite ver la diferencia existente en el valor de IU con relación a la edad de los bovinos estudiados.



Cuando se realizó el seguimiento longitudinal de los animales pudo observarse que aquellos que resultaron positivos al cultivo para Map presentaron, en su mayoría, valores de IU en ascenso durante los sucesivos muestreos y generalmente con valores superiores al punto de corte ($IU \geq 80$). Los animales que resultaron negativos al cultivo bacteriológico tuvieron valores de IU por debajo del valor de corte.

Figura 26: Seguimiento serológico (ELISA) longitudinal de bovinos expuestos a campos con PTBC endémica.



Referencias: En el eje vertical se observa el valor del IU, mientras que en el horizontal se presentan los individuos categorizados como positivos (Pos.) y negativos (Neg.) al cultivo para Map. Las columnas agrupadas representan los meses en los que se realizaron los muestreos. La línea azul continúa marca el punto de corte de IU.

La tabla siguiente muestra cómo se comportaron los animales muestreados con relación al conjunto de técnicas diagnósticas utilizadas en cada caso. Algunos de los individuos utilizados en el ejemplo son los mismos que se utilizaron en el gráfico anterior, donde se analizó la variación del IU.

Tabla 5: Combinación de técnicas diagnósticas para PTBC utilizadas en el seguimiento longitudinal en los rodeos bajo estudio.

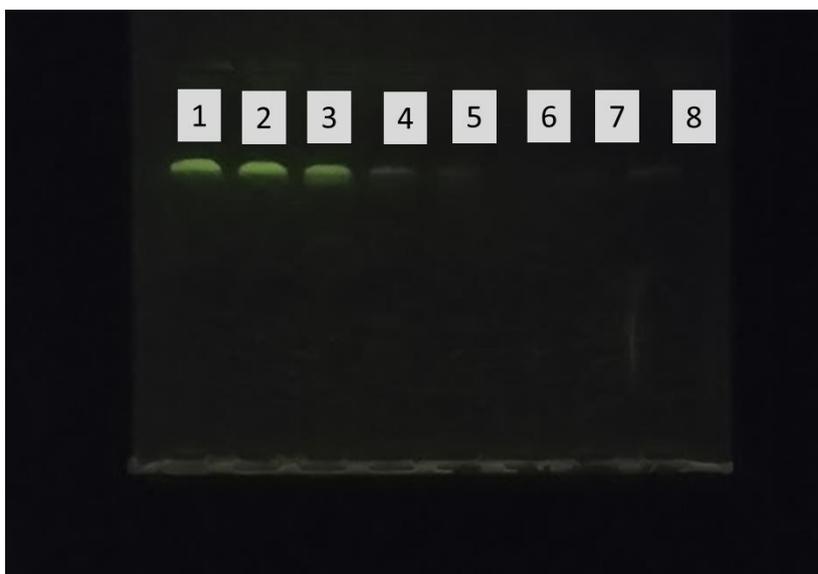
RP	Feb.17	Oct.17	Feb.18	Marz.18	Jun.18	Agost.18	Oct.18	Nov.18	Obs.
A982	-	E+; PPD+(3mm)	-	E+; PPD-; IU77 Cult. y PCR+	-	E+; IU 94; AGID+	-	-	Nació 2013
A111	-	E-; PPD-	-	E+; PPD-; IU63 Cult. y PCR+	-	-	-	-	Nació 2015
U932	-	E-; PPD-	-	E+; PPD-; IU77 Cult. y PCR+	-	E+; IU95; AGID+	-	-	Nació 2014
V004	-	E-; PPD-	-	E-; PPD-; IU46; Cult. y PCR+	-	E+; IU69; AGID+	-	-	Nació 2014
4942	E+	-	E+; Cult.+; AGID+	-	E+; IU100; Cult.+; AGID+	-	-	-	Nació 2012
4971	E+	-	E+; Cult.+	-	E+; IU 81; Cult.+; AGID+	-	-	-	Nació 2012 (Flaca, con diarrea) Nació 2012. Preñez avanzada en Jun. 2018 Buena CC. Sin signos. Nació 2012
4857	E+; PPD-	-	E+; AGID-	-	E-; IU 72; Cult.+	-	-	-	
4880	E-; PPD-	-	E-; PPD-	-	E (sosp.); IU88	-	-	E+; IU81 AGID-	
5012	E-; PPD-	-	E-	-	E (sosp.); IU89	-	-	E (sosp.); IU85	Nació 2015
3762	-	E-; PPD+(4mm)	-	E-; PPD-; IU72	-	E+; PPD-; IU92	E+; PPD-; IU100	E+; PPD-; IU100. Cult.+	Nació 2012
B021	-	E-; PPD-	-	E+; PPD-; IU86	-	E+; IU92; AGID+	-	-	Nació 2013. Toro.

Referencias: E (+ o -): ELISA positivo o negativo; PPD (+ o -): Reacción a tuberculina aviar positiva o negativa; Cult (+ o -): Cultivo para Map; PCR (+): Reacción en cadena de la polimerasa positiva; AGID (+ o -): Inmunodifusión en gel de agar; IU: índice urea.

3.5 Aislamiento e identificación de micobacterias atípicas (MA):

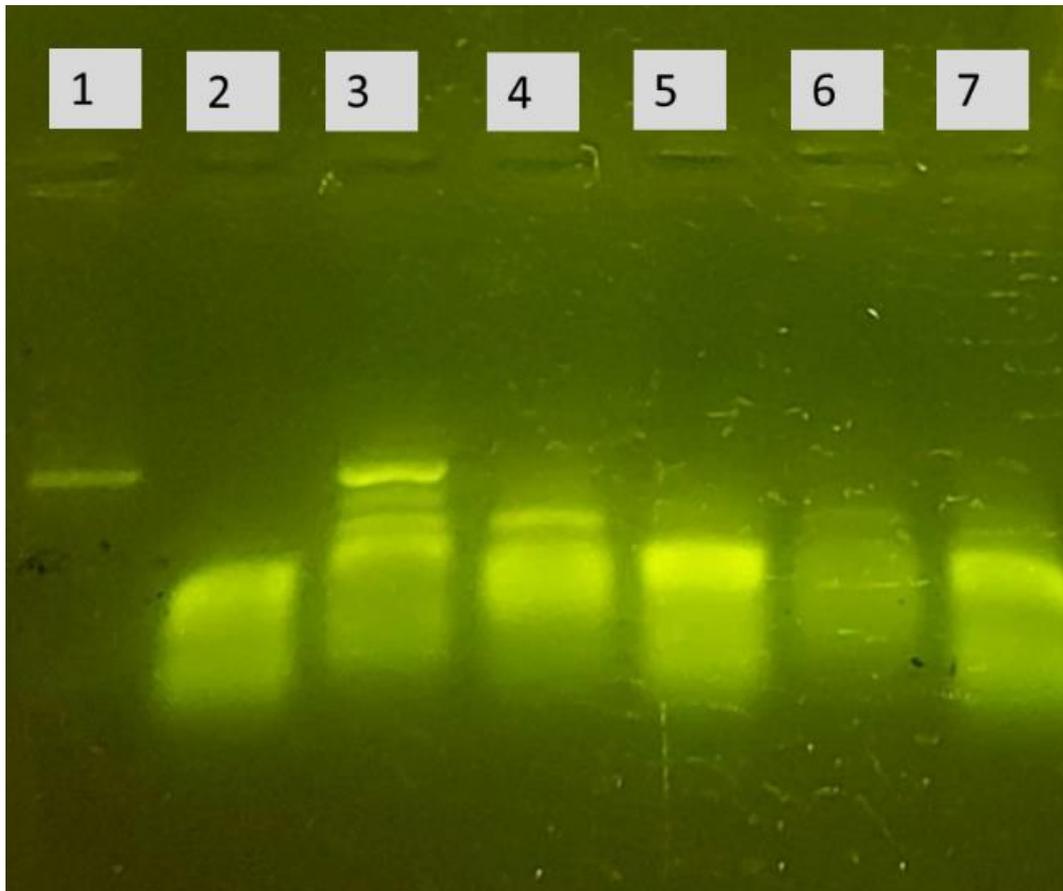
A partir de las 222 (100%) muestras de materia fecal procesadas para aislamiento bacteriano, se observó desarrollo de BAAR en 93 (42%). Dentro de estas, 2 (2%) aislamientos se correspondieron con *Streptomyces spp.* y *Nocardia spp.* Dentro de las micobacterias, 22 (24%) cepas mostraron crecimiento rápido, mientras que 69 (76%) fueron de crecimiento lento. La identificación por secuenciación génica se realizó sobre 14 (15%) aislamientos, mientras que sobre otras 14 (14%) cepas se realizó una clasificación presuntiva basada en identificación del gen *hsp65* y digestión enzimática (PRA). La selección se realizó por el orden cronológico del aislamiento, la calidad del cultivo, la facilidad de repique y las características fenotípicas del aislamiento (características de la colonia, pigmentación, etc).

Figura 27: Amplificación (PCR) de *hsp65* (Telenti y col., 1993).



Referencias: Los números 1, 2 y 3 muestran el producto de amplificación del gen *hsp65* (440 bp). La muestra 4 muestra amplificación débil, no apta para digestión enzimática, mientras que las muestras 5, 6, 7 y 8 son negativas.

Figura 28: Digestión del producto de amplificación del gen *hsp65*, con enzima de restricción *HaeIII*.



Referencias: Calle 1, fragmento sin digerir (440 bp). Calle 2 a 7 fragmentos digeridos. Notese la similitud en el tamaño de los fragmentos entre las calles 2, 5 y 7; mientras que las calles 3 y 4 se observan diferentes productos de digestión. La calle 6 muestra un patrón indefinido.

En la tabla siguiente pueden observarse los pasos utilizados para la clasificación fenotípica de los aislamientos y la posterior secuenciación génica para la clasificación a través de 16S ARNr.

Tabla 6: Detalle del procedimiento de aislamiento y clasificación de MA.

RP	T° de crecimiento		Medio de cultivo		Pruebas bioquímicas					Iden. De especie por BLAST (% de similitud)			
	29°C	37°C	Lowenstein jensen	Middlebrook	Pigmento	Velocidad de crecimiento	Maccconkey sin cristal violeta	Urea	Reducción de nitratos		Tolerancia al ClNa 5%	Toma de hierro	Tween 80
A147	+	+	+	+	N	R	+	+	+	-	-	-	M. chelonae (100)
A361	+	-	-	+	P	L	*	-	-	-	*	+	M. engbaekii (100)/ M. nonchromogenicum (98)
A127	+	+	+	+	N	L	*	-	-	-	*	+	M. nonchromogenicum (99)
A242	+	+	+	+	N	L	*	-	-	-	*	+	M. nonchromogenicum (100)
A243	+	+	+	+	N	L	*	-	-	-	*	+	M. nonchromogenicum (99)
A227	-	+	+	+	N	L	*	-	-	-	*	+	M. nonchromogenicum (99)
A309	+	*	+	+	N	L	*	-	-	-	*	+	M. engbaekii (99)/ M. nonchromogenicum (98)
A161	+	*	+	+	N	L	*	-	-	-	*	+	M. nonchromogenicum (98)
4723	+	+	+	+	N	L	*	-	-	-	*	+	M. engbaekii (99)/ M. nonchromogenicum (98)
12-140	-	+	+	-	P	R	+	*	+	-	+	+	M. smegmatis (99)
12-141	+	+	+	+	P	L	*	-	-	-	*	+	M. engbaekii (100)
22-331	+	-	+	+	N	R	+	+	-	-	-	-	M. chelonae (100)
280	+	+	+	+	N	L	*	-	-	-	*	+	M. nonchromogenicum (100)
706	+	-	+	+	N	R	+	*	+	+	*	*	M. Fortuitum (100)

Referencias: RP: Registro personal. +: Desarrollo o reacción positiva. -: No desarrollo o reacción negativa. *: No realizado.
[BLAST: Herramienta básica de búsqueda de alineación local \(nih.gov\)](#)

3.6 Comparación del uso de urea e inmunoabsorbentes en la técnica de ELISA.

El objetivo de este experimento fue contrastar el uso del agente caotrópico (urea) con los inmuno-absorbentes (*Mycobacterium phlei* y *Mycobacterium nonchromogenicum*) con relación a la mejora de la especificidad y costos operativos. Se trabajó con 90 sueros provenientes de un rodeo endémico a PTBC. Se absorbieron los sueros con un lisado protoplasmático de *M. phlei* y *M. nonchromogenicum* durante 4' y 30' en cada caso. La urea a concentración 8M se aplicó durante 4' previo al agregado del conjugado, en los sueros sin pre-absorción. Se utilizó el test de Shapiro en cada uno de los grupos, determinando la falta de normalidad ($p < 0.05$), se aplicó el test de Friedman observándose diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p < 0.05$). Como *post-hoc* se utilizó la prueba de Wilcoxon, observándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre el grupo con urea (CU) y los grupos de inmuno-absorbentes con los dos tiempos de absorción. Entre los grupos con inmuno-absorbentes solo se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre *nonchrom*4' y ambos tiempos de inmunoabsorción con *M. phlei*. Los gráficos siguientes muestran que la urea presentó la mayor capacidad de eliminación de reacciones Ag-Ac inespecíficas con relación a los inmuno-absorbentes, disminuyendo significativamente el número de falsos positivos.

Figura 27: Comparación entre el uso de urea e inmunoabsorbentes (*M. phlei* y *M. nonchromogenicum*) en el ELISA de PTBC.

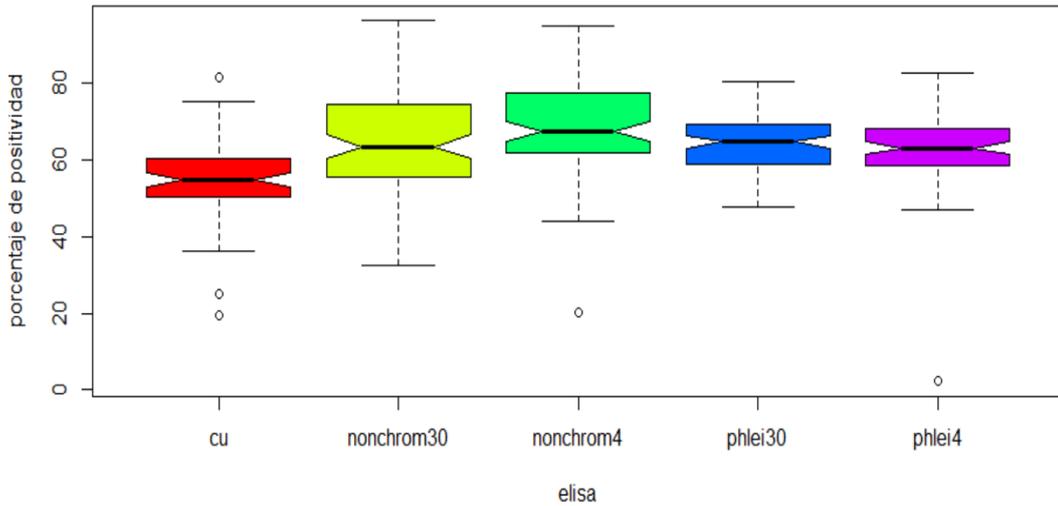


Figura 28: Comparación entre reactantes positivos y negativos (%) con el uso de urea e inmunoabsorbentes (*M. phlei* y *M. nonchromogenicum*) en el ELISA de PTBC.

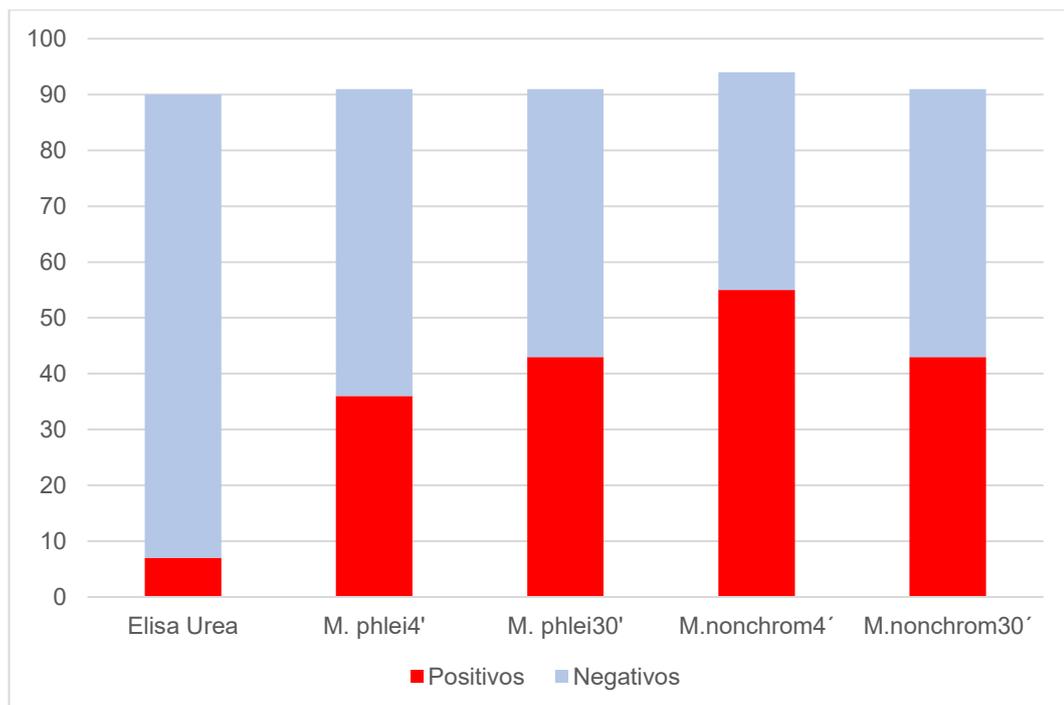


Tabla 7: Valores de sensibilidad, especificidad y % de falsos positivos en las diferentes variantes del ELISA. Obsérvese la mejora en la Es. obtenida con el uso de la urea.

Variante del ELISA	Se.	Sp.	% FP
ELISA-CU	50% (10% - 90%)	95% (91% - 99%)	5
Noncrom30´	67% (29%, 100%)	56.0% (45% - 66%)	54
Noncrom4´	66% (28% - 100%)	41% (31% - 52%)	41
Phlei30´	67% (30% - 100%)	54% (43% - 64%)	34
Phlei4´	66.7% (28% - 100%)	56 % (45% - 66%)	43

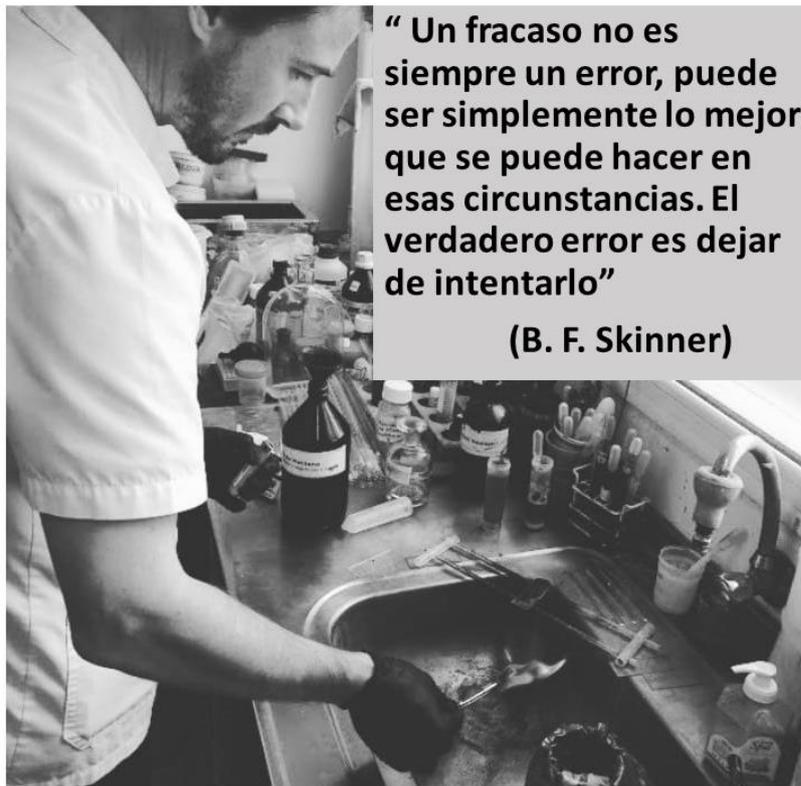
Referencias: Se: Sensibilidad; Sp: Especificidad; FP: Falsos positivos.

3.7 Evaluación de ELISA-u con relación a diferentes antígenos en sueros de bovinos con PTBC y TBC:

Se analizaron con ELISA-u 6 sueros de bovinos infectados naturalmente con TBC y otros 6 sueros de bovinos con PTBC para detectar la presencia de anticuerpos contra tres antígenos diferentes PPD-B (derivado de proteína pura de *Mycobacterium bovis*, SENASA), PPA® (antígeno protoplasmático de la paratuberculosis, Allied Monitor) y WLA (lisado de células completas de *Mycobacterium avium* subsp *avium*, CEDIVE). La reactividad cruzada a diferentes antígenos se expresó como porcentaje del índice de avidéz entre antígenos, los resultados se analizaron con ANOVA de una vía. El mejor rendimiento se logró en sueros de animales con PTBC utilizando el antígeno WLA con un valor medio del índice de avidéz (IA) de 92, seguido del antígeno PPA con un valor medio

del IA de 84 y el antígeno PPD-B con un valor medio del IA de 82 ($p=0,0037$). El índice de avidéz en animales con TBC no pudo discriminar entre antígenos con un valor medio de IA de 89 para el antígeno PPD-B, un valor medio de IA de 87 para el antígeno WLA y un valor medio de IA de 83 para el antígeno PPA ($p = 0,46$).

4. DISCUSIÓN



El desarrollo de esta tesis y la abundante bibliografía nacional e internacional aquí mencionada, dejan expuesta la dificultad del diagnóstico de la PTBC con la utilización de una única técnica diagnóstica simple. Las razones por las que esto ocurre son varias, algunas inherentes a la propia enfermedad, como lo es su patogenia compleja, su largo período de incubación, la gran cantidad de animales subclínicos, entre otras; y razones relacionadas a las propias limitaciones de las técnicas diagnósticas en cuanto a sus características operativas (sensibilidad y especificidad) y de sus capacidades predictivas (VVP y VVN).

El diagnóstico presenta un enfoque distinto si se efectúa sobre un individuo que muestra signología compatible con la enfermedad o si lo que

se busca es detectar animales asintomáticos en el rodeo afectado (Whitlock y Buergelt, 1996; Chiodini y col, 1984). En el primer caso, el diagnóstico suele resultar más sencillo y varias técnicas directas e indirectas pueden poner en evidencia al agente etiológico (Ziehl Neelsen de muestras fecales o de tejidos, cultivo, PCR, etc), a las lesiones (necropsia e histopatología) o a la respuesta inmune del animal (pruebas serológicas).

Las dificultades anteriormente mencionadas para la detección de individuos infectados y subclínicos dentro del rodeo obligan a utilizar un conjunto de técnicas diagnósticas, con una determinada frecuencia de repeticiones, establecida por el médico veterinario, con el objetivo de aumentar la capacidad de detección de animales infectados y bajar la prevalencia, generalmente en un lapso de años.

La estrategia de saneamiento utilizada en el país se basa en la detección y eliminación de los animales positivos; ya que no se cuenta con vacunas ni tratamientos efectivos. Las técnicas serológicas suelen ser las más utilizadas para el diagnóstico poblacional (OIE, 2014; Yokomizo 1984, 1986 y 1991). En Argentina los laboratorios con tecnología suficiente para el diagnóstico de la enfermedad son escasos, y se concentran principalmente en la Pcia. de Bs. As., lo cuál dificulta el conocimiento real de la prevalencia en muchas provincias del interior del país.

Se pudo desarrollar y poner a punto una técnica de ELISA con el agregado de urea, que permite aumentar la especificidad en la detección de sueros positivos a PTBC, y por ende detectar animales asintomáticos

con mayor exactitud, evitando grandes pérdidas económicas. En las enfermedades crónicas que no poseen tratamiento ni vacunas, donde el número de animales asintomáticos en los rodeos es elevado y las técnicas diagnósticas disponibles presentan muchas limitaciones en cuanto a sus características operativas y predictivas, resulta fundamental poder contar con una herramienta que permita disminuir los falsos positivos, ya que de lo contrario muchos animales irían erróneamente a faena.

La prueba de ELISA-su es más sensible en la detección de animales subclínicos con relación a otras técnicas como la fijación de complemento y AGID (OIE, 2018). El ELISA es capaz de detectar entre un 30% y 40% de bovinos identificados como positivos por el cultivo de materia fecal en medio sólido (Whitlock y col., 2000). Es un hecho ampliamente documentado de que la sensibilidad depende de la edad, por ende, la técnica posee menor sensibilidad global cuando se utiliza sobre grupos de animales de diferentes edades; se estima que en estos casos la sensibilidad global cae a un valor cercano al 15% (Jubb y col., 2004; Whitlock y col., 2000). La especificidad varía entre 40-100% (Nielsen y Toft, 2005).

En la PTBC bovina los títulos de anticuerpos séricos son más altos durante la etapa de enfermedad clínica, cuando los animales presentan más lesiones y liberan grandes cantidades de Map en sus heces y leche (Chiodini y col 1993; Maroudam y col., 2015). Con el objetivo de mejorar la capacidad diagnóstica (especificidad) en estadios pre-clínicos de la enfermedad se agregó la absorción de los sueros con *M. phlei* (Yokomizo

y col.; 1983, 1985; Milner y col., 1987) en kit diagnósticos comerciales. La absorción combina la sensibilidad del ELISA con la especificidad añadida por la eliminación de Ac inespecíficos que originan reacciones cruzadas. Se modificó el ELISA “*in house*” descrito por Travería, 2003, agregando urea, con el objetivo de disminuir los Ac inespecíficos, y de reducir los costos operativos. La urea afecta los enlaces de hidrógeno desestabilizando las fuerzas hidrófobas que actúan en la unión Ag-Ac, por lo tanto, las uniones débiles se desprenden, quedando unidas las que tienen mayor afinidad funcional (avidez). A mayor tiempo de contacto con el patógeno, mayor avidez en la unión Ag-Ac; lo que se puede relacionar con la cronicidad de la infección.

El ELISA-u, con un punto de corte de DO ≥ 65 , presentó una sensibilidad de 58% (46-70), con una especificidad de 91% (88-94). Los valores predictivos fueron: VPP: 62% (50-94), VPN: 90% (87-94), LR+: 6 y LR-: 0.46. Los valores indican una mejora por sobre el ELISA-su (Travería; 2003) y en la eficacia de la técnica para la detección de los animales verdaderamente negativos (Es), y en el aumento de la probabilidad post-prueba + de presentar la enfermedad (LR+: 6).

Cuando se compararon las AUC de las técnicas de ELISA-su, con ELISA-u y el IU se observó que el IU presentó una mayor capacidad discriminatoria entre positivos y negativos, (AUC: 0,90); mientras que las AUC para ELISA con y sin urea fueron algo menores, pero similares (AUC: 0.86 y 0.87), aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Como se mencionó anteriormente y debido a lo complejo de la enfermedad y a que las técnicas diagnósticas no son perfectas, en la práctica es común el uso de más de una prueba diagnóstica para confirmar la enfermedad. Con base en nuestros resultados vemos que tanto el ELISA-su como el modificado con la incorporación de la urea, se podrían utilizar como pruebas en serie, lo que significa que solamente las muestras positivas (y sospechosas) en la primera prueba se analizan por la segunda técnica. Se deben considerar positivas las muestras que reaccionan a las dos técnicas diagnósticas. Ver tabla 8 y 9.

Tabla 8: Valores predictivos de las técnicas de ELISA utilizadas de modo único.

	ELISA-su	ELISA-u
VVP	54.2 %	61.4 %
VVN	95.0 %	90.3 %
Prev. aparente	28.5 %	18.0 %
J de Youden	65.0 %	49.6 %
Fiabilidad	83.3 %	85.0 %

Tabla 9: Valores predictivos de las técnicas de ELISA utilizadas combinadas.

	Serie	Paralelo
Sensibilidad	47.2 %	92.1 %
Especificidad	98.6 %	76,7 %
VVP	88.9%	48.1 %
VPN	88.8 %	97,6 %
Prev. aparente	10.1 %	36.4 %
J de Youden	45.8 %	68.8 %
Fiabilidad	88.8 %	79.8 %

Las tablas muestran que al combinar las dos pruebas en serie se obtiene una reducción de los falsos positivos, y por lo tanto aumenta la especificidad (98.6%). Los sueros sometidos a la segunda prueba debieran sembrarse por duplicado en la placa de ELISA. En uno de los pares se agregaría la urea y en el otro no, con el objetivo de calcular el IU que se podría utilizar como un tercer factor para discriminar con mayor certeza a los verdaderos negativos de los falsos positivos. El IU mostró una asociación estadísticamente significativa, para un IC 95%, con el cultivo de Map en materia fecal ($p < 0,01$) y una correlación fuerte con la DO de los sueros; aunque se aprecian variaciones en los niveles de correlación de ambas variables que podrían estar relacionados con las características propias de cada rodeo (raza, tipo de producción, nivel de infección, etc). Los rodeos endémicos presentaron una correlación fuerte ($p = 0,01$).

Nuestros resultados nos muestran que los sueros de los bovinos que arrojan un resultado de IU ≥ 80 (odds. 28, IC95%=13.9- 54.4) tienen 28 veces más riesgo de desarrollar la enfermedad que aquellos que poseen un IU menor. Dicho en términos de probabilidad (probabilidad: Or/Or+1) hay un 95% de probabilidad de que la PTBC esté asociada a un IU alto. Tomando como base las observaciones anteriores, el resultado del IU puede ayudar a discriminar entre un resultado positivo versus negativo cuando el valor de DO no es concluyente (categoría “sospechoso”).

Cuando se realizaron los muestreos longitudinales pudo observarse que existen dificultades para identificar a los animales positivos utilizando una única técnica diagnóstica, incluso animales que resultan positivos al

cultivo y PCR para PTBC, no arrojan resultados positivos al ELISA en un determinado momento. Este fenómeno también fue observado en TBC (Maciό y col., 2021), donde se halló que el 38% y el 5% de los animales sometidos a la IDR y ELISA respectivamente, tuvieron comportamiento errático en las repeticiones, intercalando resultados positivos y negativos. Los sueros de los animales positivos versus negativos al cultivo de Map en materia fecal se comportaron de manera diferente con relación a su IU, a pesar de que mostraron variaciones en los sucesivos muestreos, los animales positivos a Map tuvieron, en su mayoría, IU mayores al punto de corte sugerido en esta tesis (≥ 80) o en ascenso; mientras que los animales negativos al cultivo, en su gran mayoría, no superaron el punto de corte establecido. Tres bovinos, identificados como B599; 2854 y A172, tuvieron IU superiores al límite de corte, a pesar de ser cultivo negativo a Map. Es probable que se trate de falsos negativos, ya que el cultivo solamente detecta a animales que excretan más de 100 UFC/gr de MF (Whitlock y col., 2000).

Estudios realizados sobre la capacidad de detección de la enfermedad a través de la titulación de Ac con ELISA, demuestran que la proporción de animales detectables aumenta a medida que aumenta la edad, tal es así que la proporción de animales positivos fue de 0,33 en jóvenes (≤ 2 años) versus 0,94 en adultos (≥ 5 años) (Nielsen, 2003). En nuestras investigaciones observamos con relación al IU que presenta semejanzas a lo que ocurre con los Ac, mostrando diferencias significativas entre los valores hallados en animales jóvenes (≤ 2 años) versus animales

adultos (>2 años), siendo más alto en los bovinos adultos ($p=0.00$). Este hallazgo es coincidente con lo comunicado por Nielsen (2003) ya que el IU posee una alta correlación con la DO de los sueros, y por ende con la positividad al ELISA.

La exposición a micobacterias ambientales por parte de los bovinos fue asociada por numerosos autores (Oriani y Sagardoy, 2002; Roussel y col., 2007; Norby y col., 2007; Osterstock y col., 2006) con un aumento de reactantes positivos al ELISA indirecto para PTBC. Las regiones geográficas tienen incidencia en este fenómeno ya que se observó que las características fisicoquímicas del agua y suelo, principalmente el bajo pH, estuvo relacionado con el mayor aislamiento de MA del medio ambiente (Norby y col., 2007). Rodeos que presentan una alta seroprevalencia a PTBC, con baja o nula presencia de signos clínicos de la enfermedad, poseen una alta proporción de cultivos positivos de MA en la materia fecal (Roussel y col., 2007). Este hallazgo se relacionó con la presencia de Ac inespecíficos de reacción cruzada al ELISA para PTBC (Osterstock y col., 2007) y con reacciones inespecíficas a la tuberculina (Corner y Pearson, 1979; Oriani y col., 2011). Osterstock y col., 2006 inoculó vía subcutánea MA (*M. scrofulaceum*, *M. intracellulare*, *M. terrae*, *M. avium complex* y *M. celatum*) inactivadas con formol, en bovinos seronegativos a PTBC y observó que estos resultaron, posteriormente, positivos a dos ELISAs comerciales para PTBC. La exposición oral a MA también se asoció a reacciones cruzadas con la intradermorreacción a PPD bovina (Jorgensen, 1981), e incluso con la interferencia de la respuesta inmune a la vacunación

con BCG, pudiendo generar falsos negativos o falsos positivos en los test diagnósticos (Răţoi y col., 2020).

Un trabajo publicado en nuestro país (Bresky y col., 2016), demostró que la sensibilización de terneros con MA vía oral (*M. phlei*, *M. porcinum* y *M. fortuitum*) provocó una respuesta inespecífica detectable mediante la prueba de γ IFN frente a los antígenos PPD bovina y PPD aviar; sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo inoculado con *M. fortuitum* y el grupo control.

Nuestras investigaciones demuestran una asociación estadísticamente significativa ($p < 0.00$) entre el resultado positivo al ELISA de los sueros y el resultado positivo del cultivo para Map. Un análisis similar relacionando el resultado de ELISA con los cultivos para MA a partir de materia fecal también mostró diferencias estadísticas significativas ($p < 0.00$) entre las variables. Estos hallazgos sugieren que un resultado positivo al ELISA puede estar relacionado con la infección por Map, por MA, o a infecciones mixtas; lo que es coincidente con lo observado por otros autores (Lombard y col., 2005; Sockett y col., 1992 y Roussel y col., 2007) que describen resultados falso-positivos al ELISA para PTBC debido a la exposición a MA. Trece de los bovinos estudiados resultaron positivos al cultivo de Map y de MA a partir de sus materias fecales, y todos fueron ELISA-u positivo, con sueros cuyas DO variaron entre 714 y 1.200. Este hallazgo pone en evidencia la alta frecuencia de exposición natural de los bovinos a bacterias del género *Mycobacterium* capaces de desencadenar

una respuesta de Ac cuantificable con el uso del ELISA para el diagnóstico de PTBC.

Se cultivaron 222 muestras de materia fecal provenientes de los rodeos bajo estudio para el aislamiento de MA. El porcentaje de aislamiento fue del 42 %; algo menor al informado por Oriani y col. (2019) a partir de muestras de agua de red domiciliaria, donde en el 51,6 % de las muestras procesadas desarrollaron MA. Las micobacterias aisladas fueron clasificadas fenotípicamente siguiendo, en gran parte, el algoritmo descrito por Bernardelli (2007). La identificación genotípica por secuenciación se pudo realizar sobre el 15,3 % de los aislamientos. Las MA mayormente identificadas fueron pertenecientes al complejo *Mycobacterium terrae* (CMT): *M. nonchromogenicum* (5 aislamientos) y *M. engbaekii* (4 aislamientos); la muestra A161 mostro un % de similitud por secuenciación de 16S ARNr <99%, el cual se considera el mínimo utilizado para determinar especie (Oriani y col., 2019), por lo que solamente se alcanzó la identificación a nivel género. Las micobacterias del CMT se han relacionado esporádicamente como agentes causales de infecciones óseas y articulares en humanos, que surgen de lesiones ambientales directas por inoculación (Imperiale y col., 2010; Abudaf y Beam, 2018); y particularmente *M. nonchromogenicum* se relacionó con generar, en bovinos, respuestas cruzadas a PPD bovina y aviar, pudiendo dar falsos positivos (Rățoi y col., 2020). Otros autores (Valdés y Cid, 2004) han observado en España un aumento en la incidencia de lesiones cutáneas en humanos inmunodeprimidos asociadas a infecciones por *M. fortuitum* y *M.*

chelonae entre otros. No fue posible el aislamiento de *M. phlei* a partir de la materia fecal, a pesar de que se mencionan aislamientos a partir de muestras de suelo en nuestro país (Oriani y Sagardoy, 2002). Esto reviste importancia debido a que es la micobacteria utilizada como inmunoabsorbente en los kits comerciales de ELISA (Yokomizo y col., 1985; Cox y col., 1991).

En Argentina, varios autores (de Kantor y col., 1987; Traversa y col. 2011; Marfil, 2019 y 2021) han reportado aislamientos de MA a partir de órganos bovinos que presentaron lesiones sugestivas de TBC. Traversa y col. (2011) identificó principalmente *M. smegmatis*, *M. chelonae*, y *M. terrae* como principales agentes involucrados en estas lesiones; lo que es en parte coincidente con nuestros hallazgos a partir del cultivo de la materia fecal. Esto pone en evidencia que las micobacterias del ambiente son la fuente de contagio de los bovinos y ellos desarrollan una respuesta inmune que puede generar reacciones inespecíficas para el diagnóstico de PTBC y TBC.

Las cepas de MA aisladas difieren según las regiones estudiadas y el material cultivado; tal como avala un estudio publicado por Roussel y col. (2007), en Texas, EEUU, donde identifican a *M. scrofulaceum* como la de mayor prevalencia, mientras que estudios en nuestro país realizados en la provincia de La Pampa, mencionan como las de mayor prevalencia en muestras de agua a *M. fortuitum* y *M. gordonae* (Tortone y col., 2019) y en muestras de suelo a *M. fortuitum* (Oriani y col., 2019; Oriani y Sagardoy, 2002). En Checoslovaquia (Pavlik y col., 2005) se menciona a *M. avium*

subsp *avium* como una de las principales micobacterias implicadas en las lesiones encontradas en los bovinos (Dvorska y col., 2007); donde las aves representan la fuente de infección y en menor frecuencia los pequeños mamíferos terrestres (Fischer y col., 2000). También se publicaron infecciones combinadas con *M. avium* subsp *avium* y *M. avium* subsp *hominissuis* (Dvorska y col., 2004). El *M. avium* subsp *hominissuis* del medio ambiente (Matlova y col., 2003) se aísla frecuentemente del cerdo (Pavlik y col., 2003; Barandiaran y col., 2015).

Basándose en lo expresado en el párrafo anterior, resulta sumamente interesante realizar relevamientos de MA en rodeos que muestren alta seroprevalencia a PTBC, principalmente si esta está asociada a baja presencia de signos clínicos, para observar posibles reacciones cruzadas de Ac y poder interpretar de mejor manera los resultados obtenidos. La secuenciación génica permite identificar al aislamiento, aunque resulta costosa de realizar y no siempre es concluyente. Las cepas que muestren mayor prevalencia zonal o predial podrían ser utilizadas como inmunoabsorbentes en los ELISA “*in house*” en reemplazo del *M. phlei* utilizado tradicionalmente. Autores brasileños utilizaron al *M. fortuitum* como absorbente en la prueba de ELISA en lugar del *M. phlei*, con resultados similares, proponiendo una alternativa al clásico procedimiento de absorción de los sueros con *M. phlei* (Marassi y col., 2008, Norby y col., 2007). Bajo las condiciones en las que se realizaron nuestros estudios, la utilización de la urea mostró múltiples ventajas y diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) por sobre la utilización

de inmunoabsorbentes (*M. phlei* y *M. nonchromogenicum*) en cuanto a la eliminación de Ac. de reacción cruzada. Dentro de las más destacadas podemos mencionar:

- Bajo costo: ya que no requiere del cultivo de cepas de MA, ni de la necesidad de contar con un disruptor celular para el procesamiento del antígeno.
- Practicidad y bajo tiempo operativo: en solamente 4' de exposición de los sueros a la urea se logra disminuir sustancialmente la presencia de Ac inespecíficos.
- Características operativas: Muestra valores de sensibilidad y especificidad más que aceptables y, además, permite obtener el IU; con el cuál se puede establecer un punto de corte que permite discriminar con mayor certeza sueros positivos de negativos (AUC 0.9).

Los futuros trabajos estarán orientados en la identificación de mayor cantidad de aislamientos de MA y su relación con la presencia de reacciones Ag-Ac inespecíficas, principalmente en el rodeo lechero, que es donde observamos la mayor seroprevalencia, y los signos clínicos de la enfermedad no son tan frecuentes.

Una de las razones por las cuales la vacuna para la prevención de la PTBC no está permitida en nuestro país se debe a que se encuentra vigente el Plan Nacional de Control y Erradicación de la Tuberculosis Bovina (Res.128/12); el cual posee como técnica oficial para diagnosticar TBC en los rodeos a la tuberculina (PPD bovina), utilizada en el pliegue

anocaudal o en la región cervical (Torres, 2016 y 2012). En los rodeos en donde están presentes ambas enfermedades micobacterianas (PTBC y TBC) pueden existir reacciones inmunológicas cruzadas que dificultan la interpretación de una reacción positiva a la PPD bovina (OIE, 2014; Guanziroli y col., 2005). El ELISA para diagnóstico de TBC se podría utilizar como complemento de la prueba anocaudal. En uno de nuestros ensayos evaluamos el empleo del ELISA-u con relación a diferentes antígenos en sueros de bovinos con PTBC y TBC. Utilizando el índice de avidéz (IU), los distintos antígenos discriminaron los sueros procedentes de animales con PTBC ($p=0,00$); mientras que no hubo diferencias significativas en los sueros de animales con TBC ($p=0.46$). De acuerdo con lo observado se puede decir que la técnica tal como se utilizó en esta tesis resulta útil para el modelo de diagnóstico de PTBC y no resulta suficiente para discriminar a animales con TBC.

El seguimiento longitudinal de bovinos positivos a la enfermedad resulta dificultoso. Las características comerciales de los rodeos utilizados para el desarrollo de esta tesis plantearon un desafío extra al diagnóstico en sí mismo, y este estuvo relacionado con la dificultad del seguimiento, ya que, ante el diagnóstico positivo, los bovinos fueron rápidamente eliminados de los planteles. Se sabe que los productores capaces de vender animales asintomáticos a frigorífico evitan grandes pérdidas económicas por la pérdida de peso y muerte del individuo. A continuación, se observa un ejemplo ocurrido durante el desarrollo de la tesis.

Jáuregui Lorda S.R.L.				Domicilio: LISANDRO DE LA TORRE 2406 1			
Tel. y Fax: 02223-445150				Fecha de Remate: 22/04/2016			
Sr.: 18101 UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA							
Su venta es:							
Comprador	Plazo	Cant. Cabezas	Hacienda	Kilos	Precio	Importe Total	Lote
20858	30 DIAS	1	VACA	220	6.000	1.320,00	81772
51109	30 DIAS	1	VACA	300	10.000	3.000,00	81773
41884	30 DIAS	1	VACA	320	12.000	3.840,00	81774
20357	30 DIAS	6	VACA	2.230	14.200	31.666,00	81793
17488	30 DIAS	6	VACA	1.720	22.000	37.840,00	81812
Total de su Venta:		14		4.790		77.666,00	

En el remito de la feria ganadera puede observarse la venta de cinco lotes de animales, los tres primeros corresponden a vacas preñadas diagnosticadas positivas a PTBC. Los tres animales en promedio pesaron 280 Kg (incluso la del primer lote llegó a pesar 220 Kg) y cotizaron en promedio 9,3 \$/kg (1US\$=14,60\$). Las vacas del 4° y 5° grupo eran negativas a PTBC, pesaron en promedio 360 kg (3960/11) y cotizaron en promedio 18 \$/kg. En resumen, en este ejemplo se observa la gran pérdida económica ocasionada por la venta de animales con signos clínicos, ya que las vacas con PTBC pesaron en promedio 80 Kg menos que las vacas sanas, y cotizaron por kg el 50% del valor (9,3 \$/Kg versus 18 \$/kg), sin considerar el valor agregado que debieran haber tenido por ser animales jóvenes y gestantes.

Las pérdidas económicas anteriormente descritas están en concordancia con lo publicado por Morsella y Paolicchi (2008) quienes mencionan pérdidas económicas referentes al valor bruto de la producción ganadera y de la comercialización y flete, durante el año 2007, cercanas a

los 22.0 millones de U\$S (zona de cría bovina cuenca del rio Salado) y de 6.3 millones de U\$S (Cuencas Lecheras) en la Provincia de Buenos Aires.

5. CONCLUSIONES

“No existen respuestas definitivas, y ello simplemente porque no existen preguntas finales”

(Mario Bunge)



1. La paratuberculosis bovina es una enfermedad compleja; donde es necesario desarrollar nuevas herramientas diagnósticas que permitan mejorar la eficacia de detección de los animales infectados y contextualizar el resultado de laboratorio con el historial clínico del rodeo de donde proviene la muestra.
2. El ELISA-u demostró ser capaz de detectar con un alto nivel de eficacia a animales subclínicos, eliminando en gran parte los Ac. Inespecíficos. Cuando se utiliza en serie con el ELISA-su la especificidad alcanza el 98.6%.
3. El IU permitió establecer un punto de corte (≥ 80) donde se combina una alta sensibilidad (0.76) y especificidad (0.91). Utilizado sobre sueros con resultados “sospechosos” al ELISA permite predecir con alta certeza la presencia de la enfermedad (LR+8). Además, se estableció que el IU alto

es un importante factor de riesgo (Odds Ratio: 28) en la PTBC bovina, principalmente en animales mayores a 24 meses de edad.

4. El IU tendría su utilidad en diferenciar los sueros de los animales con paratuberculosis de los animales con respuesta a *M. bovis*.

5. El IU podría diferenciar los animales vacunados de los infectados con paratuberculosis.

6. La presencia de MA en los rodeos genera respuestas cruzadas a la técnica de ELISA. En nuestras condiciones de trabajo el agregado de urea al ELISA mostró ventajas (bajo costo, tiempo operativo, etc) por sobre el uso de inmunoabsorbentes (*M. phlei* y *M. nonchromogenicum*) en cuanto a la eliminación de uniones Ag-Ac inespecíficas.

7. Es importante la identificación fenotípica y genotípica (secuenciación) de las cepas aisladas de MA, ya que éstas muestran diferentes prevalencias por regiones y rodeos.

8. Las MA mayormente identificada a partir de la materia fecal fueron pertenecientes al complejo *Mycobacterium terrae* (*M. nonchromogenicum* y *M. engbaekii*). No se aisló ninguna cepa de *M. phlei*. Se aislaron dos cepas de bacilos BAAR +, no micobacterias, a partir de la materia fecal, que fueron tipificadas como *Streptomyces spp.* y *Nocardia spp.*

9. La clasificación fenotípica de MA es compleja y muestra inconvenientes a la hora de tipificar con exactitud el aislamiento. Se deben complementar con técnicas moleculares de secuenciación, las cuales son costosas en términos económicos y de acceso limitado.

10. En medios de cultivo líquidos enriquecidos con extractos de micobacterias, y con los protocolos de descontaminación adecuados (<5 horas), es factible aislar BAAR hasta aproximadamente en el 50 % de las muestras de materia fecal.

11. El método para discriminar BAAR de no BAAR (screening) es la coloración de ZN; aunque no todos los BAAR son micobacterias, lo que genera complicaciones posteriores porque los métodos de tipificación también son muy variados.

12. El repique de BAAR de medios líquidos a sólidos genera muchas pérdidas de cepas, debido a contaminación o por la falta de sustratos adecuados, los gérmenes entran en fases durmientes, no desarrollando en los medios de cultivo sólido.

13. La gran mayoría de los trabajos desarrollados en esta tesis se realizaron sobre bovinos >2 años, sería importante profundizar futuras investigaciones en animales más jóvenes.

6. BIBLIOGRAFÍA

- 1 Abudaff, Naief N. Beam, Elena. *Mycobacterium arupense*: A review article on an emerging potential pathogen in the *Mycobacterium terrae* complex, *Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases*, Vol. 10, 2018, Pages 1-5.
- 2 Aguado-Martínez, A. Álvarez-García, G. Arnaiz-Seco, I. Innes, E. Ortega-Mora, LM. Uso del ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas de avidéz y Western Blot de avidéz para discriminar entre la infección aguda y crónica por *Neospora caninum* en el ganado. *Revista de investigación de diagnóstico veterinario*. Vol. 2005; 17 (5): 442-450. doi: 10.1177 / 104063870501700506.
- 3 Aitken, JM. Phan, K. Bodman, SE. Sharma, S. Watt, W. George, PE. Agrawal, G. Tie, ABM. A *Mycobacterium* species for Crohn's disease? *Pathology*. 2021; 53 (7): 818-823. doi: 10.1016/j.pathol. 2021.03.003.
- 4 Alquicira J. Análisis de correlación. 2017. Conogasi.org Sitio web: <http://conogasi.org/articulos/analisis-de-correlacion-2/>
- 5 Alvarado Pinedo, MF. Di Paolo, LA. Sosa, PS. Romero, MA. Peralta, LM. Costa, EF. Travería, GE. Seroprevalencia de paratuberculosis bovina mediante la prueba de ELISA urea en rodeos de cría y de leche con sospecha de la enfermedad, localizados en la provincia de Buenos Aires, Argentina. 2019. *Analecta Veterinaria*. 39. 032. 10.24215/15142590e032.
- 6 Barandiaran, S. Pérez AM, Gioffré AK, Martínez Vivot M, Cataldi AA, Zumárraga MJ. "Tuberculosis in swine co-infected with *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* and *Mycobacterium bovis* in a cluster from Argentina." *Epidemiology and infection* vol. 143,5 2015: 966-74.
- 7 Bagueño, MJ. García-Bastos, JL. González-Buitrago, JM. Las curvas ROC en la evaluación de las pruebas diagnósticas. *Med Clin (Barc)* 1995; 104: 661 - 670.
- 8 Bernardelli, A. Manual de Procedimiento Técnico Diagnóstico de Paratuberculosis. SENASA 2000; 1-47. [Online] <http://www.aavld.org.ar/paratub.pdf>
- 9 Bernardelli, A. Manual de Procedimientos. Clasificación fenotípica de las micobacterias. SENASA 2007; 1 -65. [Online] <http://www.senasa.gov.ar/Archivos/File/File1443-mlab.pdf>
- 10 Biet, F. Boschioli, ML. Non-tuberculous mycobacterial infections of veterinary relevance. *Research in veterinary science* vol. 97 Suppl 2014: S69-77. doi:10.1016/j.rvsc.2014.08.007
- 11 Bolstad, WM. *Introduction to Bayesian Statistics*. Second Edition, New Jersey, Wiley John and Sons, Inc. 2007.
- 12 Bresky, F.; Fiorentino, M.A.; Morsella, C.; Méndez, L.; Vasini Rosell, B.; Eirin, ME.; Zumárraga, M.; Paolicchi, F.A. Respuesta inmune frente a antígenos recombinantes en bovinos experimentalmente infectados con micobacterias

ambientales.2021. [on-line] <https://www.aavld.org.ar/wp-content/uploads/2021/11/XXIII REUNION CIENTIFICA 89 CNICAAVLD2021-RES AMENES.pdf>

13 Buergelt, CD. Hall, C. Mc Entee, K. Duncan, JR. Pathological evaluation of paratuberculosis in naturally infected cattle. *Vet Pathol* 1978; 2: 196-07.

14 Burton, PR. Helping doctors to draw appropriate inferences from the analysis of medical studies. *Stat Med* 1994; 13: 1699-1713.

15 Carrigan, MJ. Seaman, JT. "The pathology of Johne's disease in sheep." *Australian veterinary journal* vol. 67,2 (1990): 47-50. doi:10.1111/j.1751-0813.1990.tb07693.x

16 Chiodini, R. Van Kruiningen, H. Characterization of *Mycobacterium paratuberculosis* bovine, caprine, and ovine origin by gas-liquid chromatographic analysis of fatty acids in whole-cell extracts. *Am. J. Vet. Res* 1985; 46: 1980-1989.

17 Chiodini, R. Van Kruiningen, HJ. Merkal, RS. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease) the current status and future prospects. *Cornell Vet* 1984; 74: 218-262.

18 Chiodini, RJ. Hermon-Taylor, J. The thermal resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk under conditions simulating pasteurization. *J Vet Diagn Invest* 1993; 5: 629-631.

19 Chiodini, RJ. Van Kruiningen, HJ. Merkal, RS. Walter, R. Thayer, JR. Coutu, JA. Characteristics of an Unclassified *Mycobacterium* Species Isolated from Patients with Crohn's Disease. *Journal of Clinical Microbiology* 1984; 20: 966-971.

20 Cicuta, ME. Validez de la prueba tuberculínica en el diagnóstico de paratuberculosis bovina en el NEA. *Rev Med Vet* 1999; 80: 72-74.

21 Cirone, K. Characterization and viability of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in milk, cheese and water. Balcarce, Argentina, Thesis of Graduate. Faculty of Agrarian Sciences, Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina, 2004;1-65.

22 Clarke, C. Host responses to *Mycobacterium paratuberculosis/M. avium* infection. Proceedings of the Fourth International Colloquium on Paratuberculosis UK July 1994; 17: 345-365.

23 Clarke, CJ. The Pathology and Pathogenesis of Paratuberculosis in Ruminants and Other Species. *J Comp Path* 1997; 116: 217-261.139

24 Collins, DM. Gabric, DM. De Lisle, GW. Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. *J of Clin Microbiol* 1990; 28: 1591-1596.

25 Collins, MT. Clinical approach to control of bovine paratuberculosis. *JAVMA* 1994; 204: 208-210.

26 Collins, MT. Diagnosis of paratuberculosis. *Vet Clin of North Am: Food Animal Practice* 1996; 12: 357-371.

- 27 Corner, LA. Pearson, CW. Response of cattle to inoculation with atypical *Mycobacteria* isolated from soil. Australian Veterinary Journal, Vol. 55, January, 1979.
- 28 Corpa, JM. Garrido, J. García Marin, JF. Perez, V. Classification of lesions observed in natural cases of paratuberculosis in goats. J Comp Pathol, 2000, 122: 255-265.
- 29 Costa, EF. Fazzio, LE. Travería, GE. Sánchez, RO. Alvarado Pinedo, MF. Mattioli, GA. Otero, MM. Chialva, M. Romero, JR. Causas de mortalidad y aborto en bovinos. Informe de 1163 casos entre 1986 y 2001 en la provincia de Buenos Aires. Revista de Medicina Veterinaria 2004; 85: 16-22.
- 30 Cox, JC. Drane, DP. Jones, SL. Ridge, S. Milner, AR. Development and evaluation of a rapid absorbed enzyme immunoassay test for the diagnosis of Johne's disease in cattle. Aust Vet J 1991; 68(5): 157-160.
- 31 Dahmen, H. Duenner, M. Zimmer, K. Steinhauer, D. Hermon-Taylor, J. Rayment N. Detection and Isolation of MAP from Skeletal Muscle tissue of 39% of 143 Cattle at a German Abattoir. Proceedings of the 14th International Colloquium on Paratuberculosis. Riviera Maya, Mexico: International Association for Paratuberculosis, Inc.; 2018. p162.
- 32 D'Amore, M. Lisi, S. Sisto, M. Cucci, L. Dow, CT. Molecular identification of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in an Italian patient with Hashimoto's thyroiditis and Melkersson-Rosenthal syndrome. J Med Microbiol. 2010, 59(Pt 1):137-9.
- 33 De Kantor, I. Nader, A. Bernardelli, A. Osorio Girón, D. Man, E. Tuberculous infection in cattle not detected by slaughter-house inspection. J Vet Med Ser B 1987; 34:202-205.
- 34 Dennis, MM. Reddacliff, LA. Whittington, RJ. "Longitudinal study of clinicopathological features of Johne's disease in sheep naturally exposed to *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis." Veterinary pathology vol. 48,3; 2011: 565-75. doi:10.1177/0300985810375049
- 35 Di Paolo, LA. Sosa, PS. Alvarado pinedo, MF. Peralta, LM. Romero, MA. Travería, GE. Paratuberculosis bovina: asociación entre el índice urea y la densidad óptica de los sueros en la técnica de ELISA indirecto. Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnósticos (AAVLD). Rio cuarto, Córdoba. Nov. 2018.
- 36 Dow, CT. M. paratuberculosis Heat Shock Protein 65 and Human Diseases: Bridging Infection and Autoimmunity. Autoimmune Dis 2012; 1-6.
- 37 Dow, CT. Sechi, LA. "Cows Get Crohn's Disease and They're Giving Us Diabetes." Microorganisms vol. 7,10 466. 17 Oct. 2019, doi:10.3390/microorganisms7100466
- 38 Dvorska, L. Matlova L. Ayele, WY. Fischer, OA. Amemori, T. Weston, RT. Alvarez, J. Beran, V. Moravkovam Pavlik, I. Avian tuberculosis in naturally infected captive water birds of the Ardeidae and Threskiornithidae families studied by

serotyping, IS901 RFLP typing and virulence for poultry. *Vet. Microbiol.* 2007, 119,366–374.

39 Dvorska, L. Matlova, L. Bartos, M. Parmova, I. Bartl, J. Svastova, P. Bull, T.J. Pavlik, I. Study of *Mycobacterium avium* complex strains isolated from cattle in the Czech Republic between 1996 and 2000. *Vet. Microbiol.* 2004, 99, 239–250.

40 Fecteau, ME. Hovingh, E. Whitlock, RH. Sweeney, RW. Persistence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in soil, crops, and ensiled feed following manure spreading on infected dairy farms. *Can Vet J* 2013; 54: 1083-1085.

41 Fernández-Silva, JA. Correa-Valencia, NM. Ramírez, NF. Systematic review of the prevalence of paratuberculosis in cattle, sheep, and goats in Latin America and the Caribbean. 2014; 46: 1321 -40.

42 Fialová, L. Petráčková, M. Kuchař, O. Comparison of different enzyme linked immunosorbent assay methods for avidity determination of antiphospholipid antibodies. *Journal of Clinical Laboratory Analysis.* 2017, 31(6). doi: 10.1002/jcla.22121

43 Fischer, O. Matlova, L. Bartl, J. Dvorska, L. Melicharek, I. Pavlik, I. Findings of mycobacteria in insectivores and small rodents. *Folia Microbiol. (Praha)* 2000; 45, 147-152.

44 Gajendran, M. Priyadarshini Loganathan, AP. Catinella, JG. Hashash, A. "A comprehensive review and update on Crohn's disease." *Disease-a-month : DM* vol. 64,2 (2018): 20-57. doi:10.1016/j.disamonth.2017.07.001

45 Garrido, JM. Cortabarría, N. Oguiza, JA. Aduriz, G. Juste, RA. Use of a PCR method on fecal samples for diagnosis of sheep paratuberculosis. *Vet Microbiol* 2000; 77: 379-386.

46 Glanemann, B. Hoelzle, LE. Bögli-Stuber, K. Jemmi, T. Wittenbrink, MM. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Swiss dairy cattle by culture and serology. *Schweiz Arch Tierheilkd.* 2004; 146: 409-415.

47 Guanziroli Stefani, MC. Cicuta de Gallardo, ME. Tuberculinización en Búfalos. 2005. [Online] <http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/com2005/index.htm>

48 Harris, NB. Barletta, RG. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. *Clin Microbiol Review* 2001; 14: 489-512.

49 Hermon-Taylor, J. El-Zaatari, FAK. The *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* problem and its relation to the causation of Crohn disease. En *Pathogenic Mycobacteria in Water: A Guide to Public Health Consequences, Monitoring and Management.* Edited by Pedley S, Bartram J, Rees G, Dufour A, Cotruvo J, London, UK, 2004, p 74-93.

50 http://www.daff.gov.au/__data/assets/pdf_file/0005/1280867/jd1.pdf

51 <http://www.senasa.gov.ar/Archivos/File/File1011-tuberbov.pdf>

52 <http://www.senasa.gov.ar/Archivos/File/File1443-mlab.pdf>.

- 53 Imperiale, B. Di Giulio, B. Cataldi, A. Zumárraga, MJ. Morcillo, N. Congreso; Congreso Argentino Microbiología; 2010. [on line] https://www.conicet.gov.ar/new_scp/detalle.php?keywords=&id=47568&congresos=yes&detalles=yes&congr_id=7833433
- 54 Jorgensen, JB. An Improved medium for culture of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine faeces. Acta vet. Scand. 1982; 23, 325-335.
- 55 Jorgensen, JB. Pathogenicity and immunogenicity of atypical micobacteria for calves: a short summary. Rev Infect Dis.1981;3:979-980.
- 56 Jubb, TF. Sergeant, ES. Callinan, AP. Galvin, J. Estimate of the sensitivity of an ELISA used to detect Johnne's disease in Victorian dairy cattle herds Aust Vet J 2004; 82:569-573.
- 57 Kalis, CH. Collins, MT. Hesselink, JW. Barkema, HW. Specifity of two tests for early diagnosis of bovine paratuberculosis based on cell-mediated immunity: the Johnin skin test and the gamma interferon assay. Veterinary Microbiology 2003; 97: 73-86.
- 58 Kirschner, P. Böttger, EC. Mycobacteria protocols metohods in molecular biology. Edited By T. Parish and N.G. Stocker, Humana Press inc. Totowa, New Jersey.1998; Vol.101:349-361.
- 59 Kopecky, KE. Booth, GD. Merkal, RS. Larsen, AB. Hematologic changes associated with intravenous Johnin testing in cattle. Am J Vet Res 1971; 32: 1343-1347.
- 60 Körmendy, B. Diagnostic value of mammalian, avian and johnin PPD tuberculins in cattle herds infected by *Mycobacterium paratuberculosis*. Acta Vet Hung 1988; 36: 177-183.
- 61 Kurade, NP. Tripathi, BN. Lymphoproliferative response and its relationship with histological lesions in experimental ovine paratuberculosis and its diagnostic implications. Vet Res Commun. 2008; 32(1):107-19.
- 62 Larsen, AB. Vardaman, TH. The effect of isonicotinic acid hydrazide on *Mycobacterium paratuberculosis*. J Am Vet Med Assoc 1953; 122: 309-310.
- 63 Larsen, AB. Merkal, RS. Vardaman, TH. "Survival time of *Mycobacterium paratuberculosis*." American journal of veterinary research vol. 17,64;1956: 549-51.
- 64 León, EA. Duffy, SJ. En: Temas de Zoonosis III – 1ra Ed. Pag 416-422. Asociación Argentina de Zoonosis. 2006. ISBN 987-97038-2-0
- 65 Lombard, JE. Garry, FB. McCluskey, BJ. Wagner, BA. Risk of removal and effects on milk production associated with paratuberculosis status in dairy cows. J Am Vet Med Assoc.2005;227:1975-1981.
- 66 Mació, M. Martino, F. Martino, C. Tonini, F. Magnano, G. Sticotti,E. Macias, A. Schneider, M. Montechiari, K. Griffa, N. Experiencia a campo de variaciones en la respuesta celular y humoral en tuberculosis bovina. 2021. [on-line] <https://www.aavld.org.ar/wp->

content/uploads/2021/11/XXIII REUNIÓN CIENTÍFICA 89 CNICAAVLD2021-RES AMENES.pdf

67 Manca Bitti, ML. Masala, S. Capasso, F. Rapini, N. Piccinini, S. Angelini, F. Pierantozzi, A. Lidano, R. Pietrosanti, S. Paccagnini, D. Sechi, LA. Mikkelsen H, Aagaard C, Nielsen SS. *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in an Italian Cohort of Type 1 Diabetes Pediatric Patients. Clin Dev Immunol. 2012:785262.

68 Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 5th edition, 2004. Chapter 2.3.3. Bovine Tuberculosis. [Online] http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/A_00054.htm

69 Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 5th edition, 2004. Chapter 2.2.6. [Online] http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/a_00045.htm

70 Manual OIE. Paratuberculosis (enfermedad de Johne). 2014. [Online] http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.01.11_Paratuberculosis.pdf

71 Marais, BJ. Buddle, BM. de Klerk-Lorist, LM. Nguipdop-Djomo, P. Quinn, F. Greenblatt, C. "BCG vaccination for bovine tuberculosis; conclusions from the Jerusalem One Health workshop." Transboundary and emerging diseases vol. 66,2. 2019: 1037-1043.

72 Marassi, CD. Silva, M. Oelemann, WM. de Souza Fonseca, L. Ristow, P. Lilenbaum, W. An alternative for the preadsorption step in the paratuberculosis serodiagnosis: *Mycobacterium fortuitum*. Braz J Microbiol. 2008; 39(3): 511-513.

73 Marcipar, IS. Risso, MG. Silber, AM. Maduración de anticuerpos en ratas infectadas con *Trypanosoma cruzi*. Clin Diagn Lab Immunol. 2001; 8: 802 - 805.

74 Marfil, MJ. Tuberculosis Bovina: Transmisibilidad de Cepas de *Mycobacterium bovis* y Detección de Micobacterias En Menudencias Comercializadas En Bocas de Expendio de Carne (Spanish). [Bovine Tuberculosis: Transmissibility of *Mycobacterium bovis* strains and detection of mycobacteria in giblets sold in meat outlets (English)]. Universidad de Buenos Aires, 2019.

75 Marfil, MJ. Garbaccio, SG. Barandiaran, S. Huertas, PS. Vivot, MM. Eirin, ME. Zumárraga, MJ. Aislamiento de micobacterias no tuberculosas de pulmones crudos bovinos comprados en carnicerías. Patógenos y enfermedades transmitidas por los alimentos, 2021, 18 (11), 805-811.

76 Maroudam, V. Mohana, SB. Praveen, KP. Dhinakar, RG. Paratuberculosis: diagnostic methods and their constraints. J Veterinar Sci Technol. 2015; 6:5. doi: 10.4172/2175-7579.1000259.

77 Martinson, SA. Hanna, PE. Ikede, BO. Lewis, JP. Miller, LM. Keefe, GP. McKenna, SL. Comparison of bacterial culture, histopathology, and immunohistochemistry for the diagnosis of Johne's disease in culled dairy cows. J Vet Diagn Invest, 2008, 20(1):51-7.

- 78 Matlova, L. Dvorska, L. Bartl, J. Bartos, J. Ayele, WY. Alexa, M. Pavlik, I. *Mycobacteria* isolated from the environment of pig farms in the Czech Republic during the years 1996–2002. *Vet. Med. Czech.* 2003, 48, 343–357.
- 79 Matthews, C. Cotter, PD. O'Mahony, J. MAP, la enfermedad de Johne y el microbioma; conocimiento actual y consideraciones futuras. *anim microbioma.*2021; 3, 34.
- 80 Matthews, C. Cotter, PD. O'Mahony, J. "MAP, Johne's disease and the microbiome; current knowledge and future considerations." *Animal microbiome* vol. 3,1 34. 7 May. 2021, doi:10.1186/s42523-021-00089-1
- 81 Merkal, RS. Larsen, AB. Clofazimine treatment of cows naturally infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am J Vet Res* 1973; 34: 27-28.
- 82 Merkal, RS. Diagnostic methods for detection of paratuberculosis (Johne's disease). 74th Annual Meeting of the US Animal Health Association, USA, 1970, Abstract 74, p. 620-623.
- 83 Merkal, RS. Paratuberculosis. In: *The Mycobacteria: A Sourcebook*, Kubica G.P. & Wayne L.G., eds. Marcel Dekker, New York, USA, 1 984; p 1237–1249.
- 84 Milner, AR. Lepper, AWD. Symonds, WN. Gruner, E. Analysis by elisa and Western blotting of antibody reactivities in cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis* after absorption of serum with *M. phlei*, *Research in Veterinary Science*, Vol. 42, Issue 2,1987, Pages 140-144, ISSN 0034-5288, [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(18\)30675-1](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(18)30675-1).
- 85 Momotani, E. Whipple, D. Thiermann, A. Cheville, N. Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches in calves. *Veterinary Pathology Online* 1988; 25: 131–137.
- 86 Moreira, AR. Paolicchi, F. Morsella, C. Zumarraga, M. Cataldi, A. Fabiana, B. Alicia, A. Piet, O. van Soelingen, D. Isabel, RM. Distribution of *IS900* restriction fragment length polymorphism types among animal *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* isolates from Argentina and Europe. *Vet Microbiol* 1999; 70: 251-259.
- 87 Moreira, AR. Späth, EGA. Morsella, C. Seroprevalence of Johne's disease in eleven districts of Buenos Aires, Argentina. *The Paratuberculosis Newsletter* 1994; 6:18.
- 88 Morsella, M. Paolicchi, F. Aplicación de métodos de diagnóstico y control de Paratuberculosis en Argentina. 2008. https://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_en_general/105-PTBC_en_Argentina.pdf
- 89 Nielsen, SS. Toft, N. Age-Specific Characteristics of ELISA and Fecal Culture for Purpose-Specific Testing for Paratuberculosis. *J. Dairy Sci.* 2005, 89: 569-579.
- 90 Nielsen, SS. Possibilities for intervention against paratuberculosis in Danish dairy herds. *Acta Vet Scand.* 2003; 44: 289-90.

- 91 Norby, BO. Fosgate Geoffrey, T. Manning Elizabeth, JB. Collins, MT. Roussel, AJ. "Environmental mycobacteria in soil and water on beef ranches: association between presence of cultivable mycobacteria and soil and water physicochemical characteristics." *Veterinary microbiology* vol. 124,1-2; 2007: 153-9. doi:10.1016/j.vetmic.2007.04.015
- 92 Oriani, DS. Marfil, MJ. Zumarraga, M. Baldini, M. Prevalence and species diversity of nontuberculous mycobacteria in drinking water supply system of Bahia Blanca City, Argentina. *Int J Mycobacteriol* 2019;8:138–145.
- 93 Oriani, DS. Dubarry, JR. Errea, AL. Vera, OA. Maria, A. Cavagión, LJ. Staskevich, AS. Asociación Entre El Diagnóstico de Tuberculosis Bovina Por Intradermorreacción, La Anatomopatología, La Bacteriología y La Posible Interferencia Con Micobacterias Ambientales (Spanish) [Association between the Diagnosis of Bovine Tuberculosis by Intradermal Reaction, the Anatomopathology, Bacteriology and Possible Interference with Environmental Mycobacteria (English)]. *Ciencia Veterinaria* 2011;13:42–47.
- 94 Oriani, DS. Sagardoy, MA. Nontuberculous mycobacteria in soils of La Pampa Province (Argentina). *Rev Arg Microbiol.* 2002; 34: 132- 137.
- 95 Osterstock, JB. Fosgate, GT. Norby, B. Manning, EJ. Collins, MT. Roussel, AJ. Contribution of environmental mycobacteria to false-positive serum ELISA results for paratuberculosis. *J Am Vet Med Assoc.* 2007; 230(6):896-901.
- 96 Paolicchi, F. Cirone, K. Morsella, C. Gioffré, A. First isolation of *Mycobacterium avium subsp paratuberculosis* from commercial pasteurized milk in Argentina. *Braz J Microbiol* 2012; 43: 1034-1037.
- 97 Paolicchi, F. Morsella, C. Verna, A. Spath, E. Martinis, D. Zumárraga, M. Giofree, A. Cataldi, A. Romano, M. Diagnosis, epidemiology, and Program of control of Paratuberculosis in bovine herds of Argentina. 7th International Colloquium on Paratuberculosis. S7. P1 2002; 114: 132.
- 98 Pavlik, I. Matlova, L. Dvorska, L. Bartl, J. Oktabcova, L. Docekal, J. Parmova, I. Tuberculous lesions in pigs in the Czech Republic during 1990-1999: occurrence, causal factors and economic loses. *Veterinarni Medicina*, 2003; 48, 113–125.
- 99 Pavlik, I. Matlova, L. Dvorska, L. Shitaye, JE. Parmova, I. Mycobacterial infections in cattle and pigs caused by *Mycobacterium avium complex* members and atypical mycobacteria in the Czech Republic during 2000–2004. *Veterinarni Medicina.* 2005; 50, 281–290.
- 100 Pérez, V. García Marín, JF. Badiola, JJ. Description and classification of different types of lesión associated with natural paratuberculosis infection in sheep. *J Comp Pathol.* 1996; 114: 107-122.
- 101 Pfeiffer, DU. *Veterinary Epidemiology-An Introduction*, Editado por la Agencia de Cooperacion Internacional del Japon (JICA), Proyecto de Veterinarios del Sur (PROVETSUR) y La Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata. Argentina 2002; p 1-65. 150

- 102 Rățoi, IA. Oșlobanu, LE. Aniță, AE. Aniță, DC. Savuța, G. Nontuberculous mycobacteria and their diversity in the field of veterinary infectious diseases. Rev Rom Med Vet. 2020. 30 | 1: 53-60.
- 103 Romero, MA. Alvarado Pinedo, MF. Peralta, LM. Moyano, RD. Santangelo, MDLP. Travería, GE. Medio de cultivo líquido para el diagnóstico de paratuberculosis bovina. Aplicación y análisis comparativo con el medio de Herrold: resultados preliminares. 2018. [on line] <https://revistas.unlp.edu.ar/analecta/issue/view/430/Analecta%20Vet%2038%281%29%2C2018>
- 104 Rosenbusch, F. La enfermedad de Johne o enteritis paratuberculosa del bovino en la Argentina. Anales de la Sociedad Rural Argentina 1937; 5: 475-480.
- 105 Roussel, AJ. Fosgate, GT. Manning, EJ. Collins, MT. Association of fecal shedding of mycobacteria with high ELISA-determined seroprevalence for paratuberculosis in beef herds. J Am Vet Med Assoc. 2007; 230(6):890-5.
- 106 Runyon, EH. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. Med Clin North Am 1959; 43: 273-290.
- 107 Sager, H. Gloor, M. Bjorkman, C. Evaluación de la avidéz de anticuerpos en ganado que aborta mediante un ELISA somático de avidéz de IgG de antígeno de taquizoito de *Neospora caninum*. Vet Parasitol. 2003; 112: 1 - 10.
- 108 Savage, IR. Nonparametric statistics. JASA 1957; 52: 332-333.
- 109 Sherman, DM. Bray, B. Gay, JM. Bates, F. Evaluation of the agar gel immunodiffusion test for diagnosis of subclinical paratuberculosis in cattle. Am J Vet Res 1989; 50: 525-530.
- 110 Sherman, DM. Markham, RJF. Bates, F. Agar gel immunodiffusion test for diagnosis of clinical paratuberculosis in cattle. JAVM 1984; 185: 179-182.
- 111 Sherman, DM. Gay, JM. Bouley, DS. Nelson, GH. Comparison of the complementfixation and agar gel immunodiffusion tests for diagnosis of subclinical bovine paratuberculosis. Am J Vet Res 1990; 50: 461-465.
- 112 Sidoti, F. Banche, G. Astegiano, S. Allizond, V. Cuffini, AM. Bergallo, M. "Validation and standardization of IS900 and F57 real-time quantitative PCR assays for the specific detection and quantification of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*." Canadian journal of microbiology vol. 57,5 .2011; 347-54. doi:10.1139/w11-022
- 113 Silva Fuente-Alba, C. Molina Villagra, M. Likelihood ratio (razón de verosimilitud): definición y aplicación en Radiología, Revista Argentina de Radiología, Volume 81, Issue 3, 2017, Pages 204-208, ISSN 0048-7619, <https://doi.org/10.1016/j.rard.2016.11.002>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048761916301910>)
- 114 Silva, LC. Benavides, A. El enfoque bayesiano: otra manera de inferir. Gac Sanit 2001; 15: 341 -346. 152

- 115 Smith, RL. Schukken, YH. Pradhan, AK. Smith, JM. Whitlock, RH. Van Kessel, JS. Wolfgang, DR. Grohn, YT. Environmental contamination with *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in endemically infected dairy herds, Preventive Veterinary Medicine, Vol. 102, Issue 1,2011, Pages 1-9.
- 116 Sockett, DC. Conrad, TA. Thomas, CB. Collins, MT. Evaluation of four serological test for bovine paratuberculosis. J Clin Microbiol.1992;30:1134-1139.
- 117 Späth, EJA. Entrocasso, CM. Plorutti, F. Manazza, JA. Brusca, G. Faverín, C. Enfermedades de los bovinos diagnosticadas por veterinarios en el centro-sur de Buenos Aires, años 2001 a 2007. Boletín técnico Estación Experimental Agropecuaria Balcarce INTA. 2012; 1 61 : 1-40 [Online] http://inta.gob.ar/documentos/enfermedades-de-los-bovinos-diagnosticadas-porveterinarios-en-el-centro-sur-de-buenos-aires.-anos-2001-2007/at_multi_download/file/INTA_Boletin161PIP.pdf
- 118 Stabel, JR. Bannantine, JP. Development of a nested PCR method targeting a unique multicopy element, *ISMap02*, for detection of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in fecal samples. J Clin Microbiol 2005; 43: 4744–4750.
- 119 Stabel, JR. Kimura, K. Robbe-Austerman, S. Augmentation of secreted and intracellular gamma interferon following johnin purified protein derivative sensitization of cows naturally infected with *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*. J Vet Diagn Invest 2007; 19: 43–51. 153
- 120 Stabel, JR. Pearce, L. Chandler, R. Hammer, P. Klinjn, N. Cerf, O. Collins M. Heggum, C. Murphy, P. Destruction by heat of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk and milk products. Bull Int Dairy Fed 2001; 362: 53-60.
- 121 Stabel, JR. An improved method for cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples and comparison to three other methods. J Vet Diagn Invest 1997; 9: 375-380.
- 122 Stabel, JR. Transitions in immune responses to *Mycobacterium paratuberculosis*. Veterinary microbiology 2000; 77: 465–473.
- 123 Stabel, JR. Production of gamma-interferon by peripheral blood mononuclear cells: an important diagnostic tool for detection of subclinical paratuberculosis. J Vet Diagn Invest 1996; 8: 345-350.
- 124 Telenti, A. Marchesi, F. Balz, M. Bally, F. Böttger, EC. Bodmer, T. Identificación rápida de micobacterias a nivel de especie mediante la reacción en cadena de la polimerasa y el análisis de enzimas de restricción. J Clin Microbiol. 1993 Feb; 31 (2): 175-178.
- 125 Thirunavukkarasu, S. de Silva, K. Plain, KM. Whittington, RJ. Role of host-and pathogen-associated lipids in directing the immune response in mycobacterial infections, with emphasis on *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*. Crit Rev Microbiol 2014; 28: 1 -13.
- 126 Thorel, MF. Identification of *Mycobacterium paratuberculosis*. In: Paratuberculosis: Diagnostic Methods, Their Practical Application and Experience

with Vaccination. Commission of the European Communities Agriculture Publication, Luxembourg, 1984; 61–64.

127 Timpe, A. Runyon, EH. The relationship of atypical acid-fast bacteria to human disease; a preliminary report. *J Lab Clin Med* 1954; 44: 202-209.

128 Torres, PM. Las pruebas tuberculínicas en el ganado bovino SENASA 2012; 1-16. [Online] <http://www.senasa.gov.ar/Archivos/File/File1014-101.pdf>

129 Torres, PM. situación de la tuberculosis bovina en la republica argentina. [on line] https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/situacion_tuberculosis_bovina_rep_argentina_2016.pdf

130 Tortone, CA. Oriani, DS. Staskevich, AS. Oriani, AS. Gino, LM. Marfil, MJ. Nava Vargas, A. Gioffré, AK. Zumárraga, MJ. [Diversidad de especies de micobacterias no tuberculosas aisladas de ambientes acuáticos de la ciudad de General Pico, Provincia de La Pampa (Argentina)]. *Revista Argentina de Microbiología*. Julio - septiembre de 2019; 51 (3): 259-267. DOI: 10.1016 / j.ram.2018.08.005. PMID: 30579706.

131 Travería, GE. Zumarraga, M. Etchehoury, I. Romano, MI. Cataldi, A. Alvarado Pinedo, MF. Pavlik, I. Pribylova, R. Romero, JR. First identification of *Mycobacterium avium paratuberculosis* sheep strain in Argentina. *Braz J Microbiol* 2013; 44: 897-899.

132 Travería, GE. Análisis antigénico del *Mycobacterium paratuberculosis* y diagnóstico de la paratuberculosis bovina mediante enzimo inmuno ensayo (ELISA). Tesis doctoral Universidad Nacional de La Plata; 2003.

133 Traversa, MJ. Jorge, MC. Garbaccio, S. Draghi, MG. Abdala, A. Tarabla, H. Schneider, M. Magnano, G. Zumárraga, M. Rodríguez, L. Huertas, P. Paolicchi, F. Morsella, C. Report of mycobacteria isolated from domestic and wildlife species during 2004–2008 [Micobacterias Aisladas de Especies Domésticas y Silvestres Durante 2004–2008]. *Analecta Veterinaria* 2011;31:10–14.

134 Valdés, F. Cid, A. Revisión: Micobacterias atípicas. *Actas Dermosifiliogr* 2004;95(6):331-57

135 Valentin-Weigand, P. Goethe, R. Pathogenesis of *Mycobacterium subspecies paratuberculosis* infections in ruminants: still more questions than answers. *Review. Microbes and Infection* 1999; 1: 1121-1127.

136 Whipple, DL. Callihan, DR. Jarnagin, JL. Cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal specimens and a suggested standardized procedure. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 1991; 3(4):368–73. doi: 10.1177/104063879100300424

137 Whitlock, RH. Buergelt, C. Preclinical and Clinical Manifestations of Paratuberculosis (Including Pathology). *Vet Clin of North Am: Food Animal Practice* 1996; 12: 345-355.

138 Whitlock, RH. Rosenberger, AE. Sweeney, RW. Hutchinson, LJ. Culture techniques and media constituents for the isolation of *Mycobacterium*

paratuberculosis from bovine fecal samples. Chiodini, R.J. and Kreeger, J.M., Ed. Proceedings of the Third International Colloquium on Paratuberculosis 1991; pp: 94-111.

139 Whitlock, RH. Sweeney, RW. T Fyock, AD. MAP Super-Shedders: Another Factor in the Control of Johne's Disease. Proceedings of the 8th International Colloquium on Paratuberculosis, 2005, Copenhagen, Denmark. p. 164.

140 Whitlock, RH. Wells, SJ. Sweeney, RW. Van Tiem, J. ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. Vet Microbiol 2000; 20: 387-398.156

141 Whittington, RJ. Marshall, DJ. Nicholls, PJ. Marsh, IB. Reddacliff, LA. Survival and dormancy of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in the environment Appl Environ Microbiol 2005; 5: 2989-3004.

142 Whittington, RJ. Whittington, AM. Waldron, A. Begg, DJ. de Silva, K. Purdie, AC. Plain, KM. Development and validation of a liquid medium (M7H9C) for routine culture of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* to replace modified Bactec 12B medium. J Clin Microbiol 2013, 51:3993-4000.

143 Yokomizo, Y. Hiramune, T. Isayama, Y. Antibodies Produced in a Cow Naturally Infected with Johne's Disease. Nat Inst Anim Hlth Quart 1970; 10: 137-142.

144 Yokomizo, Y. Kishima, M. Mori, Y. Nishimori, K. Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in Comparison with Complement Fixation Test for the Diagnosis of Subclinical Paratuberculosis in Cattle. J Vet Med Sci 1991; 53: 577-584.

145 Yokomizo, Y. Merkal, RS. Lyle, PAS. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine immunoglobulin G1 antibody to a protoplasmatic antigen of *Mycobacterium paratuberculosis*. Am J Vet Res 1983; 44: 2205-2207.

146 Yokomizo, Y. Yugi, H. Merkal, RS. A method for Avoiding False-Positive Reactions in an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the Diagnosis of Bovine Paratuberculosis. Jpn J Vet Sci 1984; 47: 111 -119.157

147 Yokomizo, Y. Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Using *Mycobacterium phlei* Absorbed Serum for the Diagnosis of Bovine paratuberculosis in a Field Study. JARQ 1986; 20: 60-67.

7. ANEXOS

Anexo I

Coloración de Ziehl-Neelsen

Reactivos:

- Fucsina fenicada de Ziehl

Solución A: Fucsina básica.....	1 g
Alcohol etílico de 96°.....	10 mL
Solución B: Fenol cristalizado	5 g
o fenol fundido.....	4,66 mL
Agua destilada.....	95 mL

Volcar gradualmente la solución A en la B agitando enérgicamente, dejar reposar algunos días. Filtrar antes de usar.

- Azul de Metileno alcalino de Loeffler (solución saturada)

Azul de metileno.....	0,3 g
Alcohol etílico de 96°.....	30 mL

Solución de OHK:

OHK.....	0,01 g
Agua destilada.....	100 mL

Mezclar la solución saturada de azul de metileno en esta solución de OHK. Filtrar antes de su empleo.

-Alcohol ácido (solución decolorante)

CIH concentrado.....	3 mL
Alcohol etílico de 95°.....	97 mL

Técnica de coloración:

1. Cubrir el frotis con fucsina de Ziehl y se calienta con el fuego de un hisopo de algodón embebido en alcohol, evitar la evaporación agregando más colorante si fuera necesario, impedir así mismo, que el colorante hierva.
2. Lavar con agua corriente.
3. Decolorar con alcohol ácido evitando que queden cúmulos de colorante.
4. Lavar con agua corriente.
5. Hacer una coloración de contraste con azul de metileno durante 1 minuto.
6. Lavar con agua se seca y se observa en inmersión.

Interpretación:

Microorganismos ácido alcohol resistentes: Rojos - fucsia

Microorganismos no ácido alcohol resistentes: Color del contracolorante (azul)

Anexo II

ELISA Indirecto de Paratuberculosis

Se describe la preparación de las diferentes soluciones de trabajo y se detalla las diferencias entre el ELISA indirecto clásico y el ELISA abreviado.

-Solución de antígeno

Bicarbonato de sodio (Na HCO₃)3 g
 Carbonato de sodio (Na₂ CO₃).....1,45 g
 Agua tridestilada 1000 mL
 pH: 9,5 – 9,6

El antígeno sólido (recién comprado) se disuelve en agua destilada a razón de 500 µg por alícuota (una placa) en 100 µL de agua destilada. Identificar cada vial y congelar en freezer. Al momento de la preparación cada vial se diluye en 12 mL de solución de antígeno.

Si se utiliza el antígeno con la bacteria entera formolada, se puede agregar entre 31 – 250 µg de bacilo por pocillo.

Para 100 µg s de bacilo/100 µL/pocillo calcular:

Si 1 pocillo (100 µL) ----- 100 µg de bacilo

Para 1 placa que lleva ----- X = 12000 µg (12 mg)

12 mL (12000 µL)

Para el ELISA clásico actualmente se utiliza una dilución de antígeno de 1/160: agregamos a 25 mililitros de solución de antígeno 156 µL de antígeno. Para el ELISA abreviado se utiliza una dilución de antígeno de 1/486: agregamos a 12 mililitros de solución de antígeno 25 µL de antígeno.

- ELISA-PBS y solución de lavado

Cloruro de sodio8,5 g
 Fosfato de sodio monobásico (anhidro)0,32 g
 163
 Fosfato de sodio dibásico (anhidro).....1,1 g
 Con 2M H₂O.....1,38 g
 Tween 200,5 mL
 Agua tridestilada..... 1000 mL
 pH: 7,2
 Autoclavar

- Solución bloqueante

Es la solución de ELISA PBS con el agregado de gelatina.

Gelatina bacteriológica.....2 g/L

Calentar para disolver la gelatina.

pH: 7,2

La dilución de los sueros se realiza en la solución ELISA-PBS. De acuerdo al tipo de ELISA que se realiza seguimos como se describe a continuación:

- ELISA clásico: Actualmente se realiza la dilución final de los sueros de 1/800.

Se llega a esta dilución en dos pasos: primero se cargan 20 µL de suero y se diluye en 380 µL de solución de lavado PBS (acá tenemos una dilución de 1/20). Luego se toma 20 µL de la dilución anterior y se diluye en 780 µL de solución de

lavado de PBS (acá tenemos una dilución de 1/40, al multiplicar por la dilución anterior de 1/20 llegamos a la dilución final de 1/800).

- ELISA abreviado: Actualmente se realiza la dilución final de los sueros de 1/180. Para obtener esta dilución se carga 6 µL de suero y se diluyen en 994 µL de solución ELISA-PBS.

- Conjugado

Se trabaja con el conjugado marca Sigma; se encuentra congelado a -20°C, con glicerina en una dilución 1/2, en viales identificados como Ig G conjugado. Actualmente se prepara una dilución de 1/2500.

Para 24 µL de solución de lavado ELISA-PBS se carga 20 µL de conjugado con glicerina.

- Solución reveladora

Ácido cítrico.....0,96 g
 Citrato de sodio1,20 – 1,62 g
 ABTS.....20 mg
 Agua oxigenada 30%25 µL
 Agua destilada.....100 mL
 pH: 5

Procedimientos generales:

1. Preparar el antígeno y agregar a cada pocillo 100 µL. Dejar incubar la placa en heladera toda la noche.
2. Lavar tres veces con solución de lavado ELISA-PBS.
3. Agregar 200 µL por pocillo de solución de bloqueo. Incubar 30 minutos en estufa de 37°C.

4. Lavar tres veces con solución de lavado PBS.

5. Agregar 100 µL por pocillo de las muestras diluidas y de los controles por duplicado según el esquema de siembra a utilizar.

ELISA clásico: Incubar 1 hora en estufa a 37 °C.

ELISA abreviado: Incubar 30 minutos a temperatura ambiente.

6. Lavar tres veces con solución de lavado PBS. **Aclaración:** Cuando se realiza el ELISA urea, después del lavado se incorporaron 100 µl de solución de urea 8 M por pocillo, según el esquema de siembra, incubándose a temperatura ambiente durante 4 minutos. A continuación, el conjugado anti-IgG bovina.

7. Agregar 100 µL por pocillo de conjugado 1/2500. Para el ELISA clásico incubar 1 hora en estufa a 37°C. Para el ELISA abreviado, incubar 30 minutos a temperatura ambiente.

8. Lavar tres veces con solución de lavado PBS.

9. Agregar 100 µL por pocillo de solución reveladora. Incubar 30 minutos aproximadamente al resguardo de la luz.

10. Realizar la lectura en el lector de ELISA, utilizar un filtro de 405 nm. Leer hasta por lo menos llegar a 1000 de DO de los controles positivos.

Comentario: En el ELISA urea, para obtener un valor asociado al porcentaje de positividad de la muestra analizada en relación con los controles (PPRC) se realizó un cálculo a partir de la densidad óptica (DO) promedio obtenido en cada muestra. A través de la siguiente fórmula:

$$\text{PPRC} = \frac{(\text{DO muestra} - \text{Do control negativo})}{(\text{DO control positivo} - \text{DO control negativo})} \times 100$$

PPRC= Porcentaje de positividad en relación con los controles.

DO= Densidad óptica del suero.

Anexo III

- Medio de cultivo de Herrold con Micobactina

Cloruro de sodio.....	4,5 g
Peptona de carne.....	9,0 g
Extracto de carne bovina.....	2,7 g
Piruvato de sodio.....	4,1 g
Agar.....	15,3 g
Glicerina.....	34 mL
Agua destilada.....	840,9 mL
Yemas de huevo frescas 1.....	10 (120 mL)
Verde de Malaquita (solución al 2%) 2.....	5,1 mL
Micobactina.....	2 mg
Antibióticos:	
Anfotericina	50 mg
Ácido nalidíxico.....	100 mg
Vancomicina.....	100 mg

1: Los huevos deben ser frescos, preferentemente de granja, para asegurarse que las gallinas no hayan consumido antibióticos. Lavar con agua tibia y detergente y enjuagar con agua corriente. Dejar secar y sumergirlos en alcohol etílico 70° durante 15 minutos. Los siguientes procedimientos se realizan en la cabina de un flujo laminar vertical, secar la superficie de los huevos suavemente con la llama de un mechero. Quebrar cada huevo por un extremo golpeando en un borde de un vaso de precipitado estéril, y sacar la clara con la ayuda de la gravedad y volcarla en el mismo vaso. Colectar la yema en otro vaso de precipitado. Repetir el proceso para cada huevo, con pipeta de vidrio con la punta rota aspirar algún resto de clara presente y finalmente mezclar las yemas con ayuda de una varilla de vidrio estéril.

2: Preparar una solución de verde de Malaquita al 2% pesando 2 g de colorante (forma oxálica) en 100 mL de agua destilada, fraccionar en tubos con tapa y esterilizar en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

3: La micobactina se conserva en heladera fraccionada en la cantidad de 2 mg que es suficiente para preparar 1 litro de medio de Herrold, al momento de su uso disolver en 1 mL de alcohol etílico 96°.

4: Los antibióticos se encuentran fraccionados de acuerdo a la dosis y conservados a -20°C y se deben resuspender al momento de su uso. La vancomicina se suspende en 1 mL de agua destilada estéril, mientras que el ácido nalidíxico y la anfotericina se suspenden en alcohol etílico 96°.

Método de preparación:

Mezclar por agitación todos los ingredientes (excepto las yemas y el colorante) hasta que se disuelva el agar en un erlenmeyer con capacidad de 2 litros. Medir el pH y, de ser necesario, ajustar a 7,5 con hidróxido de sodio 1N. Esterilizar en autoclave durante 25 minutos a 120°C. Enfriar a 56°C y agregar las 6 yemas en forma estéril, mezclar el medio suavemente en un agitador magnético. Agregar la solución de Verde de Malaquita con una pipeta estéril, agregar los antibióticos y mezclar otra vez. Distribuir asépticamente el medio en los tubos o frascos y dejar que solidifique en ellos en posición inclinada. Controlar la esterilidad incubando

en estufa a 37°C durante 48 horas. Conservar en heladera.

- Solución decontaminante de cloruro de hexadecilpiridinio (CHP)

Cloruro de hexadecilpiridinio.....	9 g
Caldo cerebro corazón	18,5 g
Agua destilada.....	1000 mL

Método de preparación:

Mezclar por agitación y fraccionar en frascos un volumen de esta solución de 25 mL. Esterilizar en autoclave a 120°C durante 20 minutos. Conservar a temperatura ambiente.

- Mezcla de antibióticos

Anfotericina B.....	50 mg
Vancomicina.....	100 mg
Ácido nalidíxico.....	100 mg
Medio de caldo cerebro corazón al 50%.....	1000 mL

Método de preparación:

El caldo se prepara y se autoclava a 120°C durante 20 minutos. Una vez enfriado se le agregan los antibióticos en cabina de esterilidad. Se fracciona y congela hasta su uso.

A continuación (imagen) se muestran los ingredientes de los medios de cultivo clásicos (A: Middlebrook M7H9 caldo) y C (Herrold con micobactina), y el medio (B) modificado por Romero y col, 2018, con el agregado de agar al 0,185%, nistatina y ácido nalidixico.

Ingredientes	A	B	C
base medio M7H9C	3,1 g	3,1 g	
albúmina bovina	1,34 g	1,6 g	
dextrosa	0,52 g	0,64 g	
catalasa	0,8 mg	0,96 mg	
Bacto Casitone®	666 mg	680 mg	
cloruro de sodio	0,22 g	0,22 g	15,3 g
yema de huevo	167 ml	170 ml	120 ml
Micobactina J*	0,8 mg	1 mg	2 mg
Panta plus®	30 ml	30 ml	
ácido nalidixico		200 mg	100 mg
nistatina		800 mg	400 mg
vancomicina			100 mg
agar		1,8 g	15,3 g
peptona de carne			9 g
piruvato de sodio			4,1 g
extracto de carne			2,7 g
glicerol			34 ml
verde de malaquita al 2 %			5,2 ml
agua tridestilada	800 ml	770 ml	840,9 ml

El medio B sin micobactina, sin antibióticos y pH neutro, se utilizó para el cultivo de las MA.

Anexo IV

Preparación del agar para la prueba de inmunodifusión en gel de agar (AGID)

-Solución Buffer Borato

OHNa.....2g

Ácido Bórico.....9g

Agua destilada.....1000 mL

pH: 8.6 (8.4-8.6)

Esta solución buffer debe conservarse en heladera bien tapada para evitar la concentración por evaporación. El ácido bórico es bacteriostático y su presencia en el bufferes crítica especialmente en el caso de sueros contaminados.

- Preparación del gel de agar al 1%

Disolver 1 gramo de agar (utilizar agar noble de alta pureza, Agar-Agar) en 100 mL del buffer borato anteriormente preparado. Llevar la suspensión a ebullición y esperar que se alcance la mayor transparencia. El agar de base debe ser purificado para que permita ver perfectamente las líneas de precipitación.

Anexo V

Preparación de caldo glicerinado para obtención de cepa D4ER de *Mycobacterium avium*: Para la elaboración del caldo se tomó como base el protocolo sugerido por Bernardelli (2007).

Medio de caldo glicerinado

Extracto de carne.....	5 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5 g
Peptona Difco ó similar.....	1,5 g
Glicerina	70 mL
Agua destilada.....	1000 mL

Disolver las drogas en agua caliente. Fraccionar en botellas de vidrio y esterilizar en autoclave a 125°C – 130°C, durante 20 minutos, dejar enfriar. Luego se realizó la siembra de la cepa y su incubación en estufa a 37°C durante 2-3 meses. La cosecha del cultivo obtenido se realizó en cabina de seguridad de tipo II, el cultivo se filtró y se fraccionó en frascos que se inactivaron por gamma irradiación. Posteriormente las micobacterias fueron procesadas con un disruptor celular a una presión de 40 psi, el lisado celular se centrifugó a 10.000 G durante 20-30 minutos, y el sobrenadante se utiliza como antígeno.

Anexo VI

Medio de cultivo sólido utilizando como base al medio Middlebrook 7H10 Agar (DIFCO/BD ®).

Modificaciones sobre medio base: Para la preparación de 500 ml se agregaron los componentes que figuran a continuación.

- Huevo (yema) 80 mL
- Dextrosa 2 gr
- Albúmina 5 gr

La elaboración incluye el autoclavado del medio Middlebrook y la dextrosa. Posteriormente se le agregó el huevo y la albumina en el flujo laminar.

Anexo VII

Pruebas bioquímicas:

Prueba de ureasa:

Determina la capacidad del organismo para desdoblar la urea formando dos moléculas de amoníaco por acción de la enzima ureasa, que está clasificada como una amidasa, es decir que cataliza la hidrólisis de las amidas, es capaz de romper la unión entre el carbono y el nitrógeno.

Procedimiento: Con el anza, agregar al tubo colonias de un cultivo joven en medio de huevo. No arrastrar medio de cultivo. Incubar 3 días a 37 °C.

Interpretación La aparición de color rosa se interpreta como resultado positivo. Controles *M. kansasii*, *M. scrofulaceum*: positivo. *M. avium*: negativo.

Reducción de nitratos:

La presencia de la enzima nitrato reductasa es importante para la clasificación de las micobacterias: *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. fortuitum* las que reducen nitratos a nitritos. Otras especies producen también nitrato reductasa tales como: *M. flavescens*, *M. terrae*, *M. triviale* y *M. chelonae*. Las micobacterias que contienen esta enzima pueden utilizar el oxígeno de los nitratos y de otros productos de reducción. La presencia de nitrito es detectada por la adición de sulfanilamida y N-naftiletildiamina a pH ácido. Si el nitrito está presente se forma un compuesto rojo de diazonio. La técnica se efectúa en cultivos de menos de un mes.

Medios y Reactivos: Buffer substrato de nitrato de sodio, ácido clorhídrico al 10 %, solución de sulfanilamida al 0.2 %, solución de N-naftiletildiamina al 0.1%.

Procedimiento: La reacción se realiza en tubos de 16 mm x 125 mm con tapa rosca, a los que se agregan 4 ó 5 gotas de agua destilada, luego se introduce con un anza aproximadamente 10 mg de masa bacilar, tratando de homogeneizar la mezcla. El substrato lo constituyen 2 mL de la solución de nitrato de sodio en buffer de fosfato. Se incuba la suspensión 2 horas a 37 °C. Al cabo de ese tiempo, acidificar con una gota de ácido clorhídrico dilución 10 %. Agregar 2 gotas de solución de sulfanilamida y 2 gotas de solución de N-naftiletildiamina.

Interpretación El desarrollo de color se produce entre 30 a 60 segundos. Si no se produce color se confirma el resultado como negativo por el agregado de pequeña cantidad de polvo de zinc. Si el color rojo desarrolla después del agregado de zinc, significa que el nitrato está todavía presente y es catalizado por el zinc con formación del color, por lo cual la reacción es verdaderamente negativa. Si el color no se produce después del agregado de zinc, repetir la técnica para confirmar la reacción.

Toma de hierro (transformación de citrato férrico amoniacal):

Medios y Reactivos Solución acuosa de citrato de hierro amoniacal al 4 %, esterilizada en autoclave.

Procedimiento Inocular 2 tubos de medio Löwenstein-Jensen, cada uno con 0,1 mL de una suspensión bacilar de aproximadamente 1 mg/mL de la cepa. Colocar los tubos inclinados, difundiendo la siembra en toda la superficie del medio. Luego en posición vertical y añadir en el fondo de uno de ellos 1 mL de la solución de citrato de hierro amoniacal. En el otro tubo, agregar 1 mL de agua destilada estéril. Incubar en posición vertical a 37 °C.

Interpretación: De ser la reacción positiva aparece en el tubo con citrato, entre la primera y la tercera semana de incubación, un color marrón que se va extendiendo a las colonias por encima del nivel del líquido. Se compara con el tubo control.

Controles *M. fortuitum*: positivo. *M. chelonae*: negativo.

Hidrolisis de Tween 80:

La hidrólisis enzimática del Tween 80 es una importante característica de la diferenciación de micobacterias. Con raras excepciones las especies que hidrolizan el Tween 80 en 10 días no son clínicamente significativas, por ej. el bacilo del agua de canilla *M. gastri*, *M. terrae* y *M. triviale*, mientras que las especies que tienen importancia clínica, *M. scrofulaceum* y el complejo *M. avium-intracellulare*, son negativas. El Tween 80 es la marca registrada del detergente: monoleato de polioxietileno sorbitan.

Medios y Reactivos Sustrato: Solución reguladora de buffer fosfato M/15, pH7, Tween 80 y rojo neutro.

Procedimiento: Suspender en el sustrato colonias de un cultivo joven en medio sólido (aproximadamente, el contenido de un anza de 3 mm de diámetro). Incubar a 37 °C, sin contacto con la luz. Examinar a los 5 y a los 10 días. Incubar un tubo control sin inóculo. Interpretación: Observar los tubos, comparativamente con el control de color ámbar. Se considera positivo un cambio de color a rosa salmón. Tomar nota de la fecha en que observa ese cambio de color y seguir incubando hasta completar los 10 días para confirmar; el color puede intensificarse a rosado más intenso y hasta rojo pajizo. Los tubos no deben ser agitados antes de la lectura. Algunas células pueden tomar el colorante, lo que provoca un color rosado en el sedimento del tubo, mientras que el sobrenadante continua ámbar; en estos casos el informe es negativo.

Controles: *M. kansasii*: rápido, positivo. *M. gordonae*: lento, positivo. *M. scrofulaceum*: negativo.

Catalasa:

La mayoría de las micobacterias producen la enzima catalasa, algunas más que otras:

Medios y Reactivos

Agua oxigenada 110 volúmenes (solución de peróxido de hidrógeno al 30 %). Debe conservarse en heladera.

Solución acuosa de Tween 80 al 10 %. En el momento de usar calentar ligeramente para obtener una mejor disolución, mantener en heladera.

Procedimiento

Distribuir 5 mL de medio de Löwestein-Jensen en tubos estériles de 18 mm x 150 mm con tapa rosca. Coagular el medio con los tubos en posición vertical, lo cual puede efectuarse colocando los tubos en un baño de agua termorregulado a 85 °C, durante 40 minutos. Inocular la superficie del medio con 0.1 mL de la suspensión bacilar en agua destilada incubar 2 semanas a 37 °C. Observar al cabo de ese tiempo que exista un buen desarrollo bacteriano. Mezclar partes iguales de peróxido de hidrógeno y solución de Tween 80. Mantener a temperatura ambiente. Agregar 1.0 mL de la mezcla de soluciones Tween-peróxido de hidrógeno al tubo de cultivo. Dejar el tubo en posición vertical durante 5 minutos.

Interpretación

Medir en milímetros la altura de la columna de burbujas sobre la superficie del medio.

Menor de 31 mm: negativa ó muy débil.

Entre 31 y 45 mm: resultado no concluyente.

Más de 45 mm: catalasa francamente positiva.

Controles

M. terrae: positivo.

M. bovis: negativo.