

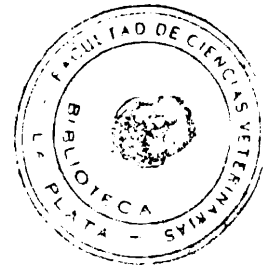
Jorge, Maria Cristina

Diagnóstico de la paratuberculosis
bovina por ensayo inmunoenzimático (ELISA)

1986



NOMINA DE AUTORIDADES DE LA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA



Presidente:

Dr. ANGEL LUIS PLASTINO

Vicepresidente:

ING. OMAR ALFREDO IGLESIAS

Secretario General:

ING. MARCELO RASTELLI

Secretario de Asuntos Académicos:

LIC. JULIO CESAR BARANDIARAN

Secretario de Asuntos Jurídico-Legales:

ABOG. MARCELO MIGUEL VAMPA

Secretario de Asuntos Económico-Financieros:

CR. ALDO HUGO ROSSI

Secretaría de Ext. Cultural y Difusión:

PROF. SILVIA KNIGHT DE CARRIQUIBORDE

Guardasellos:

Ing. ANDRES RINGUELET

Prosecretario General:

DR. GUILLERMO PABLO CASTELLARI

NOMINA DE AUTORIDADES DE LA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Decano:

Méd. Vet. HORACIO NORBERTO GARCIA VALENTI

Secretario de Asuntos Académicos:

Méd. Vet. ESTEBAN URANGA

Secretario de Supervisión Administrativa:

Dr. JORGE OMAR KOLEFF

Secretario Administrativo:

Sr. OMAR HUGO RAMIREZ

Directora Administrativa:

Sra. NELLY MABEL ERDMANN

Directora de Enseñanza:

Sra. CLELIA NORMA GIUFFRE

Directora de Biblioteca:

Sra. MARTA BERNARDI

Director Económico-Financiero:

Sr. HECTOR S. MOREIRA

NOMINA DEL PERSONAL DOCENTE POR CATEGORIAS

PROFESOR TITULAR- DEDICACION EXCLUSIVA:

| | | |
|-------------------------|--------------------------------|-------------------|
| ERRECALDE, Jorge O. | Farmacología F. y Terapéutica | Titular- p/c |
| GALLO, Guillermo G. | Clínica de Grandes Animales | Titular- CM |
| MARTIN, Alcides A. | Anatomía y Fisiología Patológ. | Titular- p/c |
| MENENDEZ, Néstor A. | Patología de Aves y Pilíf. | Titular- p/c |
| MONTE, Gregorio S. | Anatomía Descriptiva y Top. | Titular- p/c.LE/F |
| PRACCA, Lydia C. | Clínica Pequeños Animales | Titular- int. |
| QUINTEROS, Indalecio R. | Genética y Biometría | Titular- int. |

PROFESOR TITULAR- DEDICACION TIEMPO PARCIAL:

| | | |
|-------------------------|--------------------------------|----------------|
| ALBERDI, Cecilio | Tecnología y San. de los Alim | -Titular- p/c |
| ANDREATTA, Jorge H. | Semiología y Propedéutica | Titular - p/c |
| CATALA, Angel | Introducción a la Bioquímica | Titular - p/c |
| DELPRATO, Ismael O. | Anatomía Descr. y Topográfica | Emérito - c/l. |
| GIMENO, Emilio J. | Higiene, Epidemiología y S.P. | Titular - p/c |
| JENSEN, Alicia D. | Bioestadística | Titular - p/c |
| MAROTTA, Eduardo G. | Zootecnia Esp. I Parte(osc) | Titular- p/ c |
| MAROTTA, Eduardo G. | Director Instituto S. Catalina | Interino |
| OTTINO, Julio F. | Histología y Embriología | Interino |
| PENIMPEDE, Enrique F.F. | Inmunología Gral. y Aplicada | Titular - p/c |
| RODRIGUEZ, Benjamín R. | Zootecnia Esp. II Parte (bye) | Titular - int. |
| VIDELA, Pablo D. | Medicina Operatoria | Interino |

PROFESOR TITULAR-DEDICACION SIMPLE:

| | | |
|------------------------|-----------------------------|---------------|
| ARGERI, Nelson J. | Análisis Clínico I | Interino |
| ARGERI, Nelson J. | Análisis Clínicos II | Titular -p/c |
| BOCCIA, Francisco O. | Patología Quirúrgica y Pod. | Interino |
| CARROZZA, Jesús S. | Física y Química Aplicada | Interino |
| de ANTONI, Graciela L. | Genética Microbiana | Titular - p/c |

| | | |
|--------------------------|------------------------------|---------------------|
| ISEAS, Fortunato B. | Patología Médica | Titular - p/c |
| MARTIN, Alcides A. | Patología General | Titular - p/c |
| MARTINO, Olindo A.L. | Salud Pública | Titular - p/c c/1 |
| MONTESE, Gregorio S. | Anatomía Comparada | Titular - p/c L.E/T |
| OSTROWSKI, Jorge E.B. | Reproducción Animal | Titular - p/c |
| PANZONI, Erico E. | Economía Agraria | Titular - p/c |
| PENNINPEDE, Enrique F.F. | Inmunología I Parte | Interino |
| PEROTTI, Rodolfo M. | Zootecnia Esp. III Pte.(ayp) | Emérito |

PROFESOR ADJUNTO - DEDICACION EXCLUSIVA:

| | | |
|---------------------------|--------------------------------|---------------------|
| ALONSO, Cristina R. | Anatomía Descrip. y Topogr. | Interino a/c.c. |
| BRANDETTI, Eugenio | Patología de Aves y Pilif. | Titular - p/c |
| ETCHEVERRIGARAY, María E. | Virología | Interino a/c.c. |
| IDIART, Julio R. | Anatomía y Fisiología Patológ. | Titular - p/c |
| LAGRECA, Liliana A. | Zootecnia Gral. y Agrostología | Titular - p/c. a/c. |
| MONINA, Marta I. | Clínica de Grados Animales | Interino - c/1. |

PROFESOR ADJUNTO - DEDICACION TIEMPO PARCIAL:

| | | |
|----------------------------|----------------------------------|---------------------|
| BOCCIA, Francisco O. | Clínica Pequeños Animales | Titular - p/c |
| CASTAÑEDA, Alberto C. | Servicio Central de Cirugía | Reemplazante |
| DIBBERN, Alberto R. | Zootecnia Esp. II Parte (bye) | Interino - c/1 |
| FELDMAN, Raquel E. | Parasitología Comparada | Titular- p/c. a/c/c |
| FERNANDEZ, Enrique J. | Enfermedades Infecciosas | Interino - a/c.c. |
| GARCIA VALENTI, Horacio N. | Genética y Biometría | Titular - p/c q/R.H |
| GOMEZ, Carlos M. | Inmunología II | Titular- p/c a/c.c. |
| GRILLO, Virginia E. | Zootecnia Esp. III Pte. (ayp) | Titular- p/c |
| MAGGI, Nilda B. | Medicina Operatoria | Interino |
| MARTINO, Juan J. | Microbiología | Interino- a/c/c. |
| MORENO, Félix R. | Histopatología y Embriología | Titular - p/c |
| MURO, Alicia M. | Servicio Central de Cirugía | Interino - c/1 |
| NOIA, Miguel A. | Introducción a la Biofísica | Titular - p/c. a/c. |
| NOVARINI, Miguel A. | Farmacología, Farm. y Therapeut. | Interino |

| | | |
|-----------------------------|-------------------------------|-----------------------|
| ORTEGA, César F. | Semiología y Propedéutica | Titular - p/c |
| PENNIMPEDE, María T. del A. | Tecnología y S. de los Alim. | Titular - p/c |
| REINOSO, Enso H. | Micología Méd. e Industrial | Titular- p/c. a/ c.c. |
| RENNER, Juan E. | Clínica Grados Animales | Interino - a/c.c. |
| RUAGER, Jorge | Anatomía y Fisiolog. Patológ. | Titular- p/c |
| TESORIERO, Catalina | Microbiología Especial | Reemplazante- a/c.c. |

PROFESOR ADJUNTO - DEDICACION SIMPLE

| | | |
|----------------------------|--------------------------------|-----------------------|
| BRANETTI, Eugenio | Parasitología y Enf. Parasit. | Titular - p/c. a/c.c. |
| BRAVO BARDALES, Tomás | Economía Agraria | Reemplazante |
| CARBONE, Cecilia | Animales de laboratorio | Titular- p/c. a/c.c. |
| deANTUENO, Roberto J. | Introducción a la Bioquímica | Titular- p/c. |
| FINOCHIETTO, Héctor D. | Patología Médica | Interino |
| GIMENO, Eduardo J. | Patología General | Titular - p/c. |
| GOMEZ, Carlos M. | Inmunología Gral. y Aplicada | Titular - p/c. |
| LASTA, Jorge | Higiene, Epid. y S. Pública | Interino- c/l. |
| MALEANDI, Florestán S. (h) | Higiene, Epid. y S. Pública | Titular- p/c. |
| MOISO, Alejandro C. | Microbiología | Interino |
| OLIVA, Graciela A. | Virología | Interino |
| PRIO LOFEUDO, Graciela E. | Zootecnia Esp. III Parte (ayp) | Interino |
| ROJAS, Edmundo R. | Fisiología | Titular- p/c- a/c.c. |
| SARA, Raúl C. | Reproducción Animal | Titular - p/c. |
| TARSIA, Elba E. | Introducción a la Biofísica | Titular - p/c. |
| TOBIA, Marta B. | Microbiología Aplicada | Titular - p/c. a/c.c. |
| VENTURINI, Lucila M. | Parasitología y Enf. Parasit. | Interino |
| VILLAR, Martha E. | Análisis Clínicos I | Interino |
| VILLAR, Martha E. | Análisis Clínicos II | Interino |

Universidad Nacional de La Plata

Facultad de Ciencias Veterinarias

DIAGNOSTICO DE LA PARATUBERCULOSIS BOVINA POR ENZIMOINMUNOENSAYO (ELISA)

TESIS para optar al Grado Académico de Dr. en Cs. Veterinarias

Tesista: Med. Vet. MARIA CRISTINA JORGE

Director: Dr. Alberto Ernesto Parma

AGRADECIMIENTO

Al Sr. Mariano Elissondo por permitir realizar la toma de muestras en su establecimiento y el aporte de datos epidemiológicos.

A la Med. Vet. Margarita West de Corres por su asesoramiento y colaboración en el análisis estadístico.

Al Dr. Alberto I. de Diego por su aporte bibliográfico.

A quienes en todo momento me alentaron en la realización de este trabajo de tesis.-

I N D I C E

| | pág. |
|---------------------------|-------|
| Título..... | 1 |
| Agradecimientos..... | 2-3 |
| Indice..... | 4 |
| Abreviaturas..... | 5 |
| Resumen..... | 6 |
| Summary..... | 7 |
| Introducción..... | 8-22 |
| Materiales y métodos..... | 23-34 |
| Resultados..... | 35-47 |
| Discusión..... | 48-50 |
| Conclusiones..... | 51 |
| Bibliografía..... | 52-61 |



ABREVIATURAS

A.A.R. : ácido alcohol resistente
D N S : diferencia no significativa
D.O. : Densidad óptica
e.v. : vía endovenosa
ELISA:enzimoinmunoensayo
F : análisis de varianza
Fc : fracción cristalizable
F.C. : fijación de complemento
G.R.C. : glóbulos rojos de carnero
° C : grado centígrado
g : gramo
x g: aceleración de la gravedad
IgG: inmunoglobulina G
IgM: inmunoglobulina M
log: logaritmo en base 10
M :concentración molar
mg: miligramo
 μ : micra
 μ l : microlitro
ml : mililitro
nm : nanometro
N :concentración normal
p : probabilidad
pH :potencial de hidrogeniones
P.P.D. : derivado proteico purificado
% :por ciento
SAB : seroalbúmina bovina
SST : solución salina tamponada
SST-T :solución salina tamponada más Tween 20
s.c. : vía subcutánea
UCH₅₀ : Unidad complemento hemolítica 50 %
UH₅₀ : Unidad hemolítica 50 %



RESUMEN

Se realizó un estudio serológico mediante ELISA durante tres años a un rodeo de tambo, de 120 animales, infectado naturalmente con Mycobacterium paratuberculosis.

Se ensayó como antígeno el sobrenadante de un homogeneizado de la cepa Promise, obtenido por ultrasonido. Se procedió para el desarrollo de la prueba, de acuerdo a los pasos del ensayo inmunoenzimático indirecto, empleando gammaglobulina de conejo anti-IgG bovina marcada con peroxidasa.

A los efectos de comprobar si el ELISA era confiable como ensayo diagnóstico se analizaron dos lotes control, uno positivo y otro negativo, determinados por observación clínica y bacterioscopia de materia fecal y biopsia rectal. Las diferencias de títulos entre ambos lotes fueron estadísticamente significativas ($F : 21,89$ ó $p < 0,01$).

El antígeno utilizado demostró ser específico, ya que las adsorciones de los sueros con Mycobacterium phlei no provocaron descensos significativos de los títulos ($F : 0,50$).

Se comparó la sensibilidad y especificidad del ELISA con una prueba ya estandarizada como lo es la fijación de complemento. Para ello se procesaron 50 muestras de suero por ELISA y F.C., empleando para esta última como antígeno un extracto de la misma cepa.

La sensibilidad fue de 79,49 % para ELISA y 75,61 % para F.C. y la especificidad fue de 90,91 % para ELISA y de 88,89 % para F.C. Estos resultados indican que la prueba de ELISA desarrollada en este trabajo, puede emplearse con igual o mayor confianza que la de F.C.

Analizando todas las muestras de suero obtenidas de los cinco muestreos a lo largo de tres años, se pudo concluir que 32,86 % de los animales permanecieron positivos al ELISA, 28,57 % fueron siempre negativos; 13,57 % que en un principio eran negativos, se positivizaron y el 25 % restante comenzó siendo positivo y se negativizó hacia el final del período de observación.



S U M M A R Y

A dairy herd, of 120 animals, naturally -infected with Mycobacterium paratuberculosis, was studied by ELISA during three years. An ultrasonic homogenate from Promise strain, was employed as the antigen.

The test was performed following the habitual steps of an enzyme-linked immunosorbent assay, using horseradish peroxidase-labelled rabbit gammaglobulin anti-bovine IgG.

To inquire if this ELISA was reliable, sera from cows with paratuberculosis (positive control) and sera from cows paratuberculosis free (negative control) were employed. The differences of antibody titres between these control groups were statistically significant (F: 21.89 $p < 0.01$). The antigen was specific as was proved by means of immunoadsorption of the sera with a stick suspension of Mycobacterium phlei.

The sensitivity and specificity of ELISA were compared with a standardized test; complement fixation. Fifty serum were tested by these methods. The sensitivity and specificity of ELISA were 79.49 % and 90.91% respectively. Complement fixation test showed 75,61 % of sensitivity and 88.89 % of specificity.

These results suggest that the ELISA developed in this work can be used with equal or larger security than the complement fixation test.

When all the serum samples obtained along three years were analyzed by ELISA the results showed that 32.86 % of animals were always positive; 28.57 % were always negative; a 13.57 % started as negative, concluded as positive and the 25 % of the cows that were positive on the start, finished as negative for ELISA.



I N T R O D U C C I O N

La paratuberculosis bovina o enfermedad de Johne es una enfermedad infecciosa de curso crónico, ocasionada por el Mycobacterium paratuberculosis.

Se caracteriza por emaciación progresiva, diarreas intermitentes e hipertrofia difusa de la mucosa entérica con pliegues longitudinales y transversales de aspecto semejante a las circunvoluciones cerebrales³³.

Afecta principalmente a bovinos, ovinos y cabras, aunque todos los rumiantes son susceptibles. Se han citado casos en poligástricos silvestres en cautiverio y en libertad; experimentalmente se ha provocado la infección en caballos, pollos y cerdos^{61,97,109} y en conejos provoca lesiones intestinales desarrollando la enfermedad clínica entre 7 y 14 meses posteriores a la inoculación⁹⁹.

Los cricetos son adecuados para efectuar la reproducción experimental y realizar pruebas de sensibilidad a los antibióticos in vivo¹⁸.

Los monogástricos infectados serían una amenaza para los animales susceptibles, lo mismo que los animales silvestres como diseminadores asintomáticos del microorganismo^{18,124}.

En humanos la enfermedad de Johne no se presenta, sin embargo, recientes hallazgos sugieren que este agente no es inocuo para el hombre, como se creía. Una cepa de Mycobacterium paratuberculosis ha sido recientemente aislada del tracto gastrointestinal de un primate, que murió de ileocolitis granulomatosa. El aislamiento de Mycobacterium sp. (Mycobactin dependiente) de pacientes humanos con enfermedad de Crohn (ileocolitis granulomatosa) plantea el interrogante¹⁸.

El Mycobacterium paratuberculosis es un bacilo de 1-1,5 μ de largo y 0,3-0,5 μ de ancho, inmóvil, sin esporos, AAR. Se presenta en grupos en los tejidos y materia fecal siendo esta disposición útil para su identificación.

Para el cultivo primario, el decontaminante que mejor resultado ha proporcionado es el cloruro de benzalconio⁷⁸; pero al ser algunas cepas sensibles se está reemplazando por el cloruro de hexadecylpiridinium (HPC)¹⁸. Son necesarios medios de cultivo especiales y los más utilizados serían el de Herrold³⁸, el de Smith, que al ser transparente permite la detección más temprana de las colonias⁸⁹; el de Lowenstein-Jensen, con 5 % de membranas de Mycobacterium tuberculosis muertos por calor¹¹⁰ o enriquecido con Mycobacterium phlei, mycobactin o piruvato de sodio^{49,90}.

El Mycobacterium paratuberculosis demanda para su desarrollo entre 8 a 10 semanas, el diagnóstico puede establecerse a partir de las cuatro semanas con observación microscópica⁷⁸.

Debido a la dificultad en la identificación del Mycobacterium paratuberculosis se puede realizar una prueba de aglutinación con antígeno específico, el cual no da reacciones cruzadas con Mycobacterium avium⁴².

Uno de los métodos para confirmar la viabilidad de los Mycobacterium en cultivos, es utilizando diacetato de fluoresceína y bromuro de etilo, como colorantes vitales⁴³.

Los Mycobacterium paratuberculosis de origen bovino, ovino y caprino, poseen características culturales sensiblemente diferentes¹²⁵.

Desde las primeras descripciones de Johne y Frothingham en 1895, la paratuberculosis no ha sido satisfactoriamente controlada y en la actualidad su distribución es universal.

En 1934, la prevalencia de la enfermedad en Francia fue estimada en 0,8%. En Inglaterra, en el período 1949- 1959, los índices de prevalencia indicaban cifras del 7,5 al 15 %. En la actualidad, esta cifra ha ascendido al 18 %, con una distribución más amplia de la enfermedad^{18,19,101}.

En Japón, se describió la paratuberculosis en 1962³⁴ y en este momento constituye una de las enfermedades más serias⁸³, ocurriendo lo mismo en Alemania⁵⁸.

En Irlanda del Norte, según los trabajos de Pearson, está muy extendida⁹³, de acuerdo a las investigaciones de Rankin entre el 6 y 7,5 % de los bovinos padecen la enfermedad⁹⁵.

En Dinamarca la enfermedad afecta entre el 1,5 a 5 % de los bovinos y el 1,8 % de los rodeos⁴⁷.

En 1984, la prevalencia en los Estados Unidos fue del 10,8 %, encontrándose la enfermedad en todos los estados³³. Es tal la gravedad de la situación, que en algunos estados de Estados Unidos, Australia e Islandia es una enfermedad denunciada y los animales positivos a la prueba de fijación de complemento son sacrificados y sus propietarios indemnizados⁸³.

En Brasil, el aislamiento del agente lo realizaron da Silva y Pizzelli en 1963¹¹⁹.



En la Argentina, la primera descripción de la enfermedad la realizó Rosenbusch en 1935^{112, 113} y ya en 1941, Ubach alertaba sobre el impacto económico, teniendo en cuenta el estrago que producía en los países donde este flagelo estaba presente; considerando las características de la enfermedad, su evolución insidiosa y la importación nutrida de reproductores, era fácil suponer el peligro que representaba para la ganadería en la Argentina¹²⁶.

En 1942, Ault la describe en ovinos. En esta especie, el curso es más agudo que en el bovino y su desenlace es rápido y fatal, caracterizándose por carencia de tejido adiposo y reducción del volumen muscular³.

Los trabajos de Gaggino realizados entre 1963 y 1971, mencionan que son muy pocos los datos existentes en el país sobre la difusión y las pérdidas económicas que ocasiona, aunque consideran que la cantidad de animales afectados en zonas de entequ seco en el sureste de la provincia de Buenos Aires oscila entre el 10 y 30 % de la población, con una tasa de mortalidad entre el 2 y 10 %^{27,28}.

Este autor opina que no hay correlación entre la gravedad de los signos y las lesiones. Para confirmar estos datos utilizó como método de diagnóstico la prueba intradérmica doble comparativa, P.P.D. aviar y P.P.D. mamífera, en 400 bovinos del área mencionada, obteniendo un 17,5 % de reactores positivos a P.P.D. aviar. Este resultado sugiere la confirmación parcial de la enfermedad²⁹.

Estudios posteriores realizados en vacas de tipo conserva, de la misma zona, arrojaron un índice de infección del 53 %, dato obtenido por cultivo de muestras de íleon^{30, 31}.

Dada la importancia que esta enfermedad adquiere en nuestro país, la Secretaría de Estado de Agricultura y Ganadería por Decreto nº 5561 de fecha del 19 de setiembre de 1969, incluye a la paratuberculosis bovina en la nomenclatura de enfermedades a que hace referencia el Art. 4 del Reglamento de Policía Sanitaria de los Animales.

Estadísticamente, los únicos datos con que se cuenta a nivel nacional, son los obtenidos por el censo epizootiológico realizado entre los años 1967 y 1972, indicando que 1,78 % de la población bovina es positiva a P.P.D. johnina. En el mismo Boletín se publica una encuesta realizada en tambos del partido de Tandil, provincia de Buenos Aires, la cual arroja un 3,4 % de positividad¹³².

La descripción de la enfermedad en un rodeo de cría del partido de Lobería, provincia de Buenos Aires, con una tasa de mortalidad de 2,5 %^{26,50}, y la reciente descripción de tres casos clínicos en la provincia de La Pampa por Dubarry y Colace²⁴, indican que la enfermedad está siendo reconocida en distintos lugares del país.

La infección natural ocurre por ingestión de alimentos o agua contaminada con heces bacilíferas, provenientes de animales enfermos o portadores²⁷.

Una de las maneras en que la enfermedad se introduce en un rodeo libre es a través de un animal enfermo sin signos, resultando obvia la importancia de un diagnóstico precoz⁷³.

La supervivencia del bacilo en heces naturalmente infectadas expuestas al sol y lluvias es de aproximadamente 240 días. Bajo condiciones favorables el microorganismo puede sobrevivir hasta dos años, motivo por el cual el agua estancada y potreros contaminados conservan por ese período su poder infectante. La considerable resistencia del germen a las condiciones climáticas, la elevada eliminación de bacilos por los animales infectados y la carencia de normas elementales de higiene, son factores que agravan el problema²², sumado a esto, la escasa información que reciben los productores sobre la enfermedad.

Los factores que influyen la susceptibilidad son la edad, la cantidad de microorganismos ingeridos, el clima y factores que ocasionen desequilibrios. Evidencias clínicas sugieren que el virus de la Diarrea Vírica Bovina por efecto inmunosupresor aumenta la susceptibilidad de los bovinos al Mycobacterium paratuberculosis¹²²

En los climas de bajas temperaturas y explotación intensiva de ganado lechero, la prevalencia es más alta que en zonas lluviosas y húmedas de los trópicos, pero casi nunca se presenta en zonas de clima seco y cálido²².

Si bien no se ha demostrado mayor susceptibilidad en alguna raza determinada, en los tambos se presenta con mayor frecuencia que en los rodeos de cría, debido a la mayor probabilidad de exposición de los mismos¹⁸.

Según Rankin, los animales adultos son altamente resistentes cuando se los compara con terneros¹⁰²; existen experiencias que confirman que la edad de mayor susceptibilidad de los terneros oscila entre 30 y 60 días^{65,94, 122,123}. También existen algunas evidencias que indican que los bovinos pueden infectarse durante el período de gestación, aislándose el agente de órganos del feto y sus membranas^{18,23,62}.



Durante el estadio final de la enfermedad, en que la anergia está presente, el Mycobacterium paratuberculosis ha sido encontrado dentro de los cotiledones placentarios, causando placentitis y aborto. Se lo ha aislado también de semen y tracto reproductivo del macho; la supervivencia del agente después del procesamiento del semen sugiere que la reproducción por medios naturales o artificiales sería una potencial fuente de infección^{18,62,66}, aunque experimentalmente el semen contaminado no parece ser importante en la transmisión de la enfermedad¹⁸.

La leche es considerada como otra fuente de infección. El 7% de los animales con enfermedad clínica y anérgicos excretan el agente por esta vía; el primer aislamiento en leche lo realizaron en 1929 Alexijeff y Goloff¹⁷⁸. La contaminación fecal de la leche indudablemente contribuye a muchos más casos de transmisión, que la excreción de microorganismos por esta vía¹⁸.

De todas las vías, la contaminación fecal es la más importante, ya que animales clínicamente enfermos eliminan hasta 1×10^9 bacilos por gramo de heces¹²².

El período de incubación varía entre 6 meses y 15 años, dependiendo de la susceptibilidad individual, estado nutricional y grado de contaminación al cual ha sido expuesto el animal. Por la amplitud de este período, es difícil la identificación de portadores asintomáticos. En un rodeo infectado, se encuentran tres grupos de animales: los enfermos clínicos, los portadores y los sanos; los portadores a su vez pueden clasificarse en no excretadores, débilmente excretadores y fuertemente excretadores con más de cien Mycobacterium paratuberculosis por gramo de heces⁶³.

La edad de los animales reactivos positivos oscila entre 2 y 13 años y medio, encontrándose el mayor porcentaje en los menores de 7 años. La dificultad del control radica en que pueden ser infectivos antes de ser evidenciados por una serorreacción¹¹¹.

En los rumiantes la eliminación de microorganismos por heces ocurre entre 1 a 2 años y medio antes que los signos clínicos se manifiesten⁸⁰.

Como término medio, un rodeo infectado contiene entre el 38 y 42% de los animales reactivos y las pérdidas anuales por mortalidad oscilan entre el 3 y 10% de los animales adultos, además de las pérdidas por emaciación y muerte, en los animales afectados existe una disminución en su productividad¹⁸.

En la producción láctea existe una reducción entre el 8 y 9%, disminuyendo también la ganancia de peso²². Otra pérdida que se produce es la reducción de la

expectativa de vida, la que de 7,7 pasa a 4,6 años¹¹.

Se ha observado que las pérdidas por enfermedad entérica son esporádicas, pero la alta frecuencia de infección subclínica es un problema constante, ya que se presenta en un número 15 a 20 veces superior con respecto a la enfermedad declarada.

Un problema frecuente, es que las vacas con infección subclínica tienden a ser eliminadas del rodeo por mastitis, abortos y baja fertilidad^{13,18,82,121}, sumado a esto, el aumento de la susceptibilidad a otras enfermedades infecciosas¹⁸.

Llegadas las bacterias al intestino penetran en la mucosa y submucosa provocando enteritis crónica, formación de tejido de granulación con células epiteloides, células gigantea, linfocitos y leucocitos polimorfonucleares. Este infiltrado ocasiona incremento de la motilidad intestinal, menor tiempo de tránsito y menor absorción³³.

En las infecciones por micobacterias se cree que los componentes lipídicos de la pared bacteriana interfieren con la digestión de los bacilos AAR fagocitados porque los microorganismos quedarían protegidos de las enzimas hidrolíticas presentes en los lisosomas de las células huésped, las cuales serían capaces de destruir otras bacterias¹²².

Inicialmente, las infecciones se manifiestan por una respuesta inmune mediada por células, a medida que la enfermedad progresa la respuesta inmune humoral predomina, por último, la energía se instala y la respuesta mediada por células y la humoral no pueden ser detectadas. Estas respuestas inmunológicas ocurren independientemente de los signos clínicos.

La emaciación ocurre durante la enfermedad crónica por pérdida de proteínas debido a la enteritis, con compromiso del drenaje vascular y linfático. Existe deterioro en la asimilación de aminoácidos y el incremento en la pérdida de proteínas lleva a un balance de nitrógeno negativo. Animales con diarrea presentan estado catabólico, mientras que animales sin diarrea estado anabólico¹⁸.

Se considera que las reacciones antígeno-anticuerpo en los tejidos afectados producen liberación de histamina, provocando diarrea, edema, lagrimeo, rales

y algunos cambios hematológicos⁶³.

Durante el estadio terminal, en que la anergia está presente, se produce migración de los macrófagos infectados causando bacteriemia. Esta migración se debería a la falta de factores de inhibición de la migración de los macrófagos. La bacteriemia puede producirse experimentalmente por desensibilización del animal con múltiples dosis intravenosas del antígeno (johnina)¹⁸.

Los terneros de hembras infectadas, pueden ser más resistentes a la infección durante el primer período de su vida, debido a los altos niveles de anticuerpos maternos.

La inmunidad adquirida se caracteriza por el incremento de la capacidad de los macrófagos de inhibir la multiplicación intracelular de micobacterias, este efecto inhibitorio es el resultado de la respuesta inmune del huésped. Es conocido que las micobacterias pueden permanecer viables pero sin multiplicarse durante años^{6,8,64}.

La vacunación aumenta la resistencia del ganado a la infección con Mycobacterium paratuberculosis, siendo en ocasiones insuficiente para prevenir la enfermedad clínica²².

La vacunación y la prevención a través de medidas higiénicas en un rodeo con alto porcentaje de animales infectados disminuye la presentación de la enfermedad en un plazo relativamente corto¹⁸.

Los animales vacunados reaccionan a la P.P.D. mamífera; no obstante, si se realiza la prueba comparativa se observa que esta reacción no es específica, ya que las reacciones a la tuberculina aviar y johnina son siempre más evidentes que las provocadas por la tuberculina bovina. La ventaja que proporciona la vacunación es aumentar la resistencia a la enfermedad y reducir la excreción fecal del Mycobacterium paratuberculosis, la desventaja es que induce alergia a la tuberculina bovina^{21,57}.

Este método de control sería aplicado con éxito en áreas libres de tuberculosis bovina⁴⁰.

Cuando los animales son vacunados, superado el mes de edad, no pueden diferenciarse de los infectados por la prueba de inmunestimulación linfocítica³⁹.

Se han obtenido resultados muy satisfactorios en cabras por medio de la vacunación en los años 1967 - 1972 donde se redujo la infección del 53 a 1 % ¹¹⁷.

Los tratamientos ensayados hasta el momento no han dado resultados positivos, el agente se ha aislado de muestras obtenidas de animales tratados ⁹⁶.

Si bien las pruebas para el diagnóstico de paratuberculosis no han llegado a un nivel de especificidad y sensibilidad adecuados, permiten la identificación precoz e individual de todos los animales afectados, según las investigaciones de Johnson ⁴⁵.

En la paratuberculosis bovina el primer signo que aparece es diarrea intermitente, posteriormente piel seca, decoloración del pelo y pérdida crónica de peso hasta completar el cuadro clínico. Además puede presentarse fiebre intermitente, con o sin anorexia, y durante el estadio terminal la diarrea contiene estrías de sangre, aparece edema ventral, emaciación, debilitamiento y muerte ¹⁸.

Los cambios en la química sanguínea de los animales infectados, hipocalcemia, hipokalemia, hipofosfatemia e incremento del fosfato alcalino sérico no son específicos, ocurren solamente en la faz terminal de la enfermedad crónica y son de poco valor diagnóstico ⁵⁶.

Existen numerosos métodos de diagnóstico de laboratorio, entre ellos el fro-
tis de materia fecal, siendo el momento más adecuado para la toma de muestra cuando la diarrea está presente debido a la elevada eliminación de bacilos, no obstante sólo el 25 al 30 % de los casos pueden ser diagnosticados por este método ^{22,62}; la coloración de Ziehl-Neelsen para microorganismos AAR, es menos ventajosa que la coloración fluorescente con auramina ¹²⁷, ya que esta última permite con menor fatiga, examinar mayor número de muestras ¹²², siendo también recomendable para los cortes histológicos ¹⁰¹.

Existen cepas no AAR o débilmente AAR, esto debe tenerse en cuenta ante el fracaso en la demostración de microorganismos en los tejidos afectados ¹⁸. La biopsia rectal sólo permite la detección en los casos avanzados ²² y la presencia de escasas micobacterias en las lesiones focales, sería una de las causas de error ¹²¹.

El cultivo de muestras fecales es recomendable como diagnóstico antes de la aparición de los signos clínicos ³⁹. Sin embargo, puede fracasar aún en animales se-

veramente afectados , si en la muestra recolectada hay menos de 100 micobacterias por gramo de heces^{45,81}. Buergelt, detectó mediante cultivo fecal el 29 % de los animales infectados¹¹, no se registraron falsos positivos, pero los falsos negativos fueron del orden del 44 %¹⁰.

El criterio para considerar positivo el diagnóstico histopatológico es la presencia de hiperplasia de la mucosa intestinal. Esta hiperplasia es debida principalmente a acúmulos de células epitelioideas en la submucosa, los cuales de modo gradual comprimen y obliteran las criptas. Otros elementos celulares que se observan infiltrando las lesiones con una distribución difusa son: linfocitos, células plasmáticas, macrófagos y células gigantes multinucleadas conteniendo bacilos AAR en su interior. El agente puede visualizarse además en los espacios intercelulares. Lesiones específicas similares a las observadas en intestino, se encuentran también en los ganglios linfáticos mesentéricos. Cuando se observan cambios histológicos sin la presencia de bacilos se considera sospechoso¹⁸.

Summers, en 1979, preconizaba el valor de la biopsia de ganglios mesentéricos para el diagnóstico de la paratuberculosis bovina, siendo más confiable este método que el frotis de mucosa¹²¹.

Ultraestructuralmente, en los macrófagos se halló el citoplasma en degeneración y organelas rotas, con bacilos AAR pleomórficos en su interior. Los cambios degenerativos pueden provenir de la multiplicación del Mycobacterium paratuberculosis, ya que los lípidos de la membrana del retículo endoplásmico y celular proporcionan los ácidos grasos esenciales que necesita el microorganismo⁵³.

También se encontraron serios cambios degenerativos en el sistema nervioso central y ganglios autónomos, tales como vacuolización, plasmolisis y neuronofagia¹³⁶.

Además de las lesiones características en intestino y ganglios regionales, Williams detectó en ruminantes silvestres necrosis focal y mineralización de bazo, hígado y pulmón¹³¹.

Respecto a las pruebas alérgicas, existe una considerable diferencia de grado entre la alergia inducida por la infección artificial y la inducida por la infección natural, siendo muy buenas en el primer caso y de moderadas a pobres en

el segundo, inclusive animales en estado avanzado, pueden no reaccionar²².

Algunos autores opinan que las pruebas de hipersensibilidad son positivas antes que las serológicas y se adelantan a la aparición de los síntomas^{52,103}. En general las pruebas alérgicas son positivas un mes antes de la aparición de heces bacilíferas^{27,51}.

Comparando P.P.D. aviar y P.P.D. johnina vía intradérmica, la segunda da reacciones menos marcadas y falla en casos en que la P.P.D. aviar es positiva esto se debería, de acuerdo a Jansen¹⁰⁴, a que el 33 % de los animales no reacciona a la johnina por la baja respuesta del ganado naturalmente infectado, y no por la baja potencia a la johnina²². El grado de inmunidad celular depende del número inicial de organismos fagocitados por los macrófagos. La johnina puede ser utilizada vía oftálmica, intradérmica en tabla del cuello y en vulva^{54,55} y endovenosa. Por esta última vía un aumento de 1,5 °C de la temperatura corporal se considera positivo, reaccionando el 80 % de los animales con signos clínicos⁶². La vía intradérmica da mayor número de falsos positivos que la endovenosa¹²², siendo la P.P.D. johnina más específica que la johnina bruta⁶⁰. Mediante la transferencia de plasma de animales inoculados, no fue posible conseguir en los animales sanos sensibilidad a la johnina¹⁰⁵.

La prueba de transformación linfocítica ha demostrado que identifica animales infectados con mayor precisión que la johnina y la biopsia de íleon. Sin embargo, no posee el nivel de sensibilidad y especificidad suficientes para utilizarla como método de diagnóstico de rutina⁴⁵. En animales inoculados experimentalmente, esta prueba dió resultados positivos antes que la prueba alérgica, utilizando P.P.D. aviar y el cultivo fecal⁴⁶.

Otros trabajos demostraron su mayor sensibilidad comparando con inmunodifusión y fijación de complemento, siendo más bajo el número de falsos positivos¹². Sin embargo, Lisle opina que la principal desventaja de esta prueba son los falsos positivos⁶⁹. Estudios posteriores indican que los falsos negativos, ocurren por un factor inmunosupresivo humoral, demostrado en plasma y suero de bovinos infectados con Mycobacterium paratuberculosis; una experiencia revela que cuando las células son lavadas e incubadas en plasma normal, la respuesta retorna a valores nor-

males¹²².

Buergelt obtiene, aplicando transformación linfocítica, el 74 % de positivos y el 17 % de falsos negativos, siendo éstos, animales con enfermedad clínica avanzada, no respondiendo a la blastogénesis¹¹.

La migración linfocítica directa sugiere que el prolongado período de incubación llevaría a una tolerancia inmunológica, porque los animales clínicamente afectados reaccionarían con índices más bajos que el grupo control^{7,9}. En una reproducción experimental de la enfermedad en ovinos, fueron detectadas primero las precipitinas, luego las hemoaglutininas y por último los anticuerpos fijadores de complemento⁷⁷, estas pruebas se utilizan como diagnóstico de rutina en ovejas y cabras⁵. En otra experiencia realizada en corderos, inoculando membranas celulares, protoplasma y cuerpos bacterianos de Mycobacterium paratuberculosis, se detectaron precipitinas y hemoaglutininas frente a los tres inóculos. Los anticuerpos fijadores de complemento y la inmunidad celular, no se pusieron en evidencia frente al antígeno protoplasmático, pero se manifestaron con los otros dos inóculos⁷⁶.

La sensibilidad y especificidad de las pruebas de hemoaglutinación y lisis de la hemoaglutinación son bajas, en comparación con la fijación de complemento e inmunofluorescencia^{35,36,59}.

La prueba de inmunodifusión, detecta anticuerpos transcurridos 21 meses de la exposición natural y 7 meses después de que se produzca la eliminación de microorganismos por materia fecal⁶⁸.

Pruebas de hipersensibilidad, bacteriológicas y serológicas realizadas a lo largo de la vida del ganado naturalmente infectado, revelan que el Mycobacterium paratuberculosis puede ser aislado de heces antes de la aparición de los signos clínicos y de que las reacciones de hipersensibilidad o fijación de complemento alcanzan valores significativos. El número de microorganismos aislados y los títulos de anticuerpos fijadores de complemento se elevan cuando la enfermedad clínica aparece¹²⁰, siendo esta prueba positiva en el 93 % de los bovinos con enfermedad clínica, mientras que las pruebas de hipersensibilidad alcanzan un 71 % de positividad¹¹⁵.

Para Pearson⁹² en ganado afectado con síntomas, la prueba de fijación de



complemento tuvo una eficiencia del 92 % y las pruebas de hipersensibilidad un 10,5 %.

Lisle obtuvo resultados similares cuando demostró que la fijación de complemento sólo daba resultados positivos en animales clínicamente enfermos y con lesiones evidentes confirmadas por necropsia e histopatología ^{70,71}.

Las lesiones en la válvula ileocecal aparecen antes que sea positiva la prueba de fijación de complemento, según las investigaciones de Kapinski ⁵¹.

En terneros experimentalmente infectados, la fijación de complemento detectó anticuerpos tres meses posteriores a la inoculación, estando el título directamente relacionado con la extensión de las lesiones intestinales y no con la severidad de los signos. La sólo presencia del Mycobacterium paratuberculosis en animales sin signos no es suficiente para que la prueba de fijación de complemento proporcione resultados positivos, fallando por este motivo en la detección de animales portadores ^{63,98}.

La técnica de Hole, permite en ocasiones, la búsqueda de animales portadores, no obstante la desventaja teórica de utilizar un antígeno heterólogo ³².

Al practicar la prueba de fijación de complemento a lo largo de cinco años en un rodeo infectado, se encontró que el 40 % de los animales dieron resultados positivos durante el seguimiento. Aplicada a rodeos no infectados, el 30 % reaccionó de mismo modo. Esto sugiere que aproximadamente el 30 % de las reacciones se produce por la carencia de un antígeno específico ^{37,100}.

Morris trabajó en la preparación de antígeno para fijación de complemento y obtuvo por extracción con metanol de Mycobacterium paratuberculosis, un antígeno estable, sin propiedades anticomplementarias ^{84,85}.

Rice ^{106,107} también trabajó en la elaboración de antígenos para fijación de complemento, no logrando elevar la especificidad, pero sí la sensibilidad.

Yugi ¹³³ intentó elaborar un antígeno por medio de extracción fenólica, con resultados inciertos.

Chandler ^{16,17}, ha obtenido de la prueba de fijación de complemento resultados más alentadores, logrando un 84 % de eficiencia en la detección de animales sospechosos y un 77 % en los aparentemente sanos, dependiendo estos resultados de la especificidad del antígeno.

Davison puntualizó que la prueba de fijación de complemento no es confiable en presencia de tuberculosis, siendo significativa la diferencia de las reacciones positivas a fijación de complemento, entre reactores y no reactores a la prueba de tuberculina ²¹.

Otra de las causas de reacciones falsas positivas en fijación de complemento, son las reacciones cruzadas con Corynebacterium renale y Corynebacterium equi por la presencia de antígenos comunes. Esto sucede con frecuencia, ya que el Corynebacterium equi es habitante normal del tracto digestivo de los bovinos ⁷⁵.

Las micobacterias que no pueden clasificarse satisfactoriamente dentro de las especies reconocidas, son a menudo causales de falsos positivos ¹³⁰.

La prueba de fijación de complemento ha demostrado poseer ventajas sobre: bacterioscopia rectal ⁷³, inmunodifusión, hemoaglutinación y lisis de la hemoaglutinación ³⁵. Para algunos investigadores es menos sensible y específica que la inmunofluorescencia ^{36,101,122}; aunque para otros no existen diferencias importantes entre los resultados obtenidos entre fijación de complemento e inmunofluorescencia ¹.

Una técnica recientemente probada es la inmunoperoxidasa para el diagnóstico de paratuberculosis, siendo sumamente sensible, aunque necesita mayores ajustes en su especificidad por las reacciones cruzadas con el Género Corynebacterium y otras especies de Mycobacterium ⁸⁶.

Otra técnica de reciente aplicación en el campo de la medicina veterinaria es el enzoinmunoensayo (ELISA), cuya sensibilidad es muy elevada y permite obtener resultados objetivos ¹²⁸. Esta técnica en paratuberculosis bovina, fue por primera vez utilizada en el año 1979 por Jorgensen y Jensen, obteniendo resultados muy promisorios, aunque sobre un grupo muy reducido de animales ⁴⁸.

Thoen, la aplica como metodología de diagnóstico de tuberculosis en animales exóticos y observa que es un procedimiento rápido para detectar tuberculosis simultáneamente en varias especies, sin la producción de conjugados anti-especie; para ello utilizó proteína A, elaborada por algunas cepas de Staphylococcus aureus, con la propiedad de unirse a la porción Fc de las inmunoglobulinas, en especial la IgG ¹²³.

A partir de estos trabajos, todos los esfuerzos se han sumado para minimizar



las reacciones no específicas de ELISA. Uno de los intentos fue el realizado por Yokomizo y Merkal, quienes midieron sólo la respuesta de anticuerpos del subtipo IgG₁ frente a un antígeno protoplasmático de Mycobacterium paratuberculosis, descartando de esta manera las reacciones no específicas ocasionadas por IgM¹³⁴, como se ha visto, uno de los principales problemas en el diagnóstico serológico de las enfermedades ocasionadas por Mycobacterium, son las reacciones cruzadas.

Abbas ha aislado un antígeno a partir de protoplasma de Mycobacterium paratuberculosis por medio de una combinación de filtración por gel, intercambio iónico y cromatografía de afinidad, el cual redujo las reacciones cruzadas, cuando fue utilizado en ELISA².

Camphausen logró aislar un glicolípido polar, fácilmente reconocible en cepas aisladas del Mycobacterium paratuberculosis por cromatografía en capa fina, demostrando ser altamente reactivo frente al suero de un animal hiperinmunizado¹⁵.

Hasta el momento, los mejores resultados para mejorar la especificidad son los obtenidos por la adsorción de los sueros positivos con una suspensión de Mycobacterium phlei. Este procedimiento elimina las reacciones cruzadas por anticuerpos dirigidos a antígenos de Corynebacterium, Nocardia y otras especies de Mycobacterium. Cuando los sueros de bovinos infectados con Mycobacterium paratuberculosis son adsorbidos con Mycobacterium phlei, los títulos obtenidos en ELISA no disminuyen^{84,134}.

Esta técnica permite un diagnóstico relativamente precoz, ya que se encontraron respuestas positivas a ELISA 24 semanas posteriores a la inoculación^{19,123}. En otras experiencias aparecieron anticuerpos detectables a las 36 semanas⁶⁸.

De acuerdo con estos resultados, ELISA sería una prueba útil para el serodiagnóstico y utilizando antígenos purificados su sensibilidad sería muy alta⁸⁸.

Los intentos para desarrollar una prueba diagnóstica rápida, para detectar anticuerpos a Mycobacterium paratuberculosis en ganado infectado, no han sido totalmente satisfactorios.

El ganado infectado elimina elevado número de organismos por heces, por lo que un diagnóstico precoz es imprescindible para controlar la enfermedad en un rebaño. La lenta evolución de la enfermedad, la variabilidad del curso en los animales y las diferencias de susceptibilidad por edad e individual, son en parte la

causa del fracaso de algunas pruebas serológicas.

Los objetivos de este trabajo son observar mediante ELISA la evolución serológica de un rodeo de tambo, naturalmente infectado, en el transcurso de tres años; determinar la especificidad de los antígenos utilizados en esta prueba y la permanencia de anticuerpos séricos específicos y analizar mediante fijación de complemento cincuenta sueros con el propósito de establecer comparaciones sobre la especificidad y sensibilidad de esta prueba con ELISA.



MATERIALES Y METODOS

Animales de experimentación : Se tomaron muestras de un rodeo de tambo compuesto por 120 animales , el cual estaba infectado naturalmente. El diagnóstico de la enfermedad se realizó por los signos clínicos, lesiones anatomopatológicas observadas en dos necropsias de animales muertos en el establecimiento y bacterioscopías.

La bacterioscopía se realizó en muestras obtenidas de las necropsias, incluyendo fleón, ciego, colon, recto y ganglios mesentéricos. Frotis preparados de todos los segmentos fueron teñidos mediante la coloración de Ziehl-Neelsen.

Al 50 % de la población se le realizó biopsia rectal y frotis de materia fecal, según el método descrito por Cunningham²⁰. De este grupo se escogieron 12 animales cuya biopsia rectal presentó los característicos acúmulos de bacilos AAR, para ser utilizados como un lote control positivo.

De la totalidad del rodeo se tomaron muestras de sangre durante tres años. Las primeras tres muestras fueron obtenidas con un intervalo de 6 meses y las restantes con intervalo de un año. Los sueros fueron separados y conservados a - 20 °C hasta su utilización.

Se tomó un lote control negativo perteneciente a un rodeo de cría, raza Aberdeen Angus, cuyos controles clínicos y bacterioscópicos individuales durante tres años resultaron negativos. Es un rodeo cerrado sin incorporación de animales en los últimos ocho años. Los reproductores machos y hembras para reposición se obtuvieron de la misma población. Por esta razón, se consideró un rodeo libre de paratuberculosis bovina, adoptándose como control negativo. De él se tomaron muestras de sangre a 12 animales de la población (dos muestras con intervalo de un año). El suero fue separado y conservado a -20 °C hasta su utilización.

Las muestras de los lotes control positivo y negativo fueron analizadas por las pruebas de F.C. y ELISA.

Materiales necesarios para el ELISA

- SST : Solución salina tamponada pH 7,2 ; 0,01 M

Solución madre:

| | | | | | |
|-------|---|-----------|----------|------------------|-------------|
| 0,5 M | Na ₂ HPO ₄ | (10,96 g | 154,4 ml | H ₂ O | destilada) |
| 0,5 M | N _a H ₂ PO ₄ | (3,15 g | 45,6 ml | H ₂ O | destilada) |

luego de mezclar se agregaron 200 ml de agua destilada.

Solución de trabajo:

Se mezclaron 40 ml de la solución madre con 100 ml de solución fisiológica y se llevaron a 1000 ml con agua destilada.

- Solución de carbonato de sodio, pH 9,6; 0,05 M. para dilución del antígeno.

15,9 g CO_3Na_2

29,0 g CO_3HN_a

Se llevó a 1000 ml con agua destilada.

- SST-T: Solución salina tamponada pH 7,2 con 0,1 % de Tween 20.

- SST-T-SAB : Solución salina tamponada con 0,1 % de Tween 20 y 0,5 % de albúmina bovina.

- Acido sulfúrico 8 N.

22,4 ml H_2SO_4

87,6 ml Agua destilada

Antígenos utilizados: Se utilizaron dos preparaciones antigénicas a partir de la cepa Promise de Mycobacterium paratuberculosis.

A.- Extracto de Mycobacterium paratuberculosis cepa Promise, cedido gentilmente por Jorgensen y Jensen. Se obtuvo por extracción calórica a pH 11,5, seguida por precipitación a pH 4,5⁴⁴. Este antígeno está estandarizado para la prueba de F.C. En este trabajo fue utilizado en ELISA y F.C.

B.- Homogeneizado por ultrasonido del Mycobacterium paratuberculosis cepa Promise. Se preparó a partir de un cultivo madre de Mycobacterium paratuberculosis cepa Promise, cedida por Jorgensen y Jensen.

El cultivo se realizó sobre medio de Lowestein-Jensen con el agregado de Mycobacterium phlei en glicerina al 25 %. Esta suspensión se obtuvo cultivando M. phlei sobre caldo peptonado con 10 % de glicerina, incubando durante una a dos semanas a 37 °C, se recogieron los gérmenes por filtración suspendiendo 25 g de masa bacteriana húmeda en 100 ml de glicerina. Se esterilizó en autoclave durante 2 horas a 121 °C .

El M. paratuberculosis se cultivó sobre el medio descrito, durante dos meses a 37 °C en estufa. Los microorganismos se recogieron en solución fisiológica



cay se lavaron tres veces en esta solución para eliminar restos de medio de cultivo. Se suspendió 1 g cada 10 ml de solución fisiológica y mediante sonicador ultrasónico, en baño de hielo, se desintegraron los M. paratuberculosis durante 5 períodos de 3 minutos cada uno. El sobrenadante de una centrifugación a 35.000 xg durante 30 minutos a 4 °C fue utilizado como antígeno⁸³, conservándose a - 20 °C hasta su utilización. Este antígeno se utilizó en este trabajo en el ELISA.

Precipitación de gamaglobulinas bovinas con sulfato de amonio: Se realizó el fraccionamiento de gamaglobulinas a partir de un conjunto de sueros bovinos normales con solución saturada de sulfato de amonio.

Diez ml de suero fueron colocados en un vaso de precipitado en baño de hielo, adicionando gota a gota 5 ml de solución saturada de sulfato de amonio, con agitación constante durante 30 minutos.

Luego de una centrifugación a 1.100 x g durante 20 minutos, se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en un volumen de agua destilada igual a la mitad del volumen de suero empleado (5 ml).

A este volumen se agregaron 2,5 ml de solución saturada de sulfato de amonio, en idénticas condiciones a las descritas. Luego de media hora de agitación constante se centrifugó a 1.100 x g y el sedimento se resuspendió en 5 ml de agua destilada.

Mediante diálisis contra NaCl 0,15 M, se eliminó el sulfato de amonio que contenía la solución de gamaglobulinas.

La fracción gamaglobulina así obtenida se probó mediante electroforesis junto a un suero total, empleando como reactivo precipitante suero de conejo anti-suero total bovino^{74,129}.

Obtención de IgG bovina : Se tomaron 3 ml de la solución que contiene las gamaglobulinas fraccionadas según el procedimiento descrito anteriormente. Se agregaron 3 ml de solución de rivanol al 1 %, incubando 15 minutos a 37 °C. Luego de centrifugar a 1900 x g durante 10 minutos, se guardó el sobrenadante conteniendo IgG . Esta separación se controló mediante electroforesis^{14,41}.

Obtención de gamaglobulinas de conejo anti IgG bovina: Se preparó por inmuni-



zación de un conejo adulto de 3 kg de peso, usando como antígeno una emulsión en partes iguales de IgG bovina ($10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) y adyuvante de Freund incompleto, según el siguiente plan de estimulación:

| <u>Día</u> | <u>Dosis emulsión</u> | <u>Vía</u> |
|------------|-----------------------|------------|
| 1 | 2 ml | s.c. |
| 7 | 2 ml | s.c. |
| 21 | 2 ml | s.c. |

30 Sangría exploratoria.

Cuando el título fue el adecuado, el animal se sangró a blanco, siendo el suero separado y conservado a $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización^{74,91}.

Conjugado gamaglobulina de conejo anti IgG bovina-peroxidasa: Para preparar el conjugado se utilizó peroxidasa tipo VI Sigma (Lote nº 62 F -9545) . Se disolvieron 12 mg de peroxidasa en 1 ml de solución tamponada de fosfato 0,1 M pH 6,8 que contenía 5 mg de gamaglobulinas de conejo anti- IgG bovina, separadas por precipitación con sulfato de amonio, según la metodología descrita para la obtención de gamaglobulina bovina.

Se agitó la mezcla suavemente sobre agitador magnético, agregando lentamente $50 \mu\text{l}$ de glutaraldehído al 1 %.

Se dejó reposar a temperatura ambiente durante dos horas, dializando luego contra SST a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Se realizaron tres cambios de un litro cada uno, con intervalos de 8 horas. Luego se procedió a centrifugar 30 minutos a $28.000 \times g$, en centrífuga refrigerada. El sobrenadante se conservó sin diluir a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, agregando SAB hasta lograr una concentración de 5 %^{4,87}.

Sustrato de la peroxidasa: Se utilizó como sustrato la siguiente solución:

| | |
|------------------------|------------------|
| Bencidina | 12 mg |
| H_2O_2 | $25 \mu\text{l}$ |
| SST | 25 ml |

Esta solución debe ser preparada en el momento de usar y protegiéndola de la luz.

Para la estandarización y realización del ELISA, se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros^{25, 114,116}.

- Fase sólida: Existen varios tipos de fase sólida y luego de diversos ensayos se adoptaron las policubetas flexibles de 96 pocillos, pues en plástico rígido no se obtuvo adsorción del antígeno.

- Adsorción del antígeno : Se realizó mediante solución de carbonato de sodio pH 9,6 . El antígeno diluido óptimamente en esta solución, se colocó en los pocillos correspondientes, incubando toda la noche a 4 °C. Se escogió este método porque permitió lograr resultados más reproducibles que cuando se ensayó la adsorción a 37 °C durante tres horas.

Otro parámetro que se tuvo en cuenta fue la determinación de la cantidad de proteína mínima necesaria para la realización del método. Como los antígenos utilizados no eran sólo proteínas, el método de Lowry no pudo llevarse a cabo. Por este motivo se siguió el sistema de titulación en bloque utilizando diferentes diluciones del antígeno, frente a diferentes diluciones de los sueros positivos y negativos de referencia. Se escogió la dilución máxima del antígeno que permitió la mayor diferencia entre los sueros controles citados. Los antígenos una vez titulados, se fraccionaron en alícuotas y se conservaron a - 70 °C hasta su empleo.

A los efectos de evitar falsos positivos, debido a adsorciones inespecíficas del suero bovino sobre sitios no ocupados por el antígeno, éstos fueron bloqueados con seroalbúmina bovina. Para ello, las placas se incubaron toda la noche a 4 °C con una solución de SST-T-SAB.

- Sueros controles positivos y negativos : Se utilizaron sueros controles ELISA (+) y ELISA (-) para Mycobacterium paratuberculosis , provistos por gentileza del Dr. Richard Merkál, a través de Allied Laboratories Inc, Ames Iowa.

- Titulación del conjugado : Una vez obtenido el conjugado como se describió anteriormente, se buscó la concentración óptima, utilizando el sistema completo antígeno- anticuerpo- conjugado.

Utilizando el antígeno adsorbido en la concentración más adecuada, se escogió la dilución del conjugado que no produjo color de fondo en los controles negativos y además permitió obtener los mayores títulos en los sueros positivos.

- Tiempo de incubación del sustrato : Como sustrato se utilizó bencidina- H₂O₂ , realizando lecturas seriadas, hasta encontrar el tiempo óptimo de incubación, que fue

aquel donde hubo mayores diferencias de color entre positivos y negativos de referencia.

- Lectura de los resultados : La lectura de los resultados se realizó en forma visual clasificando de 0 a 4 cruces según la intensidad de color. Como la lectura de los resultados demanda un tiempo que oscila entre 3 y 30 minutos de acuerdo al número de policubetas empleado, se procedió a estabilizar la reacción mediante el frenado con ácido sulfúrico 8 N.

La técnica de ELISA por método indirecto se realizó según se indica en el Cuadro Nº 1 .

- Detalle de la prueba realizada: Se utilizaron policubetas de 96 pocillos, plásticas, flexibles con fondo en U. En cada policubeta se analizaron 9 sueros. Las diluciones de los mismos se realizaron en dirección vertical (A- H) de 1:10 a 1: 1280. En dirección horizontal (1-12) se utilizaron de 1-9 con los sueros problema, el 10 con el suero control positivo, el 11 con el suero control negativo y el 12 con SST-T, siendo esta última fila utilizada como blanco de lectura.

- Adsorción con Mycobacterium phlei : A los efectos de descartar las reacciones falsas positivas, por reacciones cruzadas con otros organismos del Género Mycobacterium, Nocardia y Corynebacterium , se realizó la adsorción de algunos sueros positivos con Mycobacterium phlei, cultivado sobre Lowestein-Jensen a 37 °C durante 12 días^{83,134} .

Para realizar la adsorción , se incubaron 0,2 ml de un sedimento de M. phlei lavados con solución salina y 0,5 ml de suero a adsorber durante una hora a 30 °C y una noche en heladera.

Luego de centrifugar 15 minutos a 1.900 x g, se utilizó el sobrenadante para realizar las reacciones, según se describe en el cuadro nº 1 .

Fijación de complemento

Los materiales necesarios para la prueba de fijación de complemento fueron ⁶⁷:

- Solución concentrada de Mayer, pH 7,4

| | |
|--------------------------|--------|
| Cl Na | 85,0 g |
| Ac. dietilbarbitúrico | 5,75 g |
| Dietil barbiturato de Na | 3,75 g |

Cuadro N^o 1

Protocolo ELISA

| Etapas | Reactivos | Cantidad por pocillo |
|--|---|----------------------|
| Depositar antígeno en la dilución óptima, una noche a 4 °C | Antígeno diluido en $\text{CO}_3\text{Na}_2\text{-CO}_3\text{HNa}$ pH 9,6 | 50 μl |
| 5 lavados de 3 minutos cada uno | SST-T | |
| Bloqueo, una noche a 4 °C | SST-T-SAB | 50 μl |
| 5 lavados de 3 minutos cada uno | SST-T | |
| Depositar anticuerpos 1 hora a temperatura ambiente | Diluciones seriadas del suero en SST-T | 50 μl |
| 5 lavados de 3 minutos cada uno | SST-T | |
| Depositar el conjugado en dilución óptima, 2 horas a temperatura ambiente | Dilución del conjugado en SST-T-SAB | 50 μl |
| 5 lavados de 3 minutos cada uno | SST-T | |
| Sustrato | Solución de trabajo de Bencidina- H_2O_2 | 50 μl |
| Previa incubación de 20 minutos a temperatura ambiente al abrigo de la luz, se frena la reacción | ácido sulfúrico 8 N | 10 μl |

Se llevó a 2000 ml con agua destilada y se agregó:

- Cloruro de Calcio 0,2 g
- Cloruro de Magnesio 1,0 g

Solución de trabajo: Se diluyó la solución anterior 1/5 y se controló el pH.

La solución diluida no debe conservarse por más de 24 horas.

- Complemento: Como fuente de complemento se empleó una mezcla de sueros provenientes de 20 cobayos. Fue fraccionado y conservado a - 20 °C.

- Glóbulos rojos de carnero :se obtuvieron de un carnero sano por sangría parcial en anticoagulante de Alsever(partes iguales).

La sangre se dejó madurar en heladera entre 24 horas y 1 semana.

Para su empleo se lavaron tres veces con solución de Mayer pH 7,4 y se ajustaron a la concentración correspondiente en la prueba.

Solución Alsever

- Glucosa 20,5 g
- Citrato de Sodio 8,0 g
- Cloruro de Sodio 4,2 g
- Agua destilada 900 ml

Se ajustó el pH con ácido cítrico al 10 % a pH 6,1

Se agregó agua destilada hasta completar 1000 ml y se esterilizó durante 30 minutos por vapor fluente.

- Obtención de la hemolisina:Se preparó por inmunización de un conejo adulto de 3 kg de peso, usando como antígeno glóbulos enteros de carnero o sangre total, según el siguiente plan de estimulación⁷⁴:

| <u>Día</u> | <u>Antígeno</u> | <u>Dosis</u> | <u>Vía</u> |
|------------|------------------------|--------------|------------|
| 1 | sangre total ovino | 0,5 ml | s.c. |
| 3 | " " " | 0,5 ml | s.c. |
| 5 | " " " | 1,5 ml | s.c. |
| 7 | " " " | 2,0 ml | s.c. |
| 9 | " " " | 2,5 ml | s.c. |
| 12 | Glóbulos rojos al 20 % | 1,0 ml | e.v. |
| 14 | " " | 1,0 ml | e.v. |
| 16 | " " | 1,0 ml | e.v. |
| 18 | Sangría exploratoria | | |



Cuando el título fue el adecuado, el animal se sangró a blanco y el suero separado y titulado.

- Titulación de la hemolisina: Fue realizada con lectura del 50 % de hemólisis. En todos los casos se empleó como diluyente la solución de Mayer. En una serie de 10 tubos de hemólisis, con 1 ml de solución de Mayer, se agregó al primero 1 ml de suero hemolítico 1/100. Luego de mezclar, se pasó 1 ml al segundo tubo de la serie, quedando 1 ml en el anterior. Este procedimiento se continuó hasta llegar al tubo 10, del que se descartó 1 ml.

El protocolo seguido para la titulación de la hemolisina es el que se indica en el cuadro Nº 2.

Luego de agitar, se incubó durante 30 minutos a 37°C con agitaciones periódicas. Los sobrenadantes de los centrifugados fueron leídos en espectrofotómetro a 530 nm, ajustando a cero (0 % de hemólisis) con el tubo nº 11.

El título se calculó aplicando la ecuación de von Krough que se describe a continuación para la titulación del complemento.

- Titulación del complemento: Se empleó uno de los métodos más usados que se basan en la determinación del efecto citotóxico del complemento sobre los glóbulos rojos sensibilizados con hemolisina, y medición de la densidad óptica producida por la hemoglobina liberada.

Se dispuso una serie de 6 tubos de hemólisis con 1 ml de solución de Mayer. Se agregó al primero 1 ml de suero de cobayo diluido 1/10 en Mayer (fuente de complemento); luego de mezclar, se pasó 1 ml al segundo de la serie llegando así hasta el tubo 6 del que se descartó 1 ml.

El protocolo seguido para la titulación del complemento es el que se indica en el cuadro nº 3.

El sistema hemolítico se preparó mezclando partes iguales de una suspensión de glóbulos rojos de carnero lavados y ajustados al 4 % y hemolisina diluida conteniendo 4 UI₅₀ / ml. La mezcla se incubó 30 minutos a 37 °C, agitando ocasionalmente.

Luego de incubar a 37 °C durante 30 minutos todos los elementos que se indican en el protocolo seguido para la titulación, se determinó la mayor dilución de suero de cobayo capaz de hemolizar el 50 % de los G.R.C. sensibilizados; por lectura de los sobrenadantes de los centrifugados en espectrofotómetro a 530 nm.



Ajustando a 0 (0 % de hemólisis) con la D.O. del tubo 7 y el 100 % correspondió a la D.O. del tubo 8.

El número de UCH_{50} / ml se obtuvo de la siguiente manera: la curva de hemólisis es sigmoideal y su parte central (punto de inflexión) corresponde a la dosis que produce el 50 % de hemólisis.

La ecuación de von Krough $x: K \left(\frac{y}{1-y} \right)^{1/n}$ es la expresión matemática de dicha curva.

En ella, x es la cantidad de complemento expresada en ml de dilución; y corresponde al grado de lisis como fracción de 1, o multiplicando por 100 el % de hemólisis, K es una constante que equivale a la dosis de complemento que produce el 50 % de hemólisis; $1/n$ es el valor de la pendiente que varía según las condiciones del ensayo. La concentración de Ca^{2+} y de glóbulos rojos son los factores que más influyen y por ello, es indispensable respetar el volumen final de la reacción para no modificar la concentración final de hematíes.

La transformación logarítmica de la ecuación de von Krough suministra una fórmula para la valoración del complemento, ya que su representación es una recta

$$\log x : \log K + 1/n \left(\frac{y}{1-y} \right)$$

Cuando $y : 50\%$ $\frac{y}{1-y}$ será :1 y $\log x$ igual a $\log K$, esto es la dosis de complemento que produce el 50 % de hemólisis.

Por lo tanto, graficando los valores de $\log x$ en función de $\log \frac{y}{1-y}$ en el punto que la curva corta a $\log \frac{y}{1-y} : 0$, esa cantidad de suero corresponderá a la UCH_{50} .

- Fijación de complemento :La actividad fijadora de complemento de los anticuerpos fue ensayada por determinación del 50 % de hemólisis.

A los sueros bovinos se le practicaron diluciones dobles, de 1/10 a 1/320 (tubo 1 al 6). En el tubo 7 se colocó el suero diluído 1/10 .

El sistema hemolítico usado estaba formado por volúmenes iguales de glóbulos rojos de carnero al 4 % y suero hemolítico $4 UH_{50}$ / ml, incubando 30 minutos a 37 °C.

La UCH_{50} se ajustó de forma tal que la hemólisis del tubo 8 fuera del 100 %. Este criterio se adoptó considerando la fijación inespecífica del antígeno particulado.

El antígeno utilizado corresponde al designado con la letra A, que se describió anteriormente, empleándose en diversas diluciones hasta lograr la concentración

adecuada.

El protocolo seguido para la reacción de fijación de complemento es el que se indica en el Cuadro nº 4 .

La mezcla se incubó en baño termostático a 37 °C durante 30 minutos. Se centrifugó a 700 x g durante 10 minutos y la lectura de los sobrenadantes se efectuó a 530 nm en espectrofotómetro.

Los tubos 1-6 corresponden a la reacción propiamente dicha. Si en ellos se observa lisis, estamos en presencia de sueros que no poseen anticuerpos para el antígeno involucrado. Si al menos los primeros tubos no presentan lisis, el suero tiene anticuerpos fijadores del complemento probado.

El tubo nº 7 debe presentar hemólisis total, de lo contrario el suero es anticomplementario . El tubo nº 8 es el que se toma como 100 % para calcular los títulos de los sueros y prueba la anticomplementariedad del antígeno, también debe presentarse hemolizado. El tubo nº 9 es el blanco de la reacción, y el tubo nº 10 corresponde al 100 % de lisis provocada por el agua destilada.

Como título de anticuerpos fijadores de complemento se consideró la máxima dilución que provocaba una hemólisis menor al 50 % de la obtenida en el tubo nº 8.

Análisis de los resultados: Para el análisis de los resultados se aplicó Análisis de varianza, trabajando con la recíproca de los títulos.

La sensibilidad y especificidad de las pruebas utilizadas se compararon según el siguiente esquema:

| | | | |
|----------|---|----------|---|
| | | Prueba 1 | |
| | | + | - |
| Prueba 2 | + | A | C |
| | - | B | D |

$$\text{Sensibilidad: } \frac{A}{A + B} \times 100$$

$$\text{Especificidad: } \frac{C}{C + D} \times 100$$

Cuadro n° 2

Esquema de la titulación de la hemolisina

| Tubo N° | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---------------------------|-----|-----|-----|------|------|------|-------|-------|-------|--------|-----|-----|
| Sol. Mayer (ml) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 2,0 | - |
| Hemolisina diluida (ml) | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | - | - |
| Dilución hemol. | 200 | 400 | 800 | 1600 | 3200 | 6400 | 12800 | 25600 | 51200 | 102400 | | |
| Suero de cobayo 1/20 (ml) | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | - | - |
| Agua dest. (ml) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 2,0 |
| G.R.C. 2 % (ml) | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |

Cuadro n° 3

Esquema de la titulación del complemento

| Tubo N° | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|---------------------------|------|------|------|-------|-------|-------|-----|-----|
| Sol. Mayer (ml) | - | - | - | - | - | - | 1,0 | - |
| Suero cobayo diluido (ml) | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | - | - |
| Dilución complemento | 1/20 | 1/40 | 1/80 | 1/160 | 1/320 | 1/640 | - | - |
| Sistema hemolítico (ml) | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | |
| G.R.C. 2 % (ml) | - | - | - | - | - | - | - | 1,0 |
| Agua destilada (ml) | - | - | - | - | - | - | - | 2,0 |

Cuadro n° 4

Esquema de la fijación de complemento

| Tubo N° | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|-----------------------|------|------|------|------|-------|-------|------|-----|-----|-----|
| Sol. Mayer (ml) | - | - | - | - | - | - | - | 1,0 | 2,0 | - |
| Suero diluido (ml) | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | - | - | - |
| Dilución del suero | 1/10 | 1/20 | 1/40 | 1/80 | 1/160 | 1/320 | 1/10 | - | - | - |
| Antígeno 1/1200 (ml) | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | - | 0,5 | - | - |
| Complemento 1/50 (ml) | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 1,0 | 0,5 | - | - |
| Agua destilada (ml) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 2,0 |

Se mezcla. Se incuba a 37 °C durante 60 minutos

| | | | | | | | | | | |
|-------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Sistema hemolítico (ml) | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
|-------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|

Se mezcla. Se incuba a 37 °C durante 30 minutos:

R E S U L T A D O S

En la realización del ELISA, se utilizaron dos tipos de policubetas, flexibles y rígidas. Las rígidas fueron descartadas pues en ellas no se lograba adsorción del antígeno. Las de plástico flexible permitieron obtener resultados satisfactorios, adoptándose éstas para el desarrollo de éste trabajo.

Con este material, la adsorción de los antígenos A y B resultó más eficiente cuando la incubación se practicó durante toda la noche a 4 °C, en solución de carbonato de sodio 0,05 M, pH9,6. El título del antígeno (A) fue de 1:800 y del (B) 1:200.

Las reacciones inespecíficas motivadas por la adsorción de anticuerpos a los sitios del pocillo no ocupados por el antígeno se descartaron bloqueando 12 horas a 4 °C con seroalbúmina bovina al 0,5 %, incorporada en la solución SST-T-SAB.

Los sueros bovinos se probaron en dilución 1:10 a 1:1280, incubando una hora a temperatura ambiente.

La dilución del conjugado correspondió a 1:200.

El sustrato utilizado fue bencidina - agua oxigenada, lográndose resultados más adecuados luego de incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente y al abrigo de la luz.

Luego de la estandarización de la técnica con los sueros controles positivo y negativo, se procedió a analizar 21 sueros, escogidos al azar del rodeo problema, utilizando por separado el antígeno A y el antígeno B, observándose diferencias muy notables en los títulos obtenidos con ambas preparaciones antigénicas (Cuadro Nº 5).

Para descartar reacciones cruzadas con otros microorganismos se procedió a la adsorción de los sueros con una suspensión de Mycobacterium phlei .

Luego de esta adsorción se ensaya nuevamente con el antígeno A y con el antígeno B. Los resultados obtenidos se indican en el cuadro Nº 5 .

Como el antígeno B no presentó diferencias estadísticamente significativas, cuando se usó con los sueros adsorbidos y sin adsorber con M. phlei , se optó por utilizar este antígeno en el ELISA, descartándose el antígeno A por presentar diferencias estadísticamente significativas (F : 18,70) entre los resultados obtenidos en los sueros adsorbidos y sin adsorber con Mycobacterium phlei.

Cuadro N° 5

Resultados obtenidos con los antígenos A y B

| Suero N° | Antígeno A (x) | | Antígeno B (xx) | |
|----------|------------------------------|--|------------------------------|--|
| | Sueros sin tratar Títulos | Sueros adsorb. con M. phlei Títulos | Sueros sin tratar Títulos | Sueros adsorb. con M. phlei Títulos |
| 721 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4911 | 1:320 | 0 | 0 | 0 |
| 5076 | 1:640 | 0 | 0 | 0 |
| 5033 | 1:160 | 0 | 0 | 0 |
| 5051 | 1:80 | 0 | 0 | 0 |
| 5071 | 1:320 | 0 | 0 | 0 |
| 5677 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5070 | 1:80 | 0 | 0 | 0 |
| 33 | 1:320 | 1:80 | 1:80 | 1:80 |
| 4897 | 1:160 | 1:80 | 1:20 | 1:20 |
| 4917 | 1:1280 | 1:80 | 1:80 | 1:80 |
| 4923 | 1:320 | 1:20 | 1:320 | 1:320 |
| 4932 | 1:1280 | 1:320 | 1:320 | 1:320 |
| 4950 | 1:640 | 1:10 | 1:80 | 1:20 |
| 4961 | 1:160 | 1:10 | 1:20 | 1:20 |
| 5011 | 1:640 | 1:80 | 1:80 | 1:80 |
| 5021 | 1:1280 | 1:20 | 1:160 | 1:20 |
| 5035 | 1:640 | 1:40 | 1:40 | 1:40 |
| 5075 | 1:80 | 1:40 | 1:80 | 1:40 |
| 4977 | 1:1280 | 1:20 | 1:160 | 1:40 |
| 5836 | 1:640 | 1:80 | 1:160 | 1:80 |

(x) F = 18,70 δ p < 0,01

(xx) F = 0,50 DNS

Los resultados logrados por ELISA con todas las muestras obtenidas del rodeo durante tres años se indican en el Cuadro Nº 6.

Cuadro Nº 6

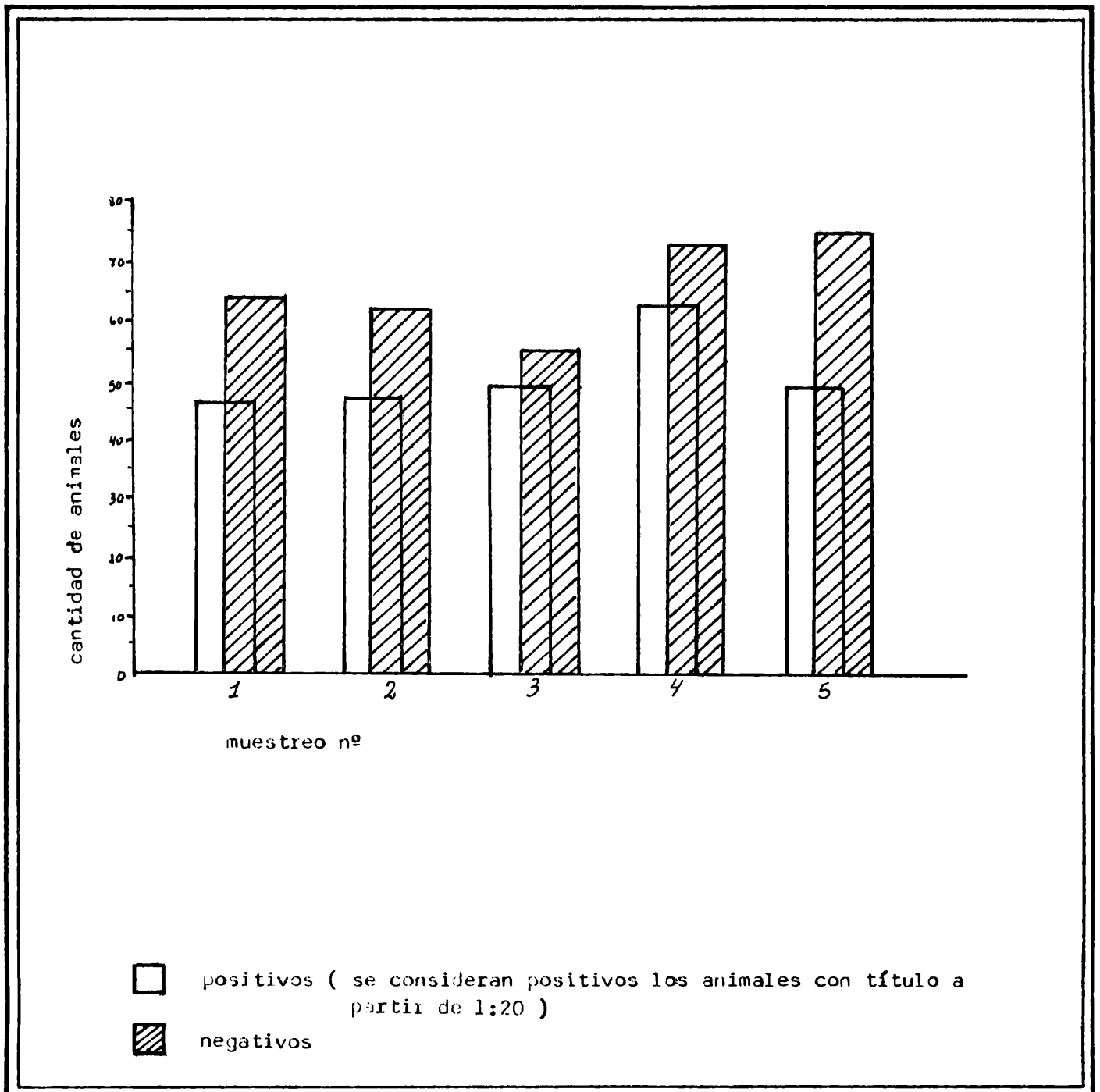
Distribución de títulos obtenidos por ELISA en los cinco muestreos

| MUESTREO | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | |
|----------|-------------|-----|-----|-----|-----|-------|
| TITULO | ANIMALES N° | | | | | TOTAL |
| <1:10 | 57 | 54 | 48 | 67 | 66 | 292 |
| 1:10 | 7 | 8 | 7 | 6 | 9 | 37 |
| 1:20 | 9 | 8 | 10 | 15 | 18 | 60 |
| 1:40 | 14 | 13 | 13 | 20 | 11 | 71 |
| 1:80 | 15 | 13 | 14 | 22 | 14 | 78 |
| 1:160 | 5 | 11 | 8 | 4 | 5 | 33 |
| 1:320 | 3 | 2 | 4 | 2 | 1 | 12 |
| TOTAL | 110 | 109 | 104 | 136 | 124 | 583 |

La cantidad de positivos y negativos obtenidos por ELISA en cada muestreo están indicados en el gráfico nº 1.

Gráfico Nº 1

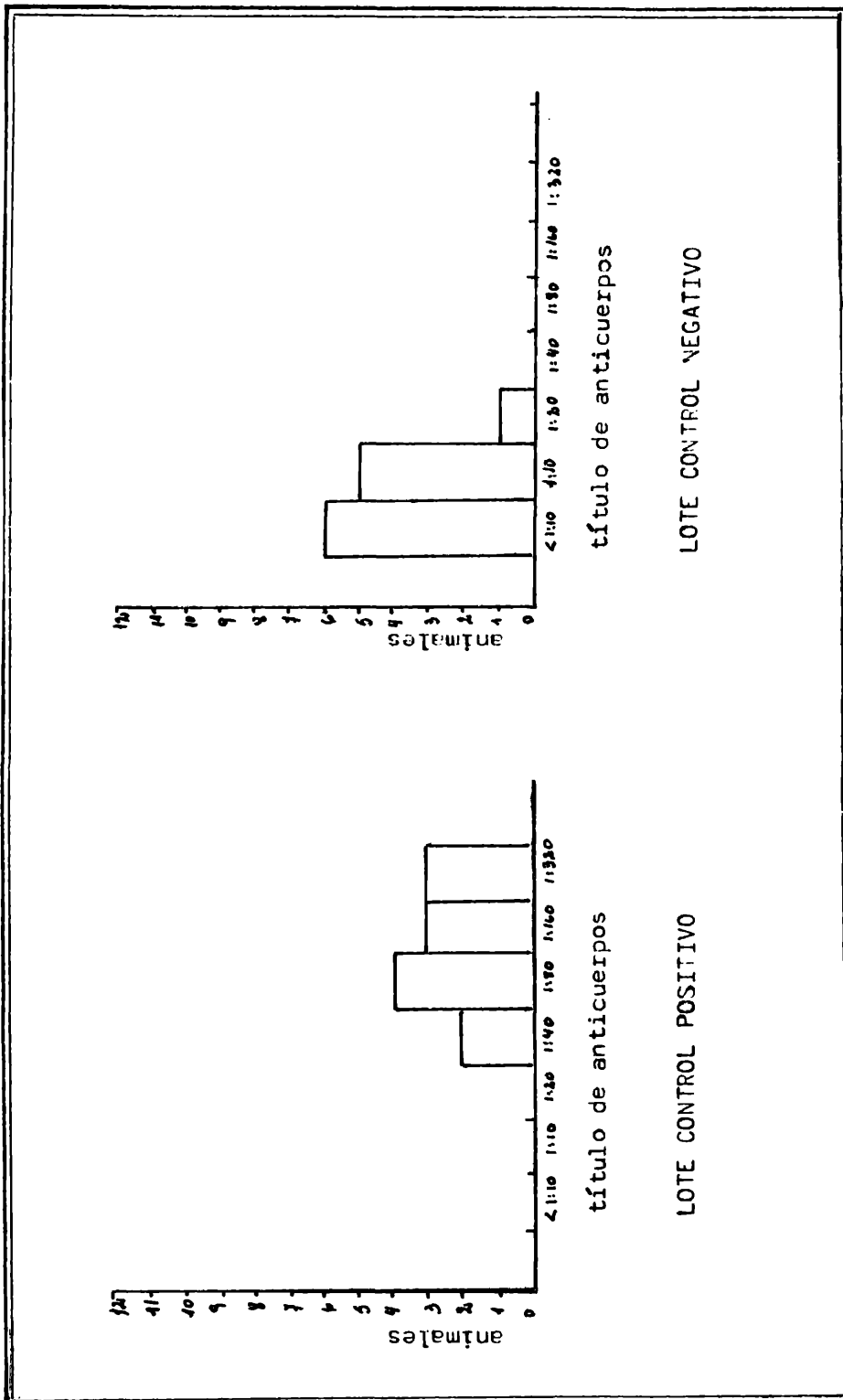
Resultados obtenidos por ELISA en cada muestreo



Quando el ELISA se aplicó a los lotes control se obtuvieron los resultados que se muestran en el gráfico Nº 2.

Gráfico Nº 2

Distribución de los títulos de anticuerpos obtenidos por ELISA en los lotes control



El análisis de varianza aplicado a los datos del Gráfico Nº 2 correspondió a $F: 21,906$ $p < 0,01$.

Todos los animales del lote negativo mostraron títulos 1:10 o menores, con la excepción de uno (8,33 %) que llegó a 1:20. Por ello, se adoptó como umbral negativo un título de 1:10, considerándose positivos los valores superiores a él.

Fijación de complemento: la actividad fijadora de complemento fue ensayada por determinación del 50 % de hemólisis.

Para la titulación de la hemolisina se realizó el cálculo del título aplicando la ecuación de von Krough.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla Nº 1.

Tabla Nº 1

Valores utilizados para calcular el título de la hemolisina

| Tubo N ^o | D.O. | y | $\frac{y}{100 - y}$ | x | log x | $\log \frac{y}{100 - y}$ |
|---------------------|-------|-----|---------------------|---------|--------|--------------------------|
| 8 | 0,571 | 62 | 1,63 | 25.000 | 4,4082 | 0,21 |
| 9 | 0,184 | 23 | 0,29 | 51.200 | 4,7093 | -0,53 |
| 10 | 0,047 | 5 | 0,05 | 102.400 | 5,0096 | 1,47 |
| 11 | 0,00 | 0 | - | 0 % H | - | - |
| 12 | 0,803 | 100 | - | 100 % H | - | - |

Para titular el complemento se procedió de manera análoga, los resultados se indican en la Tabla Nº 2.

Tabla Nº 2

Valores utilizados para calcular el título del complemento

| Tubo N ^o | D.O. | y | $\frac{y}{100 - y}$ | x | log x | $\log \frac{y}{100 - y}$ |
|---------------------|-------|-----|---------------------|--------|-------|--------------------------|
| 1 | 1,037 | 82 | 4,56 | 20 | 1,30 | 0,65 |
| 2 | 0,901 | 72 | 2,57 | 40 | 1,60 | 0,41 |
| 3 | 0,465 | 37 | 0,59 | 80 | 1,90 | -0,23 |
| 4 | 0,167 | 13 | 0,15 | 160 | 2,21 | -0,83 |
| 7 | 0,00 | 0 | - | 0 % H | - | - |
| 8 | 1,26 | 100 | - | 100% H | - | - |

La representación gráfica de estos datos se muestra en los Gráficos Nº 3 y Nº 4.

Gráfico Nº 3

Determinación de UH_{50} mediante graficación de $\log \frac{y}{100-y}$ versus $\log x$

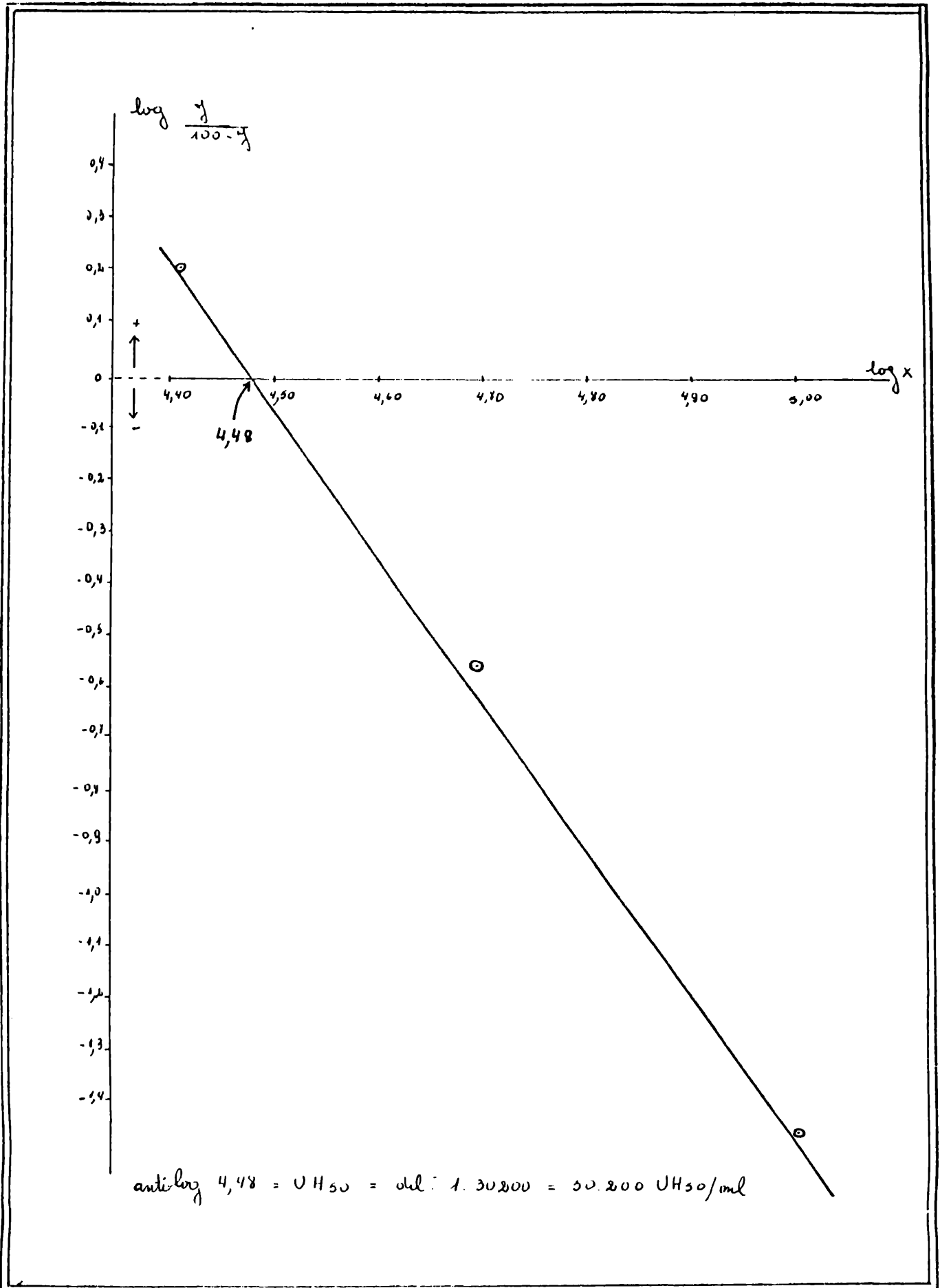
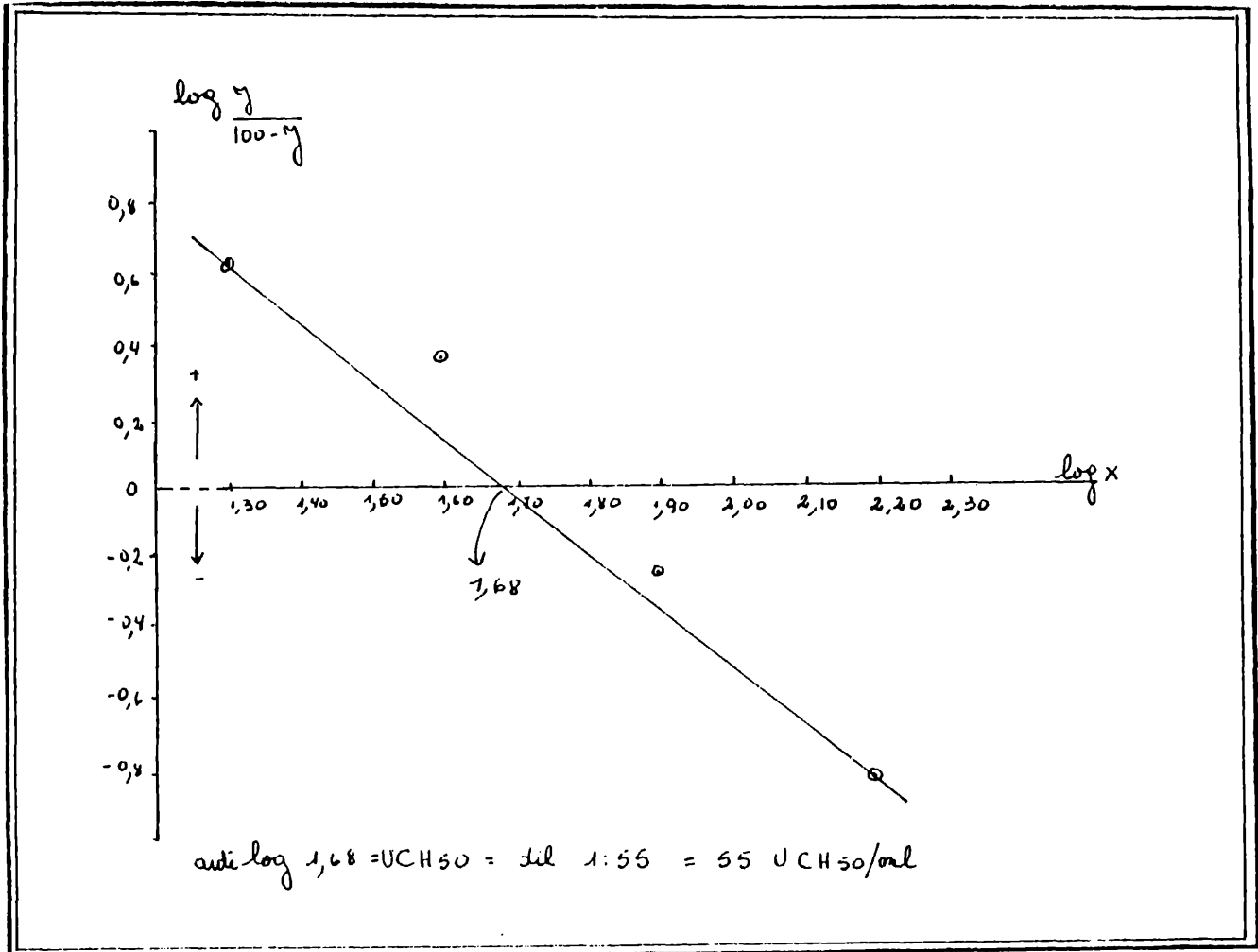


Gráfico Nº 4

Determinación de UCH_{50} mediante graficación de $\log \frac{y}{100-y}$ versus $\log x$



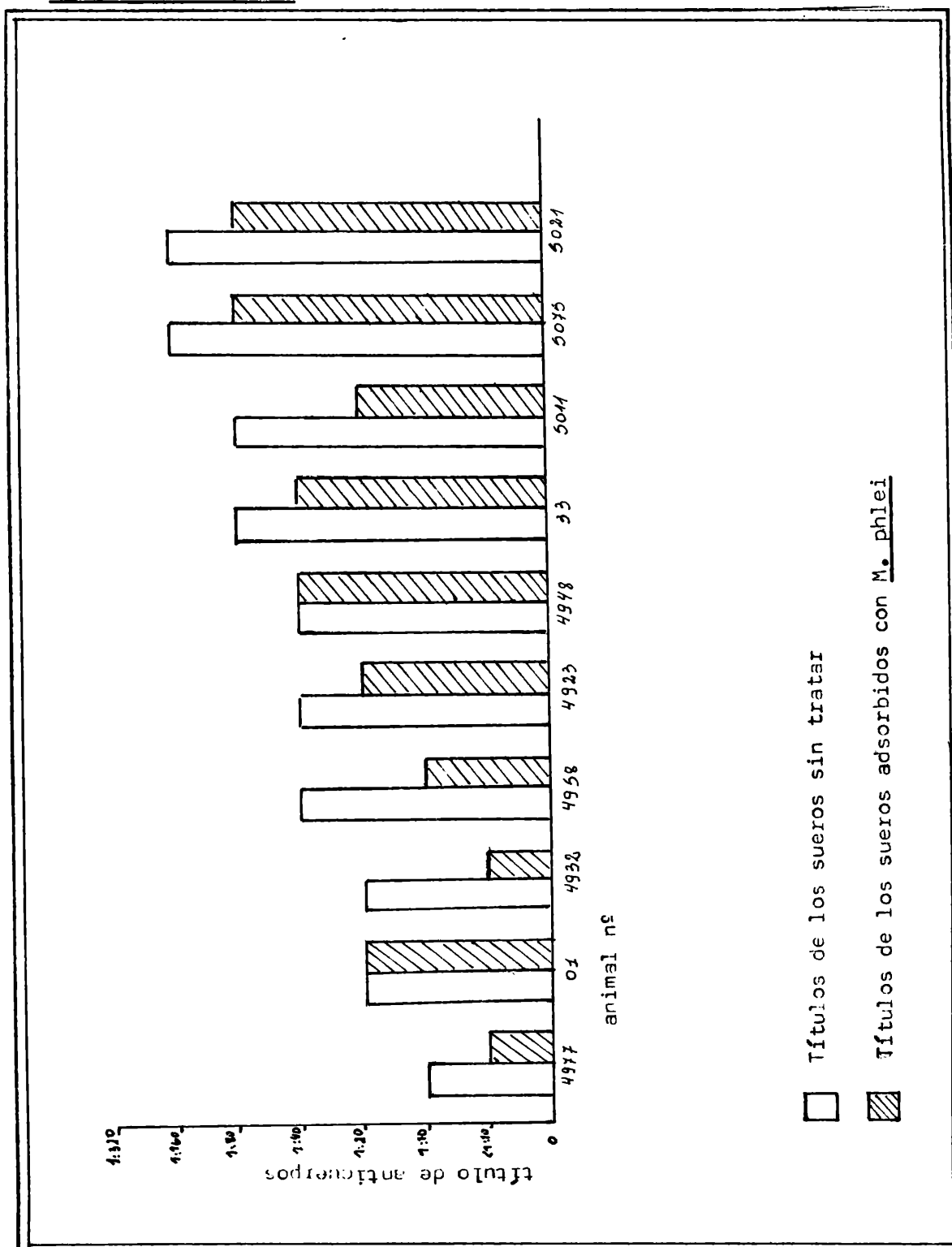
El antígeno utilizado para la prueba de fijación de complemento fue el A, estandarizado para ésta técnica, cuyo título fue de 1:1.200.

Para controlar si con este antígeno existían reacciones inespecíficas se tomaron 10 sueros elegidos al azar, siendo ensayados antes y luego de adsorberlos con M. phlei.

Los resultados obtenidos son los representados en el gráfico Nº 5.

Gráfico Nº 5

Resultados obtenidos por fijación de complemento en sueros con y sin adsorción con Mycobacterium phlei

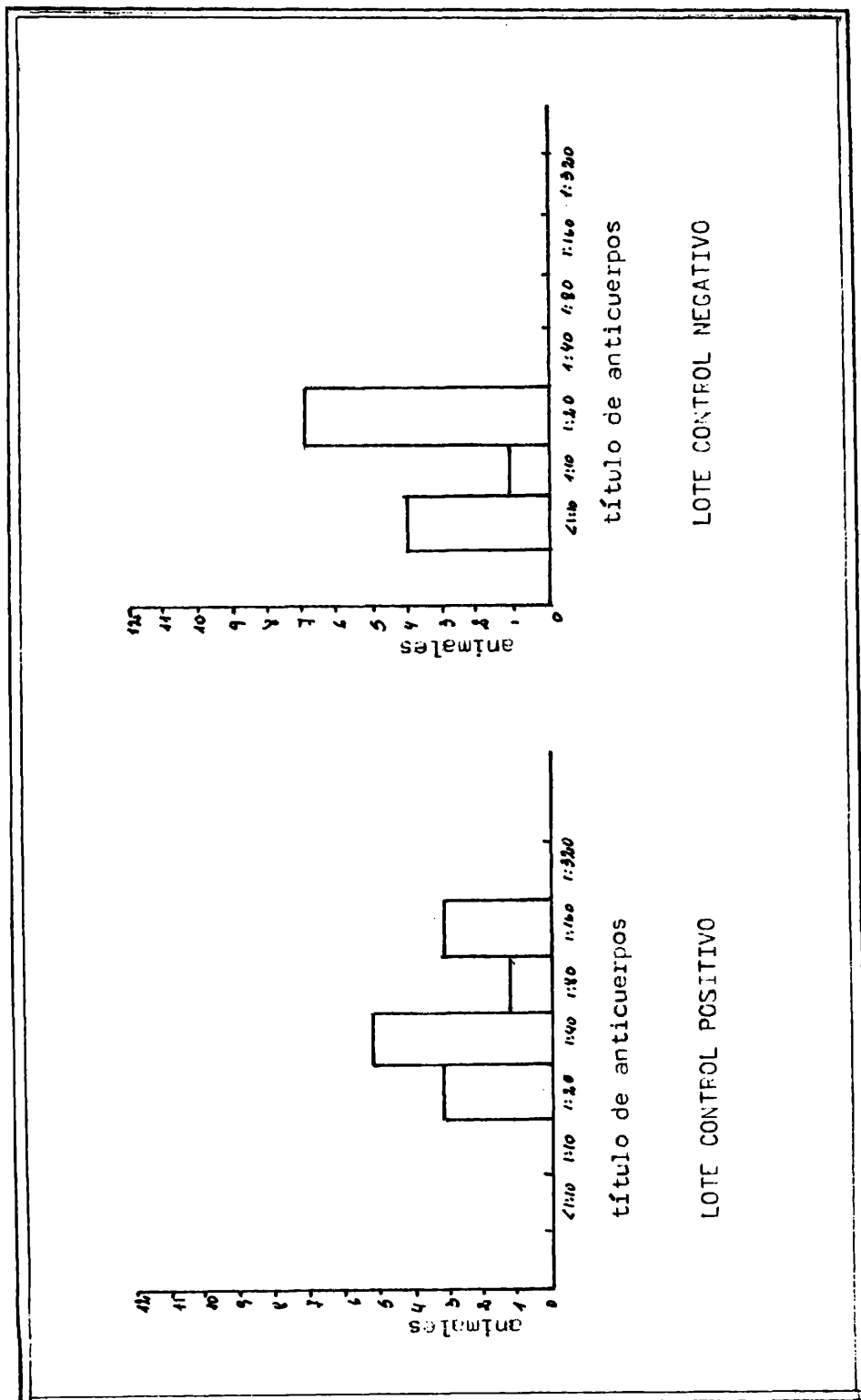


La prueba de fijación de complemento desarrollada con este antígeno, no presentó diferencias estadísticamente significativas (F; 2,96) entre sueros tratados y sin tratar con M. phlei.

Con esta técnica también se analizaron los lotes control (positivo y negativo) cuyos resultados se muestran en el Gráfico Nº 6.

Gráfico Nº 6

Distribución de los títulos de anticuerpos obtenidos por F.C. en los lotes control



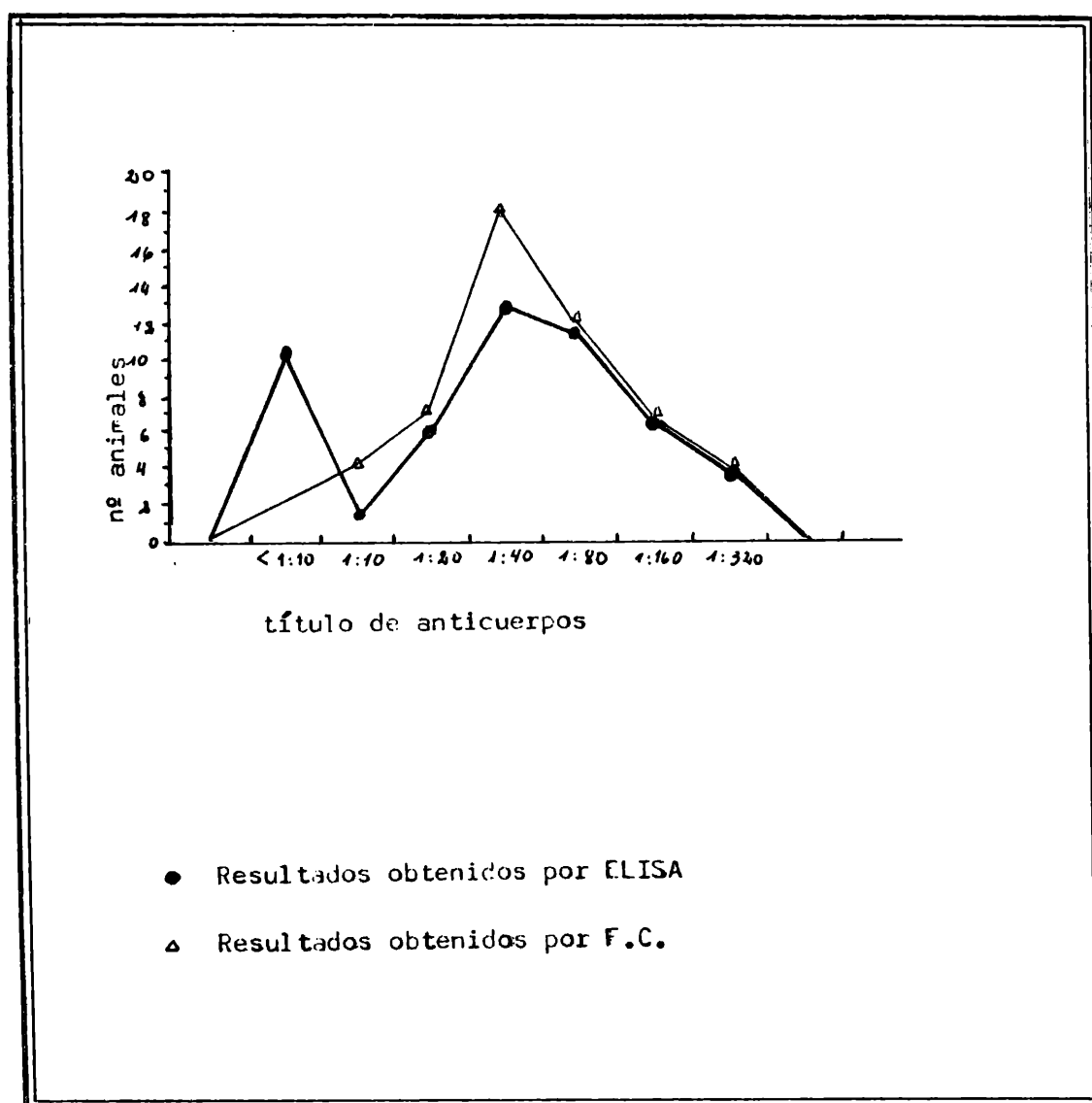
El análisis estadístico de los resultados obtenidos de los lotes positivo y negativo arrojó un $F : 11,00$ ó $p < 0,01$. En siete animales del lote negativo, el título de anticuerpos determinado por esta prueba fue de 1:20, considerándose se positivo un título de 1:40.

A continuación se analizaron 50 sueros del rodeo problema, elegidos al azar entre la totalidad de muestras por medio de la tabla de números aleatorios.

El gráfico Nº 7 permite comparar los resultados obtenidos al procesar esos sueros por ELISA y F.C.

Gráfico Nº 7

Resultados obtenidos por ELISA y F.C. en 50 muestras de suero.



Teniendo en cuenta los umbrales indicados para ambos métodos, del total de 50 animales, 39 resultaron positivos y 11 negativos, habiendo una coincidencia total entre ELISA y F.C.

De estos resultados se obtuvieron los datos para determinar la sensibilidad y especificidad de ambos métodos.

Los 50 sueros analizados por ELISA y F.C. arrojaron los siguientes resultados: 31 fueron positivos a ambos métodos, 10 resultaron positivos a F.C. y negativos a ELISA, 8 resultaron positivos a ELISA y negativos a F.C. y solamente 1 (uno) suero resultó negativo para ambos métodos. De estos datos se obtuvo la siguiente tabla para el análisis de la sensibilidad y especificidad de la prueba de F.C.

| | | | |
|---|-------|--------|---|
| | | + F.C. | - |
| + | ELISA | 31 | 8 |
| - | | 10 | 1 |

Para F.C. los porcentajes obtenidos fueron los siguientes:

$$\text{Sensibilidad} : \frac{31}{31 + 10} \times 100 : 75,61 \%$$

$$\text{Especificidad} : \frac{8}{8 + 1} \times 100 : 88,89 \%$$

Análogamente, los datos para calcular el porcentaje de sensibilidad y especificidad del ELISA son los siguientes:

| | | | |
|---|------|---------|----|
| | | + ELISA | - |
| + | F.C. | 31 | 10 |
| - | | 8 | 1 |

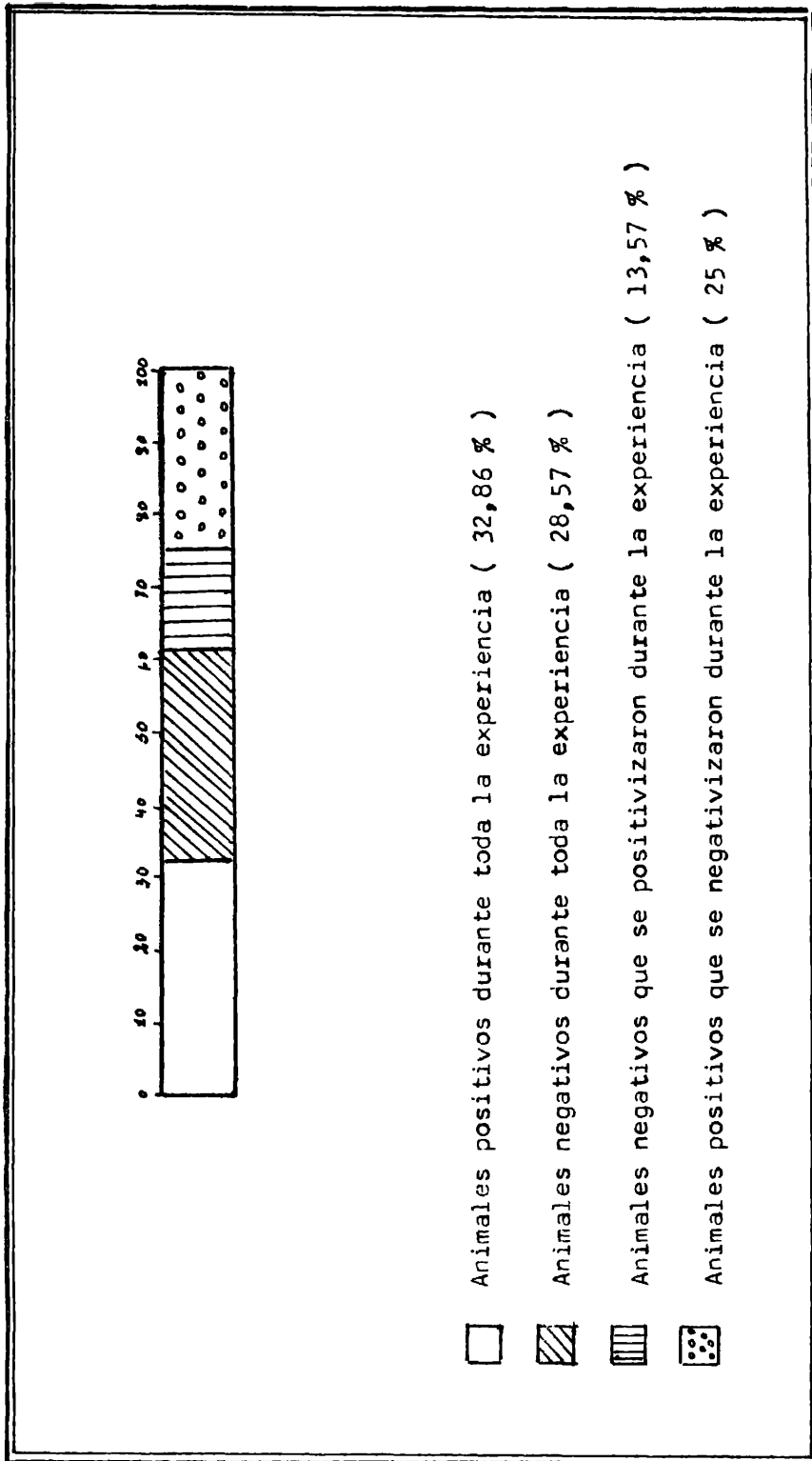
$$\text{Sensibilidad} : \frac{31}{31 + 8} \times 100 : 79,49 \%$$

$$\text{Especificidad} : \frac{10}{10 + 1} \times 100 : 90,91 \%$$

Para finalizar se presenta el gráfico Nº 8 que muestra la evolución serológica del rodeo durante los tres años en que se realizó la experiencia.

Gráfico Nº 8

Evolución serológica del rodeo durante tres años. Datos obtenidos por ELISA expresados en porcentaje



D I S C U S I O N

En este trabajo se estudió la respuesta serológica en un rodeo de tambo naturalmente infectado con Mycobacterium paratuberculosis. Las pruebas serológicas ensayadas - ELISA y F.C. - resultaron ser eficientes obteniendo en ambas resultados comparables, siendo leve las diferencias de sensibilidad y especificidad. ELISA mostró el 79,49 % de sensibilidad y 90,91 % de especificidad y F.C. el 75,61 % de sensibilidad y 88,89 % de especificidad.

No ha sido aún encontrada una prueba diagnóstica que reúna las condiciones ideales, esto se debería a la variabilidad en la respuesta individual, la lenta evolución de la enfermedad o la baja especificidad de las preparaciones antigénicas utilizadas en las pruebas ¹⁰⁸.

Al ensayar en ELISA el antígeno elaborado por Jorgensen y Jensen para la prueba de fijación de complemento (A), se obtuvieron resultados no satisfactorios debido al elevado número de reacciones inespecíficas. Esto se evidenció en el descenso del título de anticuerpos producido al efectuar las adsorciones de los sueros con M. phlei ($p < 0,01$). En cambio cuando fue utilizado en la prueba de F.C. se obtuvieron resultados muy alentadores como lo mostró la realización del control de especificidad.

El otro antígeno ensayado en ELISA, (B) elaborado con una metodología sumamente sencilla y de bajo costo, lo que brindaría un aporte interesante para el diagnóstico de esta enfermedad. Los resultados obtenidos empleando este antígeno cuando se probó con sueros adsorbidos y sin adsorber con M. phlei, a los efectos de realizar el control de especificidad fueron satisfactorios; de ambos ensayos se obtuvo un $F: 0,50$, indicando que este antígeno es específico para el diagnóstico de la paratuberculosis bovina.

Para analizar la seguridad de las pruebas en la detección de animales infectados, se incorporaron dos lotes control, positivo y negativo. Los resultados obtenidos por ELISA frente a ambos lotes, procesados estadísticamente , arrojaron un $F: 21,89$ ó $p < 0,01$ y la prueba de F.C. proporcionó frente a los mismos lotes analizados de igual manera , un $F: 11,00$ ó $p < 0,01$.

De estos resultados se deduce que ambas pruebas demuestran alta eficiencia en la detección de animales infectados, siendo levemente superior el ELISA como lo de-



muestran los porcentajes de sensibilidad y especificidad obtenidos.

Con respecto a los títulos, se consideró para ELISA como umbral negativo 1:10 y para F.C. 1:20, adoptándose este criterio por hallarse animales con estos títulos en el lote control negativo. Según Davison ²¹, la prueba de F.C. no sería confiable en rodeos con tuberculosis bovina, debido a la coparticipación antigénica entre microorganismos del género Mycobacterium; pudiendo ser esta la causa de los títulos obtenidos en el lote control negativo.

Aplicando la prueba de ELISA a las distintas muestras obtenidas a lo largo de tres años se pudo hallar que entre el 39 y 46 % de los animales de este rodeo eran reactores positivos. Estos resultados se aproximan a los obtenidos por Chiodine ¹⁸, quien encuentra en rodeos infectados entre 38 y 42 % de animales reactores.

Analizando la evolución serológica del rodeo durante los tres años que duró la experiencia, encontramos que 32,86 % de los animales permanecieron positivos, 28,57 % permanecieron negativos durante igual período, observando que sólo el 60 % de la población permanece estable serológicamente, ya que el 13,57 % comenzó siendo negativo y se positivizó más tarde, siendo este porcentaje correspondiente a los animales que se infectaron dentro del período de realización de la encuesta, o que estaban en el período inicial de la enfermedad, donde la respuesta mediada por células está presente, siendo negativos a las pruebas serológicas en esta etapa ¹⁸.

El 25 % restante comenzó siendo positivo serológicamente, negativizándose en el transcurso del período de observación; las causas de este fenómeno no están bien conocidas, aunque la energía que se produce en el estadio clínico terminal de la enfermedad podría ser una de ellas.

Sin embargo, no sería este el caso, pues los casos clínicos no superaban el 7 % de la población, con una mortalidad entre 1-2 % de los animales adultos.

Tal vez, el excelente estado nutricional haya sido el factor que impidió la aparición de un mayor porcentaje de casos clínicos.

Por último, y cumpliendo con uno de los objetivos de este trabajo - la realización de una técnica de diagnóstico de poblaciones-, los resultados obtenidos confirman que una sola prueba no provee información definitiva de la presencia o ausencia de la enfermedad para el diagnóstico individual. Para ello, se requerirían dos



o más pruebas con un intervalo mínimo de 4 meses.

En el diagnóstico de poblaciones se pudo afirmar que el ELISA puede detectar con una sola prueba la presencia de la enfermedad en el rodeo, aunque resultados negativos requieren ser confirmados posteriormente.

Cabe la posibilidad que el conocimiento de las cepas autóctonas del M. paratuberculosis permita en el futuro la obtención de un antígeno más adecuado, mejorando la especificidad y sensibilidad de la prueba diagnóstica.

A handwritten signature in black ink, located in the bottom right corner of the page. The signature is stylized and appears to consist of several loops and a long horizontal stroke at the end.

CONCLUSIONES

- Se determinó que el antígeno estandarizado para la prueba de F.C. cedido por Jorgensen y Jensen, no pudo ser utilizado en la realización del ELISA. Por el contrario, el antígeno elaborado por desintegración ultrasónica demostró poseer en ELISA una sensibilidad del 79,49 % y un 90,91 % de especificidad; los resultados fueron sumamente alentadores dada la simplicidad en la elaboración y el bajo costo.
- Al observar la evolución serológica del rodeo durante tres años se obtuvo el siguiente porcentaje: 32,86 % de los animales permanece positivo durante la experiencia, 28,57 % permanece negativo durante igual período, 13,57 % se positiviza y 25 % se negativiza. De esto se deduce que son necesarias para el diagnóstico individual 2 ó 3 muestras con un intervalo mínimo de 4 meses entre muestra y muestra.
- La prueba de F.C. ensayada al 50 % de hemólisis con algunos sueros de los bovinos pertenecientes al rodeo infectado arrojó resultados comparables con los obtenidos por ELISA, aunque los porcentajes de sensibilidad y especificidad fueron levemente inferiores.
- La prueba de ELISA, desarrollada con el antígeno preparado en nuestro laboratorio, puede emplearse con igual o mayor confianza que la prueba de F.C. en el diagnóstico de la paratuberculosis bovina.



B I B L I O G R A F I A

- 1.- ABBAS, B. Evaluation of the fluorescent antibody test for diagnosis of paratuberculosis. Am. J. Vet. Res. 44 (4) : 720-721 (1983)
- 2.- ABBAS, B. Isolation of specific peptides from Mycobacterium paratuberculosis protoplasm and their use in an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of paratuberculosis (Johne's disease) in cattle. Am. J. Vet. Res. 48 (12) : 2229-2236 (1983)
- 3.- AULT, C.N. Un caso de enfermedad de Johne en el lanar. Rev. Med. Vet. 14 (9-10) : 401-405 (1942)
- 4.- AVRAMEAS, S. Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies. Immunochem. 6 : 43 (1969)
- 5.- BAHARSEFAT, A.R. Maladie de Johne (Paratuberculosis) Chez les Caprine et les ovins en Irán. Archs. Inst. Razi. 24 :49-61 (1972)
- 6.- BARKSDALE, L. Mycobacterium. Bacteriol. Rev. 41 (1) : 217-372 (1977)
- 7.- BENEDIXEN, P.H. Application of the direct leukocyte-migration agarose test in cattle naturally infected with M. paratuberculosis. Am. J. Vet. Res. 38 (12) : 1161-1162 (1977)
- 8.- BENEDIXEN, P.H.; BLOCH, B. Lack of intracellular degradation of M. paratuberculosis by bovine macrophages infected in vitro and in vivo, light microscopic and electron microscopic observations. Am. J. Vet. Res. 42 (11) 109-113 (1981)
- 9.- BENEDIXEN, P.H. Application of the direct leukocyte-migration agarose test in cattle from M. paratuberculosis infected herd. Am. J. Vet. Res. 38(8) 2027-2028 (1977)
- 10.- BU-ERGEIT, C.R. Lymphocyte transformation: an aid in the diagnosis of paratuberculosis. Am. J. Vet. Res. 38 (11):1709-1715 (1977)
- 11.- BUERGEIT, C.R. Johne's disease: a comparison of cultural, morphologic and immunologic diagnostic techniques. Dissertation Abstracts International 38 B (3): 1077-1078 (1977)
- 12.- BUERGEIT, C.R. In vitro lymphocyte transformation as a herd survey method for bovine paratuberculosis. Am. J. Vet. Res. 39 (4): 591-595 (1978)

- 13.- BUERGHEIT, C.R. Age and milk production data of cattle culled from a dairy herd with paratuberculosis. J.A.V.M.A. 173 (5):478-480 (1978)
- 14.- BUTLER, J.E. Bovine Immunoglobulins: an augment review. Vet. Immunol and Immunopathol. 4:43-152 (1938)
- 15.- CAMPHAUSEN, R.T. A glycolipid antigen specific to Mycobacterium paratuberculosis structure and antigeniticity. Proc. Natl. Acad. Sci. 82(10):3068-3072 (1985)
- 16.- CHANDLER, R.L. A preliminary note on a micro-complement fixation test for Johne's disease. Vet. Rec. : 4-5 (1956)
- 17.- CHANDLER, R.L. A micro-complement fixation for Johne's disease and its application to diagnosis in cattle and sheep. Vet. Rec. : 819-826 (1956)
- 18.- CHIODINE, R.J. ; VAN KRUNNINGEN, H. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease) The current status and future prospects. Cornell Vet. 74 (?): 218-262 (1984)
- 19.- CHIODINE, R.J. The prevalence of paratuberculosis in culled New England cattle. Cornell Vet. 76 (1): 91-104 (1986)
- 20.- CUNNINGHAM, M.P. A new method of preparing smears of bovine faeces for microscopical examination in the diagnosis of Johne's disease. Vet. Rec. 71 (3) : 47-48 (1959)
- 21.- DAVISON, R.H. Paratuberculosis and tuberculine tests. Vet. J. 12:123 (1964)
- 22.- DOYLE, T.M. Johne's disease. Vet. Rec. :1-18 (1956)
- 23.- DOYLE, T.M. Foetal infection in Johne's disease. Vet.Rec. 70:238 (1958)
- 24.- DUBARRY, J.R. Paratuberculosis bovina en la provincia de La Pampa. Gac. Vet. 45 (379): 357-364 (1983)
- 25.- ENGWALL, E. Enzyme linked immunosorbent assay. Quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochemistry. 8; 871-874 (1971)
- 26.- FRENCH, C.S. Diagnóstico de paratuberculosis en rodeo de cría . Gac. Vet. 36 (293):6 61-663 (1974)
- 27.- GAGGINO, O.P. Paratuberculosis. Canefa Publicación Técnica: 57-62 (1963)
- 28.- GAGGINO, O.P. y CARRELLIO, B.J. Enteque seco. Observaciones de lesiones de tipo paratuberculosis en bovinos con Enteque seco. Rev. Invest. Ganad. 16; 39-45 (1963)

- 29.-GAGGINO, O.P. y CARRILLO, B.J. Enteque seco. Resultado de pruebas intradérmicas dobles con tuberculina bovina y aviar en bovinos de zonas de "Enteque seco" en el S.E. de la provincia de Buenos Aires. Rev. Invest. Ganad. 1 (7):67-71 (1964)
- 30.- GAGGINO, O.P. y STOMESSEL, F.R. Difusión de la infección natural con *M. johnei* en bovinos de matadero tipo conserva del S.E. de la provincia de Buenos Aires. Invest. Agropecuaria INTA 4 (3):31-36 (1967)
- 31.- GAGGINO, O.P. Paratuberculosis o enfermedad de Johne. Proyección Rural: 57-59 (1971)
- 32.- GAUMONT, R. The place of the conglutination test in the diagnosis of Johne disease in cattle. Bull. Off. Int. 58, 25-31 (1962)
- 33.- GIMENO, E.J. Enfermedad de Johne. Veterinaria Argentina 1 (3):210-219 (1984)
- 34.- GOTO, H. Some Observations on bovine paratuberculosis in Japan. Jap. J. Vet. Sci. 34:291-296 (1972)
- 35.- GOUDSWAARD, J. Diagnosis of Johne's disease in cattle: A comparison of five serological test under field conditions. Vet. Rec. 98(23) : 461-462 (1976)
- 36.- GOUDSWAARD, J. Serodiagnosis of Johne's disease in cattle. Proceedings of the 20 th World Veterinary Congress. Thessaloniki. 3:2025-2031 (1976)
- 37.- GUNNARSON, E. Analysis of antigens in *Mycobacterium paratuberculosis*. Acta Vet. Scand. 20:200-215 (1979)
- 38.- GUNNARSON, E. Isolation of *M. paratuberculosis* from sheep and cattle in Iceland. Acta Vet. Scand. 20 (2) 191-199 (1979)
- 39.- HINZ, A.M. Comparative lymphocyte stimulation studies on whole blood from vaccinated and nonvaccinated cattle with paratuberculosis. Am. J. Vet. R Res. 42(3) : 507-508 (1981)
- 40.- HUITEMA, H. Johne disease in cattle and vaccination. Neth. J. Vet. Sci. 1: 189- 196 (1968)
- 41.- HOREJSI, J. and SMETANA, R. The isolation of gamma-globulins from blood serum by Rivanol. Acta Med. Scand. 155:65 (1956)
- 42.- JARNAGIN, J. Serogglutination test for identification of *Mycobacterium paratuberculosis*. J. Clinical Microbiology 2(3) : 268-269 (1975)

- 43.- JANARGIN, J. The use the fluorescein diacetate and ethidium bromide as a stain for evaluation viability of Mycobacteria. *Stain Technology*. 55(4) 253-258 (1980)
- 44.- JENSEN, M.H. A complement -fixation test for Johne's disease in cattle. *Nord. Med. Vet.* 8:357-367 (1956)
- 45 .- JOHNSON, D.W. The use of lymphocyte transformation for the diagnosis of paratuberculosis (Johne's disease) in infected cattle. *Proceedings of the United States Animal Health Association*. 81: 467-469 (1977)
- 46.- JOHNSON, D.W. Skin testing, fecal culture and lymphocyte immunostimulation in cattle inoculated with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.* 38 (12) : 2023-2025 (1977)
- 47.- JORGENSEN, J.B. Studies on the incidence of paratuberculosis in cattle in Denmark. *Nord. Vet. Med.* 24 (6) : 297-308 (1972)
- 48.- JORGENSEN, J.B. and JENSEN, P.T. Elisa for detection of antibodies to M, paratuberculosis in cattle. *Acta Vet. Scand.* 19 (2):310-312 (1978)
- 49.- JORGENSEN, J.B. An improved medium for culture of M. paratuberculosis from bovine faeces. *Acta Vet. Scand.* 23(3):325-335 (1982)
- 50.- JUAN, N.J. Paratuberculosis bovina. *Gac. Vet.* 35 (27 5):241-246 (1973)
- 51.- KARPINSKI, T. Further studies on the diagnosis of paratuberculosis in cattle. *Polskie Archiwum Weterynaryjne* 17 (4): 609-621 (1975)
- 52.- KEITH, R.L. The detection of antibody against tubercle Bacilli in the serum of tuberculin positive cattle by an agar double diffusion precipitation technique. *Am. Rev. Resp. Dis.* 89:4954 (1954)
- 53.- KIM, J.C.S. Ultrastructural Studies of bovine paratuberculosis. *Vet. Med. Small Clinician* 71 (1) : 80-83 (1976)
- 54.- KONST, H. Studies of Johne's disease in Canada. Results of early intradermal testing with Johnin P.P.D. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 22 (6):203-214 (1958)
- 55.- KONST, H. and MC INPOST, C.M. Studies of Johne's disease in Canada. The use of Johnin P.P.D. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 22(6):157-160 (1958)
- 56.- KOPECKY, K.E. Certain blood constituent concentrations in cattle with paratuberculosis. *Am. J. Vet. Res.* 33 (11):2331-2334 (1972)

- 57.- KOPECKY, K.E. Intravenous johnin and tuberculin tests in cattle vaccinated with *Mycobacterium paratuberculosis* cells subsequently inoculated with *Mycobacterium bovis*. *Am. J. Vet. Res.* 36 (12): 1727-1729(1975)
- 58.- KUNZ, W. Clinical studies on the diagnosis of paratuberculosis in cattle and epidemiology of disease in Bavaria. *Tierärztliche.* 32 (11): 571-579 (1977)
- 59.- LARSEN, A. B. A modification of the middkebrokk-dubos hemagglutination test for use in the diagnosis of Johne's disease. *Am. J. Vet. Res.* 14 (52): 362-365 (1953)
- 60.- LARSEN, A.B. A comparison of regular intradermic johnin and purified protein derivative of intradermic johnin on artificially and naturally sensitized ruminants. *Am. J. Vet. Res.* 35-37 (1955)
- 61.- LARSEN, A.B. Experimental *Mycobacterium paratuberculosis* infection in C chickens. *Am. Vet. Res.* 33 (6) : 1231-1235 (1972)
- 62.- LARSEN, A.B. Paratuberculosis; The status of our knowledge. *J.A.V.M.A.* 161 (11); 15 39-1541 (1972)
- 63.- LARSEN, A.B. An extended study of a herd of cattle naturally infected with Johne's disease. II.- The significance of the complement-fixation test. *Am. J. Vet. Res.* 24 (102): 948-950 (1973)
- 64.- LARSEN, A.B. Johne's disease immunization and diagnosis. *J.A.V.M.A.* 163 (7): 902-904 (1973)
- 65.- LARSEN, A.B. Age of cattle as related to resistance to infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.* 36 (3): 255-257 (1975)
- 66.- LARSEN, A.B. *Mycobacterium paratuberculosis* in the semen and genital organs of a semen-donor bull. *J.A.V.M.A.* 179 (2): 169-171 (1981)
- 67.- LEICHUK, R. Sistema complemento. Valor diagnóstico de su determinación *Bioquímica Panamericana.* 2 (1) : 52-66 (1972)
- 68.- LYLE, P.A.S. Comparison of Elisa and gel diffusion precipitin test for Paratuberculosis in cattle, sheep and goats. *Abstr. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol.* 84 (0) (198 4)
- 69.- LISLE, G.W. Johne's disease. A study of the immunological responses of cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Diss. Abs. Int.* 39 B (11): 5266- 5267 (1979)

- 70.- LISLE, G.W. Bovine paratuberculosis. I.- A herd studie using complement fixation and intradermal test. Canadian of Comparative Medicine. 44(2): 177- 182 (1979)
- 71.- LISLE, G.W. Bovine paratuberculosis. II.- A comparison of fecal culture and the antibody response. Canadian Journal of Comparative Medicine. 44 2): 183-191 (1979)
- 72.- MAGARIÑOS, C. ; TORRES, B. y PÍNTO, C. Paratuberculosis. Campo Río de Janeiro 6 (8), 36-39 (1935)
- 73.- MANRIQUE, G. Primeras investigaciones sobre la fijación de complemento como medio de diagnóstico de la paratuberculosis bovina. Vet. Colombiana 1 (1):39-63 (1961)
- 74.- MARGNI, R.A. Inmunología e Inmunología . Fundamentos. Segunda Edición Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana. (1977)
- 75.- MC KENZIE, R.A. Rodococcus (Corynebacterium equi) A possible cause of reactions to the complement fixation test for Jhone's disease of cattle Australian Vet. Journal, 57:200 (1981)
- 76.- MERKAL, R.S. Serological and allergic effects of 3 Mycobacterium paratuberculosis antigens. Am. J. Vet. Res. 26 (115) 1267-1270 (1965)
- 77.- MERKAL, R.S. Experimental paratuberculosis in sheep after oral intracranial or intravenous inoculation; serological and intradermal test. Am. J. Vet. Res. 29 (5) : 963-969 (196 8)
- 78.- MERKAL, R.S. Improvements in the technique for primary cultivation of M. paratuberculosis. Am. J. Vet. Res. 25 (107) : 1290 - 1294 (1964)
- 79.- MERKAL, R.S. Comparison of examination and test methods for early detection of paratuberculosis. Am. J. Vet. Res. 29(8) : 1533-1538 (1968)
- 80.- MERKAL, R.S. Diagnostic methods for detection of paratuberculosis (Johne's disease). Proceedings of 74 th Annual Meeting U.S. Animal Health Association 620-623 (1970)
- 81.- MERKAL, R.S. Laboratory diagnosis of bovine paratuberculosis. J.A.V.M.A. 163 (9): 1100-1102 (1973)
- 82.- MERKAL, R.S. Analysis of the effects of inaparent bovine paratuberculosis Am. J. Vet. Res. 36 (6): 837-838 (1975)
- 83.- MERKAL, R.S. Paratuberculosis: Advances in cultural, serologic and vacci-

- nation methods. J.A.V.M.A. 184 (8): 939-943 (1984)
- 84.- MORRIS, J.A. and STEVENS, A.E. Aggregation and anticomplementary activity of antigen used in the complement fixation test for Johne's disease. Res. Vet. Sci. 21 (1) : 117-118 (1976)
- 85.- MORRIS, J.A. and STEVENS, A.E. An improved antigen for the paratuberculosis complement fixation test. Journal of Biological Standardization 5 (4) : 315- 319 (1977)
- 86.- NGUYEN, H.T. Indirect immunoperoxidase test for the diagnosis of paratuberculosis. Am. J. Vet. Res. 44 (11) : 2173-2174 (1983)
- 87.- NAKANE, P.K. Peroxidase- labeled antibody. A new method of conjugation. Journal of Chemistry. 22 (2); 1084-1091 (1974)
- 88.- NASSAU, E. The detection of antibodies to Mycobacterium tuberculosis by microplate enzyme linked immunosorbent assay. Tubercle. 57,67-70 (1976)
- 89.- NEMOTO, H. Media for Mycobacterium johnei. Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart. 5: 105-106 (1965)
- 90.- NEMOTO, H. Mycobactin requirement of growth of Mycobacterium johnei in semisolid medium. Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart. 9,53-54 (1969)
- 91.- PARMA, A.E. ; SANTISTEBAN, C.G. and MARGNI, R.A. Analysis and in vivo assay of cattle anti- Brucella abortus agglutinating and non agglutinating antibodies. Vet. Microbiology. 9: 391-398 (1984)
- 92.- PEARSON, J.K.L. Studies on Johne's disease in Northern Ireland. Diagnosis of non clinical infections. Brit. Vet. J. 118: 86-87 (1962)
- 93.- PEARSON, J.K.L. Studies on Johne's disease in cattle in Northern Ireland Diagnosis of clinical infections. Brit. Vet. J. 118:54-65 (1962)
- 94.- PODDUBSKII, I.V. Age susceptibility and resistance of cattle to paratuberculosis. Trudy Vses Inst. Eksp. Vet. 42: 218-234 (1964)
- 95.- RANKIN, J.D. The presence of Mycobacterium johnei in apparently normal cattle. Vet. Rec. :550 (1954)
- 96.- RANKIN, J.D. An attempt to prevent the establishment of Mycobacterium johnei in calves by means of isoniazid alone and in combination with streptomycin. Vet. Rec. 51 (67) : 1105- 1108 (1955)
- 97.- RANKIN, J.D. The present knowledge of Johne's disease. Vet. Rec. 70:1-5 (1958)

- 98.- RANKIN, J.D. The complement-fixation test in the diagnosis of Johne's disease in cattle. Vet. Rec. 70 (693): 383-388 (1958)
- 99.- RANKIN, J.D. The experimental production of Johne's disease in laboratory rabbits. J. of Path. and. Bact. 75 (2);363-366 (1958)
- 100.- RANKIN, J.D. The non-specificity of a complement-fixation test used in the diagnosis of Johne's disease in cattle. Res. Vet. Sci. 2(1): 89-95 (1961)
- 101.- RANKIN, J.D. Recent research on Johne's disease in the United Kingdom. Vet.- Bull. 32(3) : 127-131 (1962)
- 102.- RANKIN, J.D. The experimental infection of cattle with Mycobacterium johnei adult cattle maintained in an infections enviroment. J. Comp. Path. 72;113-117 (1962)
- 103.- RICE, CH. E. Studies of Johne's disease in Canada. III.- Diagnostic complement fixation tests. Canadian Journal of Comparative Medicine 22(7): 249-254 (1958)
- 104.- RICE, CH.E. Studies of Johne disease in Canada. V.- Comparative specificity of complement- fixation and intradermal reaction. Canadian Journal of Comparative Medicine. 22(7) ; 319-326 (1958)
- 105.- RICE, CH.E. Studies of Johne's disease in Canada. VI.- An attempt to possibility transfer sensitivity to johnin by means of plasma fractions. Canadian Journal of Comparative Medicine 23 (2) ; 59-64 (1959)
- 106.- RICE, CH.E. Studies of Johne's disease in Canada VII.- Complement-fixation test with a polysacharide fraction of Johne's bacilli. Canadian Journal of Comparative Medicine. 23 (9);291-295 (1959)
- 107.- RICE,CH.E. Studies of Johne's disease in Canada. X.- A more sensitive complement-fixation test. Canadian Journal of Comparative Medicine. 25 (5) 121-128 (1961)
- 108.- RIEMAN, H.P. Diagnosis and control of bovine paratuberculosis. Adv. Vet. Sci. Comp. Med. 27; 481-506 (1983)
- 109.- Rieman, H. Paratuberculosis in cattle and free-living exotic deer. J. A.V.M.A. 174 (8): 841-843 (1979)
- 110.- RINGDAL, G. Culture of Mycobacterium johnei. Acta Vet. Scand. 4;85-91 (1963)

- 111.- RINGDAL, G. Studies on Johne disease in a single herd during a five-year period. Nord. Vet. Med. 17:73-96 (1965)
- 112.- ROSENBUSCH, F. El primer caso de enfermedad de Johne comprobado en Argentina. 9^o Reunión de la Soc. Arg. de Patología Regional del Norte; 1115-1116 (1935)
- 113.- ROSENBUSCH, F. La enfermedad de Johne o enteritis paratuberculosa del bovino en la Argentina. Anales de la Sociedad Rural Argentina, 103-114 (1937)
- 114.- SANCHEZ-VIZCAINO Manual sobre el Enzimoinmunoensayo (Elisa) en patología animal: 1-47 (1980)
- 115.- SCHAAF, J. Allergic and serological diagnosis of Johne's disease. Rinder-Tuberk u Brucellose. 9:103-114 (1960)
- 116.- SCHUURS, A. Enzyme immunosorbent assay. Clínica Chimica Acta. 81:1-40 (1977)
- 117.- SEXEGAARD, F. Control of paratuberculosis (Johne's disease) in goats by vaccination. Vet. Rec. 116:439-441 (1985)
- 118.- SMITH, H.W. The examination of milk for the presence of Mycobacterium johnei. J. Path. Bact. 80: 440-442 (1960)
- 119.- da SILVA, N.M. Studies on Paratuberculosis. I.- Diagnosis. II.- Isolation of M. paratuberculosis in Hohn's medium. III.- Isolation in Chick embryos. Arq. Inst. Anim. Rio de Janeiro. 4: 169-173 (1963)
- 120.- STUART, P. The diagnosis of Johne's disease in cattle and the effect of vaccination on tuberculin and johnin tests. Bull. Off. Int. Epiz. 58: 33-50 (1962)
- 121.- SUMMERS, B.A. Laboratory diagnosis of Johne's disease; A potencial source of error. Vet. Rec. 108: 166-167 (1981)
- 122.- THOEN, CH .O. Recent developments in diagnosis of paratuberculosis. J. A.V.M.A. 174 (8): 836-840 (1979)
- 123.- THOEN, CH.O. Enzyme linked immunosorbent assay for detecting antibodies in swine infected with Mycobacterium avium. Am. J. Vet. Res. 40(8):1097-1099 (1978)
- 124.- THOREL, M.E. Experimental paratuberculosis biological diagnosis in cal-

- ves inoculated with Mycobactin-dependent Mycobacteria strains. Ann. Rech. Vet. 16(1) : 7-16 (1985)
- 125.- THOREL, M.F. Etude de M. paratuberculosis d'origine caprine et comparaison avec M. paratuberculosis d'origine ovine et bovine. Reveu. Med. Vet. 130 (12) : 1623- 1633 (1979)
- 126.- UBACH, F.O. Observaciones sobre la enfermedad de Johne y la enteritis coccidiocócica de los bovinos, ovinos y caprinos identificados en la Rca. Argentina. Rev. Med. Vet. 23 (1/2): 1-45 (1941)
- 127.- VENTUROLI, F. Observations on fluorescent examination for detections of M. paratuberculosis in cattle faeces. Annali della Faculta di Medicina Veterinaria di Torino. 26;241-246 (1976)
- 128.- VOLLER, A. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Bull. World. Health. Organ 53: 55-75 (1978)
- 129.- WEIR, D.M. Handbook of experimental Immunology. Vol 1: Immunochemistry 3^o edición. Blackwell Sc. publications. Oxford. Sec6-8 (1978)
- 130.- WILKS, C.R. Isolation of Mycobacteria inducing cross-reaction in the complement fixation test for Johne's disease . Res. Vet. Sci. 30 (3) : 323-327 (1981)
- 131.- WILLIAMS, E.S. Pathology of spontaneous and experimental infección of North American wild ruminants with M. paratuberculosis. Vet. Pathol. 20: 274-291 (1983)
- 132.- WOLFSTELLER, W. Enfermedad de Johne en la República Argentina. Boletín Epizootiológico de SELSA (1972)
- 133.- YUGI, H. Studies on Complement-fixation antigen of Johne's disease. Tokyo, Japan. Nat. Inst, Anim. Helth. Quart. 6: 152- 165 (1966)
- 134.- YOKOMIZO, Y. Enzyme- linked immunosorbent assay for detection of bovine immunoglobulin G₁ antibody to a protoplasmic antigen of Mycobacterium paratuberculosis. Am. J. Vet. Res. 44 (11):2205-2207 (1983)
- 135.- YOKOMIZO, Y. A method for avoid false-positive reactions in an Enzyme-linked-immunosorbent assay (Elisa) for the diagnosis of Bovine paratuberculosis. Jap. J. Vet. Sci. 47(1): 111-119 (1985)
- 136.- ZHABIN, V.I. Lesions of the nervous system in cattle with Johne's disease. Vet. Inst. 7:119-125 (1958)



[Handwritten signature]

REGLAMENTO DE TESIS

ARTICULO 11^o).- La Facultad no se hace solidaria de las opiniones vertidas en una tesis.