



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de

DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS
TITULO DEL TRABAJO

Análisis antigénico de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* y diagnóstico de
la paratuberculosis bovina mediante enzimo inmuno ensayo (ELISA)

AUTOR: Travería, Gabriel Eduardo

DIRECTOR: Bernardelli, Amelia

CODIRECTOR: Gimeno, Eduardo Juan

LUGAR DE TRABAJO: Centro de Diagnóstico e Investigación Veterinaria (CEDIVE)

JURADOS: Dr. Gómez, Carlos
Dr. Stanchi, Néstor
Dra. Moreira, Ana Rita

- 2003 -

AGRADECIMIENTOS : A la Dra Amelia Bernardelli por su asistencia en la ejecución de la tesis. Al Dr Eduardo Juan Gimeno por su paciente ayuda en la redacción de la tesis. Al Dr Jorge Romero y al personal del CEDIVE por el apoyo en la realización de la tesis. A María Fiorella Alvarado Pinedo, Guillermo Mattioli, Luis Emilio Fazzio, Mercedes Sixto y Laura Bartoletti por la toma y procesamiento de muestras. A María Fabiola Alvarado Pinedo por su ayuda en el procesamiento de imágenes. A María Pía Silvestrini por el análisis estadístico. A Leonardo Torres. Al Dr Dierk Rebeski por los consejos en la prueba de ELISA. Se agradece al Laboratorio de Inmunoparasitología por las facilidades para realizar los geles de poliacrilamida: Cecilia Venturini, Diana Bacigalupe, Alejandra Larsen, Se agradece al Laboratorio de Biotecnología del INTA de Castelar: Martín Zumarraga, Angel Cataldi, María Isabel Romano. Se agradece la colaboración del laboratorio de Ivo Pavlik, y su grupo: Petra Svastova, Milan Bartos de la Unidad de Micobacteriología, Instituto de Investigaciones Veterinarias de Brno, República Checa por el análisis de los polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP).

CITAS BIBLIOGRAFICAS CORRESPONDIENTES A LAS PUBLICACIONES PARCIALES DEL TRABAJO DE TESIS

TRAVERÍA, G.E.; ZUMARRAGA, M.; ROMANO, M.I.; CATALDI, A.; OTERO, M.M.; ROMERO, J.R.; COSTA, E.F. and BERNARDELLI, A. (2002) Paratuberculosis in sheep: a necropsy, histopathology, culture, PCR and RFLP. 7th International Colloquium on Paratuberculosis. Bilbao 11-14th June 2002. S5.P13(135) pp: 95.

TRAVERIA, G.E.; BALDO, A.; SILVESTRINI, M.P.; BERNARDELLI, A.; ROMERO, J.R.; CESAR, N. (1999) The effects of skin testing with avian tuberculin on antibody responses to paratuberculosis. The Paratuberculosis Newsletter 11: 28-33.

TRAVERÍA, G.E.; NORIMINE, G.; BERNARDELLI, A.; AND CESAR, N. (1997) Comparison of cellular and serological tests on cattle from a herd with paratuberculosis. The Paratuberculosis Newsletter 9:15-18.

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

A36: Complejo antigénico mayor del *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*.

ADN: Acido desoxiribonucleico.

Ahp C: Enzima alquil hidroperóxido reductasa C.

Ahp D: Enzima alquil hidroperóxido reductasa D.

AM: Arabinomanano.

Bp: "Base pair" pares de bases

CD₁₄: "Cluster of Differentiation 14", Grupo de diferenciación 14, (Receptor del complejo de lipopolisacárido y de la proteína de unión al lipopolisacárido se expresa en células mielomonocíticas).

CD_{1b}: "Cluster of Differentiation 1b", Grupo de diferenciación 1b. Se expresa en células de Langerhans y podría tener funciones especializadas en la presentación de lípidos.

CD₄: "Cluster of Differentiation 4", Grupo de diferenciación 4, (Se expresa en las células T ayudantes, correceptor de moléculas MHC clase II).

CD₈: "Cluster of Differentiation 8", Grupo de Diferenciación 8, (Se expresa en las células citotóxicas supresoras, correceptor de las moléculas MHC clase I).

Células M: Células microvilli ubicada en las placas de Peyer.

CMH: Complejo Mayor de Histocompatibilidad.

CSL: Commonwealth serum laboratory

ELISA: "Enzyme Linked Immunosorbent Assay", prueba inmunoabsorbente unida a enzima.

IFN- γ : Interferón gamma.

IL-1: Interleucina 1 (Activa células T, macrófagos y provoca fiebre).

IL-6: Interleucina 6, (Actúa en la diferenciación de las células T y B, producción de proteínas de fase aguda y fiebre).

IS900: "Insertion Sequences 900", (Secuencia de Inserción 900). Secuencia específica de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*.

kDa: Kilo Dalton.

LAM: Lipoarabinomanano.

MAC: Complejo *Micobacterium avium* subespecie *avium*, *Mycobacterium avium* subespecie *intracellulare*.

NK: "Natural Killer Cell", Célula natural asesina.

Nramp1: "Natural resistant associated with macrophage protein 1", Proteína de los macrófagos asociada a resistencia natural (Proteína de membrana integral expresada exclusivamente en el compartimento lisosomal de macrófagos, relacionada con el control de la multiplicación de micobacterias sacando el hierro de los fagosomas).

P43: Proteína expresada por la secuencia de inserción *IS900*.

PCR: "Polimerase Chain Reaction", Reacción en cadena de la colimerasa.

PPA: "Protoplasmatic antigen" Antígeno protoplasmático usado en el ELISA (ELISA-PPA).

PPD: "Protein pure derivative" Proteína pura derivada. Proteína usada para las pruebas intradérmicas.

RFLP: "Restriction Fragment Length Polimorfisms", Polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción. Prueba genética que permite diferenciar cepas de una misma especie.

ROC: "Receiver operative curve" Curva de características operador receptor. Prueba estadística que permite valorar la eficiencia de una prueba diagnóstica.

SCID: "Severe Combined Immuno Deficiency", Deficiencia inmunológica combinada severa.

Subsp: Subespecie.

TNF- α : "Tumor Necrosis Factor alfa", Factor de Necrosis Tumoral alfa.

UFC: Unidad formadora de colonia.

μ m: Micrómetro.

Tabla de contenidos

Resumen	1
Summary	2
Introducción	3
Epizootiología	6
Estructura Antigénica	7
Infección	10
Función del hierro en la infección por <i>Mycobacterium avium</i> subsp <i>paratuberculosis</i>	10
Vitamina D y calcio	11
Signos	12
Patología	13
Patogénesis	13
Desarrollo de la lesión e inmunidad	15
Inmunidad mediada por células	18
Inmunidad humoral	20
Diagnóstico	20
Control	27
Tratamiento	28
Vacunación	29
Objetivos	30
Objetivo General	30
Objetivos Particulares	30
Materiales y métodos	31
1. Comparar el ELISA-PPA con el kit comercial ELISA-CSL (Australia), prueba tuberculínica aviar y prueba de interferón gamma-CSL.	31
Protocolo de ELISA-PPA	31
Protocolo de ELISA-CSL	32
Tuberculinización	32
Interferón gamma	33
Protocolo de cultivo de materia fecal	33
2. Evaluar los efectos pos inoculación de la PPD-aviar en el ELISA-PPA en animales naturalmente infectados menores de 24 meses.	34
Protocolo de ELISA-PPA	35
Tuberculinización	35

3. Determinar la sensibilidad y la especificidad del ELISA-PPA tomando como prueba de oro el cultivo de materia fecal en un rodeo infectado de paratuberculosis.	35
Protocolo de cultivo de materia fecal	36
Protocolo de ELISA	36
4. Identificar los aislamientos con técnicas de genética molecular (PCR y RFLP).	36
Protocolo de PCR	37
Protocolo de RFLP	38
5. Obtener distintos antígenos de <i>Mycobacterium avium</i> subsp <i>paratuberculosis</i> y <i>Mycobacterium avium</i> subsp <i>avium</i>, identificarlos con corridas electroforéticas y evaluarlos en un rodeo infectado.	39
Obtención de antígenos a partir del medio líquido	39
Obtención de antígenos somáticos por ebullición	40
Protocolo de electroforesis. SDS-PAGE	40
6. Evaluar el comportamiento diagnóstico de los antígenos obtenidos de <i>Mycobacterium avium</i> subsp <i>paratuberculosis</i> y <i>Mycobacterium avium</i> subsp <i>avium</i> en el ELISA comparándolos con el ELISA-PPA.	40
Resultados	41
1. Comportamiento comparativo entre ELISA, tuberculinización e interferón γ	41
2. Inoculación Stormont y relación con ELISA.	43
3. ELISA y cultivo	46
4. Identificar cepas con pruebas de genética molecular	50
PCR	50
RFLP	51
5. Identificación de los distintos antígenos en corridas electroforéticas	52
6. Comportamiento de los antígenos utilizando el área bajo la curva	53
Discusión y conclusiones	56
Bibliografía	67

Resumen

Análisis antigénico de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* y diagnóstico de la paratuberculosis bovina mediante ensayo inmuno ensayo (ELISA)

Palabras claves: Paratuberculosis-diagnóstico-ELISA

La paratuberculosis bovina es una enteritis granulomatosa crónica, caracteriza por diarrea intermitente crónica, edema submandibular, pérdida progresiva de peso, emaciación y muerte. La categoría más susceptible a la infección son los terneros en sus primeras semanas de vida, la oral es la principal vía de infección. El período de incubación puede variar de 2 a 8 años, los enfermos subclínicos superan ampliamente los casos clínicos y representan un desafío diagnóstico. No se conocen tratamientos eficaces y las vacunas no están aprobadas. Para evaluar la eficacia de distintos métodos diagnósticos y de distintos antígenos se procesaron sueros provenientes de varios rodeos naturalmente infectados. Las prevalencias verdaderas se determinaron con cultivos y pruebas intradérmicas dependiendo en cada caso de la edad de los animales. En muestras cultivadas provenientes de 192 animales se obtuvo una prevalencia de 14%. Tomando estos valores como referencia, el ELISA con antígeno PPA según el análisis ROC presentó una sensibilidad del 35 % y una especificidad de 97%, los demás antígenos estudiados: proteína del medio líquido, PPD aviar y antígeno hervido no superaron esta sensibilidad y especificidad. La inoculación intradérmica de PPD, en animales de 15 meses incrementó los valores de ELISA pos PPD. La prueba intradérmica demuestra su eficacia en una categoría inaccesible al cultivo y a la serología. La prueba de Stormont incrementa los reactores tuberculínicos. La prueba de interferón gamma detecta animales que no detectan las pruebas serológicas. Para detectar la mayor cantidad posible de animales positivos se deben utilizar distintas pruebas diagnósticas combinándolas en forma estratégica de manera tal de cubrir todos los espectros inmunológicos que presenta la enfermedad. También es necesario continuar la investigación hacia la obtención de antígenos proteicos y lipídicos más purificados y combinarlos de acuerdo a las necesidades epidemiológicas.

Summary

Antigenic Analysis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and diagnosis of bovine paratuberculosis by means of enzyme immunoassay (ELISA)

Key words: Paratuberculosis-diagnosis-Elisa

Paratuberculosis is chronic granulomatous enteritis that affects ruminants. Clinical signs in bovine are characterised by progressive symptoms associated with chronic intermittent diarrhoea, submandibular oedema, progressive loss of weight, emaciation and animal death. Susceptibility to infection is highest in animals under 30 days old, but clinical disease does not usually develop in cattle until 2-5 years of age. The main mode of transmission within herds is through ingestion of faecal contaminated milk. Subclinical overcomes the clinical cases thoroughly and they represent a diagnostic challenge. Effective treatments are not known; the vaccines are not approved because they sensitise the animals to the immunological based diagnostic tests. Available reports had shown that the serological prevalence is on the increase in Argentina. The efficiency of various methods and with different antigens was evaluated in sera of animals from naturally infected herds. True prevalences were determined by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolation and by intracutaneous tests depending in each case of animals age. A prevalence of 14% was obtained by cultivated of faecal samples coming from 192 animals. Taking these values like reference, the ELISA with the PPA antigen, according to the analysis ROC, presented a sensibility of 38% and a specificity of 97%. The other studied antigens: protein of liquid medium, avian PPD and boiled antigen didn't improved this sensibility and specificity. The intracutaneous inoculation of PPD, in animals 15 months old, increased the values of ELISA post PPD; this was considered a "anamnesic serological response" The intracutaneous test demonstrates its effectiveness in a category of animals inaccessible to cultivation and serology. Stormont test increases the tuberculinic reactors. The gamma interferon test detects animals not detected by the serological tests. Different diagnostic methods should be used in combination in order to detect as much positive animals as possible. Is necessary to continue the studies toward the obtaining more purified protein and lipids antigens. They should latter be combined according to the epidemic requirements.

Introducción

La paratuberculosis también llamada “enfermedad de Johne” descubierta por Johne y Frothingham en 1895, es una enfermedad crónica y debilitante de los rumiantes caracterizada por una ileocolitis granulomatosa crónica con linfangitis y linfadenitis regional con pérdida progresiva de peso (18). En los bovinos se caracteriza por baja producción láctea, mala condición corporal y diarrea intermitente. No se puede tratar con antibióticos y una vez que se presenta la diarrea en forma continua los animales mueren emaciados en lapsos de semanas. La ausencia de signos generales de enfermedad la distinguen de otros desórdenes intestinales, los animales infectados conservan el buen apetito se encuentran alertas y no presentan fiebre (22). El agente causal es un bacilo ácido alcohol resistente que es débilmente Gram positivo. Es de forma bacilar, tiene un tamaño de 0,5 a 1,5 μm , en las muestras clínicas aparece en forma agrupada (ovillos) (18). Para su cultivo es de crecimiento sumamente lento, si comparamos el tiempo que requiere para multiplicarse con otras bacterias, por ejemplo la *Escherichia coli*, los estafilococos, los estreptococos o las salmonelas requieren de aproximadamente 20-30 minutos para su multiplicación *in vitro*, el bacilo de la tuberculosis requiere de 24 h y el de paratuberculosis requiere de aproximadamente 2 días (88). Dentro de las micobacterias es sólo superado por el bacilo de la lepra el cual requiere de 2 semanas para multiplicarse *in vivo*. Crece en medios de cultivo con huevo como Löwenstein-Jensen, Herrold y medios sintéticos, la bacteria requiere de un factor de crecimiento llamado micobactina, un sideróforo quelante del hierro (18, 85, 119). El tiempo necesario para la formación de colonias visibles es de 6-8 semanas, algunas cepas requieren de 6 meses. Bioquímicamente es relativamente inactiva y la identificación se basa en el crecimiento lento, 120-150 días, presentación en acumulos positivos a la coloración de Ziehl Neelsen, la dependencia por la micobactina y la detección de la secuencia de inserción IS900 mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) (37,125). Esta micobacteria es relativamente homogénea pero se observan algunas diferencias. Notablemente algunas cepas ovinas son pigmentadas y difieren bastante en las propiedades culturales tanto como para determinar un tipo ovino (51, 157). Estas cepas también pueden afectar a los bovinos aunque algunas cepas parecen tener preferencias por determinados hospedadores, no existe evidencia de la existencia de un

hospedador específico en forma estricta (24). Puede sobrevivir más de un año en heces, agua de canales, pasturas y silos. Los rodeos se infectan al ingresar animales enfermos y usualmente pasan años hasta que los dueños se enteran de la presencia de la enfermedad. Los vacunos se infectan de terneros por contacto con heces infecciosas en el parto, ingiriendo calostro, leche de un animal infectado o por ingestión de alimentos contaminados con materia fecal proveniente de animales enfermos (23). El período entre la infección y la aparición de los primeros síntomas está entre 2 a 12 años dependiendo del grado de resistencia individual, dosis infectiva y de la edad al tiempo de exposición (155). El diagnóstico presenta muchas dificultades por su período de incubación largo. El cultivo de materia fecal se considera como la prueba diagnóstica de oro, es la más sensible y sólo detectará el 50% de los animales que están enfermos (18). La prueba de ELISA detecta solo un tercio de los animales que son detectados por el cultivo de materia fecal (27). Aquellos animales que no están eliminando el suficiente número de bacterias como para ser detectados por cultivo o que no han desarrollado una respuesta humoral no pueden ser detectados por estos métodos. La única forma de detectar estos animales en las primeras etapas de la enfermedad es mediante el uso de la prueba tuberculínica con altos porcentajes de falsos positivos y no puede ser usado como prueba para controlar la ausencia de la enfermedad (18). La información relevante más importante de la interacción hospedador-patógeno en los ensayos de infección se obtiene usando el hospedador natural. Un bovino infectado necesita ser mantenido durante 2-3 años antes de desarrollar la enfermedad clínica, por lo tanto su uso queda limitado a aquellas instituciones que cuenten con los recursos necesarios como para cumplir con estas condiciones (44). Los modelos animales alternativos a los bovinos, salvo algunos ratones, no reproducen en forma consistente los síntomas clínicos de la enfermedad. Por ejemplo en la inoculación oral de conejos con 10^8 UFC de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* culminaba con lesiones histopatológicas y clínicas solo en el 62-75% de los animales inoculados en contraste con el 100% de los terneros inoculados vía oral con 10^6 UFC (44). La inhabilidad de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* para causar enfermedad en otros animales se puede deber a su escasa virulencia o a diferencias genéticas. Entre los ratones susceptibles de ser infectados se encuentran las cepas C57/B6 y BALB/c, estos animales presentan en su cromosoma la forma susceptible alelica del gen Bcg^s (44). Este gen ha sido identificado como

la proteína Nramp1 que integra las membranas lisosomales de los monocitos y macrófagos y está relacionada con el transporte del hierro (44). También son susceptibles los ratones desnudos y atímicos SCID beige (ratones con inmunodeficiencia severa combinada) (95), estos ratones tienen mutaciones que los hace deficientes en linfocitos T y B funcionales y también se encuentra disminuida la función de las células T naturales asesinas (NK). Estas deficiencias nos permiten estudiar la inmunidad innata en ausencia de la inmunidad adquirida. El manejo de estos animales se debe realizar en cabinas de seguridad biológica, preparados para tal fin.

La paratuberculosis tiene su correlato en los humanos con la enfermedad de Crohn (18), una enfermedad muy similar en donde las evidencias sobre su etiología señalan al *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* como el agente causal (71, 18). Esta situación se agrava por la mayor resistencia del *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* a la pasteurización (97). En Argentina, la paratuberculosis ocupa los primeros lugares como causa de muerte infecciosa en los bovinos adultos, el manejo de la enfermedad se encuentra limitado por la complejidad del diagnóstico, la imposibilidad del tratamiento y las dificultades que presenta la vacunación. Las estrategias eficientes de control tienen como pilares la detección y eliminación de los animales enfermos y sus fuentes de contagio (44).

Epizootiología

La paratuberculosis es una enfermedad de distribución mundial, la prevalencia se encuentra en aumento en algunos países. La prevalencia utilizando distintos métodos como: cultivo bacteriano, demostración del DNA en muestras de materia fecal o tejidos, exámenes macroscópicos y microscópicos de tejidos lesionados y serología demuestran una prevalencia de 15% en Inglaterra, 18% en Estados Unidos (18) y 5% en Canadá (23). Los porcentajes de mortalidad pueden variar desde 1% hasta 10%. También se producen pérdidas económicas como consecuencia de mortalidad de los animales con signología clínica y pérdidas subclínicas entre las que se pueden mencionar las pérdidas en la ganancia de peso, en la producción láctea y problemas en la fertilidad (28). En la Argentina, los primeros datos de la enfermedad se dieron a conocer por Rosenbusch (110). Los últimos datos de la prevalencia serológica por ELISA, fueron publicados por Moreira y Paolicchi (21, 92, 102). Los datos informan una prevalencia en la provincia de Buenos Aires de 26,5% en los rodeos de carne y 56% en los rodeos lecheros, La Pampa 2,4%, Catamarca 1%, La Rioja 0,2%, Neuquén 0% y Río Negro 7%. Es probable que en estas prevalencias se encuentren implicadas la paratuberculosis y la tuberculosis ya que la mayoría de los ELISA no discriminan entre estas dos enfermedades (72, 99).

La mayor susceptibilidad a la infección se da en los animales menores de 30 días (128), pero los casos clínicos en los bovinos no se desarrollan antes de los 2-12 años de vida. Cuando las prevalencias son muy altas se puede presentar algunos signos clínicos en animales menores de 2 años, incluso animales de 1 año de vida (23). Los estudios de experimentación demuestran que la infección se favorece en animales jóvenes con altas dosis de bacterias. Otros factores de riesgo son los sistemas de explotación intensivos, los suelos ácidos, las dietas pobres, el estrés relacionado al transporte, la lactancia, el parto y la inmunosupresión por agentes como la diarrea viral bovina (23). Un factor importante es el contacto estrecho de los animales susceptibles con materia fecal contaminada (129), este factor podría ser el responsable de la mayor prevalencia observada en los animales de explotación lechera con respecto a los animales de explotación para consumo de carne. También se ha comprobado la transmisión a

través del útero y eliminación bacteriana por leche y calostro (132, 133). No se han encontrado evidencias que determinen si hay susceptibilidad por razas.

La paratuberculosis es una enfermedad de los rumiantes y se puede transmitir entre especies. Se ha reproducido la enfermedad con cepas aisladas de bovinos y ciervos en lanares, cepas ovinas en vacunos, cepas aisladas de casos humanos en cabras. Sus implicancias en el desarrollo natural de la enfermedad no se encuentran claras (23). Es importante, para el control de la enfermedad, conocer la importancia que puede tener la bacteria en animales de vida silvestre (44), como los conejos, los cuales pueden afectarse en forma natural.

Estructura Antigénica

Una de las mayores áreas de investigación en paratuberculosis esta dirigida a la identificación de componentes inmunogénicos de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* (5, 12,99). El objetivo de estos estudios es identificar antígenos que puedan ser usados como pruebas diagnósticas basados en la detección de la respuesta inmune humoral y celular. El antígeno diagnóstico ideal debería encontrarse sólo en *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* e inducir una respuesta inmune importante. Estas son de difícil cumplimiento ya que comparte muchos antígenos con otras micobacterias (30, 43) y en donde el DNA del *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* tiene una homología del 99% con *Mycobacterium avium* subsp *avium* (44). Existen muchos antígenos descritos, pero solo algunos pocos se caracterizaron con certeza. Los antígenos que presentan mayor importancia antigénica son los siguientes:

Glicolípidos: La superficie externa de las micobacterias consiste predominantemente de lípidos y carbohidratos los cuales podrían estar vinculados con la sobrevivencia de la micobacteria en el interior de los macrófagos (20). Una característica única de las micobacterias es la estructura y composición de la envoltura celular: compuesta por lípidos tales como fosfolípidos, glicolípidos, peptidolípidos y micósidos (47, 168). Una molécula prominente de mucha importancia es el lipoarabinomano (LAM), pertenece a la pared celular, y es un lipopolisacárido reconocido como una forma multiglicosilada manosil fosfatidil inositol (140). Se asume que esta molécula tiene un anclaje con la membrana celular y se extiende hacia fuera

a través de la capa de peptidoglicano de forma similar al ácido teicoico en las bacterias Gram positivas. Las propiedades del LAM son comparables a los lipopolisacáridos de las bacterias Gram negativas. El LAM ha sido usado en forma exitosa como antígeno diagnóstico en ELISA, indicando su fuerte inmunoreactividad (107). Tanto el lipoarabinomano (LAM) como el arabinomano sin lípidos (AM) se encontraron en *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* con grandes propiedades inmunogénicas ambos son componentes antigénicos importantes de la pared de las micobacterias (127). Estos antígenos reaccionan muy fuerte con sueros de animales paratuberculosos. El LAM es uno de los primeros antígenos detectados en los cultivos filtrados. Presenta el inconveniente de reaccionar en forma cruzada con otras micobacterias lo cual puede limitar su utilización (99).

Proteínas: El complejo antigénico mayor en *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* se llama A36 (34). Contiene aproximadamente 30 proteínas con peso molecular que varían desde 20 a 90 kDa, los componentes más antigénicos de la inmunidad celular y humoral se encuentran en el rango de 28-45 kDa. La proteína de 34 kDa constituida por tres polipéptidos contiene el péptido A36 (34) el cual parece ser específica de especie para *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* (99). Está demostrado que los animales infectados desarrollan anticuerpos contra ese péptido (108), queda por evaluar su uso potencial para el diagnóstico.

Otras proteínas publicadas son las proteínas de peso molecular de 17 y 400 kDa que se encuentran comprometidas en la adquisición del hierro. La proteína de peso molecular de 400 kDa induce respuesta a anticuerpos en lanares infectados, también se ha encontrado la misma proteína en *Mycobacterium leprae* y *Mycobacterium avium* subsp *silvaticum*, mientras que la especificidad e inmunogenicidad de la proteína de 17 kDa no se conoce (99). Estos antígenos son constitutivos del soma bacteriano, pero durante la fase de crecimiento bacteriano hay antígenos que se secretan en el medio en donde se encuentran, estos antígenos pueden participar en el desarrollo de una respuesta inmune protectora (94, 100). Está demostrado que tales antígenos pueden ser usados para el diagnóstico precoz de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* se han encontrado algunos antígenos secretados pero ninguno demostró ser específico de especie (99). El complejo antigénico 85 consiste en 4 proteínas que son los mayores componentes secretados por *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*, estas proteínas son capaces de inducir respuestas inmunes celulares importantes y como tales son

buenas candidatas para ser incluidas en vacunas. Olsen (99) menciona la proteína secretada de 14 kDa y la utiliza como antígeno en la prueba de ELISA, esta proteína es capaz de discriminar entre los sueros de animales tuberculosos y paratuberculosos (99). Esta proteína de función desconocida se encontró en *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*, el complejo *Mycobacterium avium* subsp *avium* – *Mycobacterium avium* subsp *intracellulare* (MAC) y *Mycobacterium scrofulaceum*.

El mismo autor también describe a las enzimas alquil hidroperóxido reductasa C y D (AhpC y AhpD) cuya función es la de proteger a la bacteria de los metabolitos oxidativos y del óxido nítrico. En *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* se expresan en forma importante incluso en ausencia del estrés oxidativo, estas proteínas inducen la formación de IFN γ en cabras infectadas en forma experimental y también pueden discriminar los sueros de animales tuberculosos y paratuberculosos (99). La secuencia de inserción IS900 es única de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* y expresa la proteína p43 (137). Las proteínas de estrés se presentan cuando una micobacteria ingresa en una célula fagocítica, es probable que sea sujeta a deprivación de nutrientes y a limitaciones en cuanto al hierro además de ser expuesta a enzimas degradativas y metabolitos tóxicos del oxígeno (20). Esto seguramente produce cambios en el metabolismo y en la síntesis de las proteínas. Las proteínas del choque térmico o proteínas del estrés son altamente conservadas y se pueden encontrar en procariontes y eucariontes (99). Las síntesis bacterianas de estas proteínas se incrementan cuando las bacterias se exponen a altas temperaturas o cualquier otro factor estresante. Las proteínas del choque térmico pueden inducir una marcada reacción inmune de tipo celular en humanos y animales (57, 58). El hecho de ser altamente conservadas no las hace apropiadas para su uso como antígenos diagnósticos (99). Las proteínas del estrés secretadas, o liberadas de las células que se están lisando, podrían actuar como antígenos. En micobacterias las proteínas de estrés más conocidas son las proteínas con pesos moleculares de: 71Kd 70Kd 65 Kd (67). Al estudiar las propiedades inmunológicas de las proteínas, se debe tener en cuenta, que los anticuerpos se pueden unir a la superficie de moléculas proteicas plegadas y los sitios de reconocimiento se pueden encontrar en los aminoácidos adyacentes a la estructura tridimensional de la proteína (epitopes conformacionales), pero no necesariamente necesitan estar directamente unidos en la estructura de la secuencia primaria. En contraste, el

reconocimiento por las células T se unen a antígenos procesados o parcialmente degradados unidos al complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). La unidad antigénica para el reconocimiento de las células T son péptidos cortos unidos a CMH (pueden reconocer proteínas en condiciones reducidas).

Infección

La mayor fuente de infección es la materia fecal proveniente de los animales infectados. El período de incubación largo permite la eliminación por materia fecal aproximadamente unos 18 meses antes de la aparición de cualquier signo clínico (23). Pero la eliminación es particularmente elevada en los animales con enfermedad clínica (5×10^{12} micobacterias por día) (18). La contaminación de las ubres con materia fecal y la presencia de la micobacteria en la leche y en el calostro ocasiona que los animales que se encuentran mamando ingieran grandes dosis del microorganismo; también pueden ser responsables el agua y las pasturas contaminadas. La micobacteria también se ha recuperado del útero y de placentas de vacas infectadas y la contaminación intrauterina del feto también puede ocurrir (23, 129). La ingestión de la micobacteria es la principal vía de infección. Las infecciones experimentales se han logrado con cargas de 10^8 , a 5×10^{10} organismos, con producción de lesiones típicas de paratuberculosis en forma experimental. En algunos estudios dosis de 10^3 microorganismos en forma oral han logrado producir lesiones en corderos (23)

Función del hierro en la infección por *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*

Los hospedadores mamíferos restringen en forma activa el hierro a los patógenos bacterianos. Las citoquinas podrían funcionar limitando la concentración intracelular del hierro en los macrófagos intentando de esta forma restringir el crecimiento bacteriano. Los macrófagos activados dejan de expresar los receptores para transferrina. Algunos autores sugieren que el hierro que se encuentra en formas de complejos con moléculas del hospedador como ser ferritina, lactoferrina, transferrina e incluso hemosiderina es utilizado por la micobacteria

intracelular (23). En la mayoría de las bacterias patógenas, incluidas las micobacterias, la virulencia se asocia con la capacidad de estos gérmenes para adquirir hierro en condiciones limitantes. Una de las formas propuestas de controlar la multiplicación de micobacterias (56), es removiendo el hierro o cationes bivalentes de los espacios lisosomales a través de la proteína macrofágica asociada a la resistencia natural (Nramp1), la cual se expresa exclusivamente en los compartimentos lisosomales de los monocitos y de los macrófagos, disminuyendo de esta forma el hierro disponible para las bacterias intracelulares (44). Para tomar el hierro limitante la mayoría de las micobacterias producen micobactina: un sideróforo liposoluble, y un sideróforo hidrosoluble: la exoquelina. Sin embargo la micobactina no es sintetizada en el hospedador por lo tanto otra clase de proteína quelante del hierro exoquelina ha ganado interés recientemente. No está del todo claro como puede sobrevivir en forma intracelular *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* bacteria auxotrofa (bacteria que para su desarrollo en un medio requiere de una sustancia específica) de micobactina (produce solo exoquelina) siendo que se necesitan los dos sideróforos para la patogenicidad de las micobacterias (44).

La ferritina, la mayor forma de depósito intracelular de hierro, se ha encontrado acumulada coincidentemente con *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* intracelular y las lesiones de los animales infectados. También se ha encontrado una producción significativa de reductasa en el fleón de animales enfermos.

Vitamina D y calcio

La vitamina D es capaz de modular el sistema inmune en particular de inmunosuprimirlo, esto se demostró por la exacerbación de la paratuberculosis en ratones experimentalmente infectados cuando se les administra vitamina D (38). La administración se asocia con elevadas concentraciones en los tejidos de IL1, IL6 y TNF- α (23). Las dietas con escaso calcio tienen efectos similares en la producción de estas citoquinas pero en realidad reducen las lesiones y la carga bacteriana. La interacción entre el sistema inmune, el calcio y la vitamina D es compleja (44).

Signos

Los signos clínicos característicos de la paratuberculosis incluyen pérdida progresiva de peso con diarrea, la cual puede ser intermitente o también presentarse en forma crónica (18). La enfermedad clínica se puede precipitar por factores estresantes como el parto, o la lactancia. También se puede observar baja en la producción láctea. Los animales mantienen buen apetito y no se observan signos de toxemia o pirexia. La pérdida de peso es consecuencia de la malabsorción y pérdida de proteínas causado por el llamativo infiltrado celular y el edema de la mucosa intestinal (23). La síntesis de proteína por parte del hígado trata de compensar la pérdida, pero cuando estos mecanismos son sobrepasados sobreviene el desarrollo de los signos clínicos. Una causa que se asocia con la pérdida de peso es la elevada concentración del factor de necrosis tumoral (TNF- α , catequina), el cual promueve el catabolismo en los tejidos (23). El curso clínico toma generalmente 3-6 meses finalizando con la muerte del animal (18). Los animales afectados pueden ser categorizados en 4 grupos de acuerdo a los signos clínicos, la diseminación de la bacteria por la materia fecal y la respuesta inmunológica (156).

-En el primer estadio (infección silente) no se encuentran los signos clínicos ni la diseminación bacteriana ni anticuerpos circulantes detectables.

-En el segundo estadio (infección subclínica) el animal podría diseminar escasas bacterias difíciles de detectar, no presenta signos clínicos e inmunológicamente podría ser anormal (detección de inmunidad mediada por células).

-En el tercer estadio (enfermedad clínica) los animales pierden peso en forma gradual y tienen diarrea acuosa al principio intermitente. En este estadio usualmente se detectan las bacterias y los anticuerpos. La mayoría de los animales si no se eliminan del rodeo pasan al siguiente estadio.

-En el cuarto estadio (enfermedad clínica avanzada) se caracteriza por diarrea acuosa, emaciación y edema submandibular. Eliminan abundantes cantidades de bacterias y generalmente tienen elevada cantidad de anticuerpos y escasa o nula respuesta celular (156).

Patología

Los hallazgos macroscópicos más importantes son enteritis crónica, linfangitis intestinal crónica con adenopatía de los nódulos linfáticos mesentéricos. Las lesiones más prominentes se encuentran en la parte distal del íleon hasta la válvula ileocecal. La mucosa intestinal generalmente se encuentra engrosada y corrugada con los vasos linfáticos de la serosa prominentes y dilatados (23).

Las lesiones microscópicas pueden ser leves, con escasas células gigantes tipo Langhans diseminadas en la lámina propia o en las áreas paracorticales de los ganglios linfáticos y células epiteloides con citoplasma intensamente eosinofílico. Las lesiones moderadas consisten en pequeños grupos de macrófagos y células gigantes en la lamina propia y la submucosa intestinal, estas células también se pueden encontrar en los ganglios linfáticos en los senos subcapsulares y en el área paracortical. Las lesiones severas consisten en muchos macrófagos y células gigantes diseminados por la lamina propia de la submucosa, la túnica muscular y la serosa. Las criptas glandulares distendidas con neutrófilos polimorfonucleares y material mucoso. En las lesiones leves casi no se encuentran bacilos ácido alcohol resistentes a la coloración de Ziehl Neelsen, pero en la medida en que las lesiones se agravan las bacterias intracelulares se incrementan. No se observa necrosis como las que se pueden dar en otras especies (13)

Patogénesis

Después de la infección oral con *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*, la bacteria infecta los macrófagos intestinales. Una característica importante de la paratuberculosis es la persistencia de la micobacteria dentro de las células con escaso desarrollo de lesiones. Como estos eventos son similares en otras micobacteriosis como la lepra y la tuberculosis muchos de los conceptos derivados de estas enfermedades también se aplican en paratuberculosis.

Ingreso a las células: Después de ser ingerida la micobacteria es endocitada por las células M ubicadas en el tejido linfático asociado a las mucosas con preponderancia de las placas de Peyer ubicadas en el íleon. Tanto las bacterias intactas como las degradadas son transportadas en el interior de las vacuolas a través de las células M a los macrófagos que se encuentran en las áreas subepiteliales e intraepiteliales de las placas de Peyer (89, 156).

El macrófago intestinal es la célula blanco de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*, el ingreso puede estar facilitado por receptores opsonizantes a través del complemento o no opsonizantes como CD₁₄ receptor del complejo de lipopolisacárido y de la proteína de unión al lipopolisacrido, MHC, fibronectina, una glicopretína de gran tamaño encontrada comúnmente en el plasma y en la matriz extracelular con muchas propiedades biológicas (2, 42, 105, 141), vitronectina y receptores fucosil/manosil, fibrina, gelatina y colágeno favoreciendo la adhesión e ingreso de la micobacteria (141).

Interacción del macrófago con la micobacteria: Después de ser ingerido por el macrófago, la micobacteria se enfrenta a los mecanismos degradativos (73). Estos mecanismos incluyen la formación de fagosomas, fusión del fagosoma con el lisosoma, los efectos del estallido respiratorio, formación de radicales de oxígeno y óxido nítrico con actividad antimicrobiana, defensas no oxidativas como proteínas catiónicas, lisosima y otras enzimas lisosomales (23). Los estudios con microscopía electrónica lo ubican dentro del fagosoma, en las primeras 2-8 horas se encuentran escasas micobacterias en el interior de los fagosoma algunas de las cuales parecen degradadas y, a medida que avanza el tiempo: 24 h., se incrementa el número bacteriano hasta encontrar numerosas bacterias dentro de los fagosomas.

Para que se produzca la enfermedad, la bacteria debe sobrevivir a estos mecanismos de muerte intracelular y multiplicarse. Los mecanismos de la micobacteria para sortear el arsenal enzimático del macrófago incluyen: evitar la unión del fagosoma con el lisosoma mediante la producción de sulfátidos, escape del fagosoma dentro del citoplasma, evitar la producción de óxido nítrico a través de los glicolípidos, inhibir el estallido respiratorio con la subperóxidodismutasa y los glicolípidos. El lipoarabinomanano de la pared celular induce resistencia a la activación macrofágica (20, 23).

Desarrollo de la lesión e inmunidad

La genética, la micobacteria y los factores ambientales inevitablemente tienen influencia en el curso de la infección, pero la respuesta inmune del hospedador parece tener un rol prominente en la patogénesis de la paratuberculosis. La evidencia acumulada sugiere que las primeras lesiones se desarrollan en el tejido linfático de las placas de Peyer. Luego la lesión se disemina desde este lugar a la porción terminal del íleon. Las lesiones primitivas en el área interfolicular de las placas de Peyer son potencialmente significantes por el rol de esta región en el desarrollo del sistema inmune. En los rumiantes las placas de Peyer son responsables de la linfopoyesis de los linfocitos, y a diferencia de las placas del jejunio, las del íleon contienen muchos folículos ricos en linfocitos B, con poco espacio para las áreas interfoliculares que son ricas en linfocitos T. Las placas de Peyer del íleon contienen 1-2% de células T cuando se las compara con las placas del jejunio las que contienen un 30-50% de células T. Esta escasez potencial de células T capaces de modular el sistema inmune, sugiere que las placas de Peyer, las cuales adquieren su máximo desarrollo en el rumiante joven, son un medio ambiente relativamente favorable para las micobacterias de vida intracelular (23).

También existe una tolerancia inmune local a los microorganismos; esta tolerancia puede ser responsable del establecimiento de infecciones en las placas de Peyer. Esta tolerancia se ve reflejada en la colonización de micobacterias saprófitas que suelen poblar la porción terminal del íleon en los rumiantes.

Es posible que la resistencia a la infección que se va adquiriendo con la edad tenga que ver con la involución concomitante de las placas del íleon, desapareciendo el ambiente favorable para la persistencia de las micobacterias.

A pesar de las deficiencias del hospedador, la mayoría de los animales que naturalmente se exponen a la infección no desarrollan la enfermedad; posiblemente estos animales eliminan la infección mediante una respuesta intracelular adecuada y sean resistentes a la infección, después de desarrollar escasas lesiones.

Los factores que tienen influencia en estos resultados probablemente son: la dosis y vía de infección, la virulencia de la cepa, el estatus inmunológico local y sistémico, los genes de resistencia del hospedador que regulan la presentación antigénica y la respuesta intracelular,

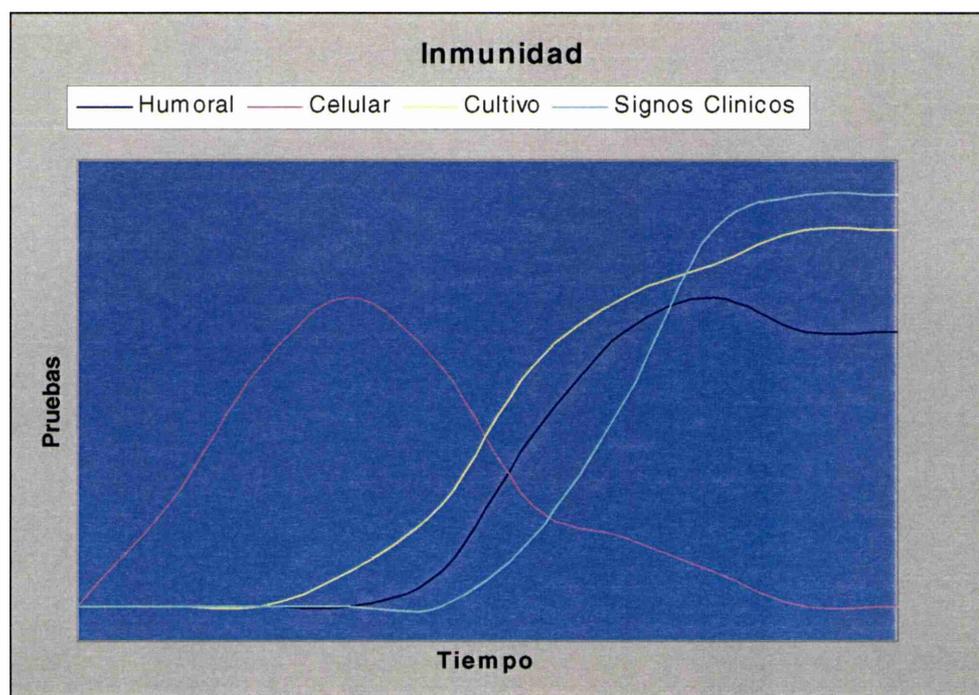
también los factores del medio ambiente (56). La persistencia de escasos números de bacterias intracelulares, se podría reflejar en un equilibrio entre las defensas del hospedador y la resistencia de la bacteria originando casos subclínicos. La progresión de los casos subclínicos a través de los meses o años de incubación a formas clínicas multibacilares de paratuberculosis, se puede deber al debilitamiento o la supresión de la inmunidad mediada por células, esta causa sería la responsable de la proliferación micobacteriana y su eliminación por la materia fecal.

Es probable que la producción local de citoquinas del tipo Th₂ como las IL4, IL10, las prostaglandinas, el factor de transformación del crecimiento β y los cambios endocrinos tengan influencia en el debilitamiento de la inmunidad mediada por células. Los tejidos intestinales están en contacto en forma simultánea con las proteínas de la dieta y con bacterias patógenas y el perfil de las citocinas debe tener un balance sumamente delicado entre la inmunidad activa y la tolerancia. Las influencias inhibitorias o anérgicas podrían inclinar el equilibrio a favor de los microorganismos incrementando la carga de micobacterias y precipitar a una cascada cíclica de inmunosupresión y proliferación de micobacterias (23).

Este fallo inmunitario promueve la formación de lesiones lepromatosas multibacilares típicas. La formación de lesiones tuberculoides paucibacilares (lesiones con escasas micobacterias) requiere de otra explicación. Las lesiones granulomatosas conteniendo escasas micobacterias que se observan en la tuberculosis y la lepra, se los relaciona con procesos inmunopatológicos dirigidos por una respuesta inmune celular fuerte. En paratuberculosis se reconocen los mismos procesos cuando las lesiones son paucibacilares. La patogénesis de estos casos no se conoce bien, pero podría explicarse por la persistencia de una actividad pro inflamatoria de la inmunidad mediada por células, causando una inflamación crónica, provocada por la presencia de un pequeño número de micobacterias que sobreviven intracelularmente a la defensa del hospedador. También se sospecha de la presencia de micobacterias con pared deficiente, estos esferoplastos carecen de los lípidos de la pared celular potencialmente inmunosupresores. También pueden contribuir con las lesiones la reactividad cruzada de las defensas con epitopes antigénicos compartidos entre las micobacterias y el hospedador. El espectro de lesiones de la paratuberculosis que se reconocen dentro y entre especies, se puede presentar como consecuencia de los distintos grados de respuesta de la inmunidad mediada por células

inducida por distintas cepas o por distintas subespecies de micobacterias. De esta forma cuando la respuesta de la inmunidad mediada por células es fuerte con altas concentraciones de IFN- γ y de TNF- α se pueden relacionar a las lesiones tipo tuberculosas encapsuladas con necrosis caseosa; cuando la respuesta es relativamente menor se puede favorecer la formación de granulomas sin cápsula ni necrosis. Una lesión tipo tuberculosa podría originarse a partir de un caso subclínico o a partir de una lesión lepromatosa bajo la influencia de factores reguladores como por ejemplo IFN- γ . En forma inversa una lesión tipo tuberculosa puede cambiar a una forma lepromatosa cuando la respuesta se encuentra dominada por una respuesta de linfocitos tipo T_H2. Las células presentadoras de antígeno liberan la citoquina IL-12, esta citoquina es un potente estimulante de la respuesta T_H1 con producción de IFN- γ , el cual también disminuye la respuesta de los linfocitos T_H2. La producción de IL-12 por monocitos infectados con micobacterias favorecen las respuestas de los linfocitos T_H1 en los primeros estadios de la patogénesis de paratuberculosis y en las lesiones tipo tuberculoide. Los cambios endocrinos no específicos y el estrés tienen efectos en el cambio de las respuestas T_H1- T_H2 (Fig 1).

Figura 1: Progresión de la inmunidad celular, humoral, signos y cultivo. Adaptado de Chiodini (18)



Inmunidad mediada por células

Cuando un microorganismo ingresa a un organismo, este responde con sistemas inmunes innatos (inespecíficos) o adaptativos (específicos). Por un lado, se encuentran los factores solubles como la lisosima y el complemento que junto con las células fagocíticas forman el sistema inmune innato (no específico), por el otro se encuentran los linfocitos B productores de anticuerpos (inmunidad humoral) y los linfocitos T (inmunidad celular) formando el sistema inmune adaptativo (específico) (1, 88). Las células T son las encargadas de activar los macrófagos y así eliminar los patógenos intracelulares. La expansión clonal de células T específicas depende del reconocimiento del antígeno presentado por los macrófagos u otras células presentadoras de antígeno a través de los receptores apropiados. Las células presentadoras de antígeno presentan en su superficie moléculas como las del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I y II relacionadas mayoritariamente a la presentación de proteínas. Las moléculas de superficie CD_{1b} presentan los antígenos lipídicos. Las células T presentan distintos receptores, estos receptores se conocen como receptores de células T (T Cell Receptor, TCR) así tenemos receptores de células T tipo $\gamma\delta$ y otros $\alpha\beta$ (TCR $\gamma\delta$, TCR $\alpha\beta$) (20). En las infecciones micobacterianas son importantes las células T $\alpha\beta$, con sus subpoblaciones que expresan los marcadores de grupo (cluster of differentiation, CD) CD₄ (ayudantes) y CD₈ (supresora, contrasupresora) y también las células T $\gamma\delta$. En particular las células T CD₄ también conocidas como células ayudantes (Helper) a su vez presentan subpoblaciones de células ayudantes tipo 1 (T_{H1}), y ayudantes tipo 2 (T_{H2}). Esta diferenciación de ayudantes se realiza por el perfil de citocinas (también conocidas como interleucinas, IL) que mayoritariamente libera cada una de ellas. Así tenemos que los T_{H1} secretan IFN- γ , IL-2 y IL-12, estas células están comprometidas en la activación macrofágica y en la hipersensibilidad de tipo retardada (HTR). Las células ayudantes tipo 2 liberan IL-4, IL-5, IL-10, y asisten al desarrollo de células B y la producción de anticuerpos (20). Estas dos subpoblaciones de linfocitos T tienen funciones antagónicas: cuando una de ellas se

selecciona, actúa inhibiendo el desarrollo de la otra. Las IL-4 y IL-5 suprimen las respuestas T_H1 , el IFN- γ actúa contra la respuesta de T_H2 .

La respuesta a T_H1 se asocia con producción de IFN- γ , reacción de hipersensibilidad tipo retardada y reducido número de micobacterias; una respuesta T_H2 se asocia con baja producción de IFN- γ , elevadas concentraciones de anticuerpo y altas cargas bacterianas. A medida que la paratuberculosis progresa, la inmunidad mediada por células que al principio es fuerte, va declinando y los anticuerpos se elevan. Al principio de la enfermedad la inmunidad mediada por células se puede detectar por pruebas como la proliferación de linfocitos y la reacción de tuberculina. Las reacciones de hipersensibilidad en la piel que al principio son positivas, se van negativizando en los animales con enfermedad avanzada (Fig 1). Con microscopía electrónica se puede observar una relación de bacterias dañadas y en escaso número en los animales que reaccionan en forma positiva a la prueba intradérmica, e inversamente, los animales que tienen escasa reacción a las pruebas tuberculínicas tienen muchas micobacterias intracelulares, demostrando la falla en los mecanismos de muerte intracelular (20).

Los linfocitos T CD_8 se activan cuando los antígenos se presentan junto con el complejo mayor de histocompatibilidad tipo I, tienden a acumularse en la periferia de las lesiones granulomatosas en donde ejercerían una función inmunodepresora. Las subpoblaciones de linfocitos $T\gamma\delta$ se acumulan al principio de la infección, para limitar el daño potencial que pudieran causar los linfocitos T CD_4 . Los linfocitos $T\gamma\delta$ se localizan en las superficies epiteliales y pueden activarse con el complejo mayor de histocompatibilidad I o II, incluso pueden activarse en ausencia del complejo mayor de histocompatibilidad. Estas poblaciones se pueden activar con las proteínas de choque térmico (hsp 60), y pueden suprimir a los CD_4 . Las poblaciones de linfocitos $T\gamma\delta$ y CD_8 responden preferentemente a los antígenos solubles, mientras que los linfocitos T CD_4 reaccionan a los antígenos de la pared celular. Los linfocitos $T\gamma\delta$ suprimirían a los linfocitos T CD_4 con actividad citotóxica (55). Las células T CD_8 (contrasupresoras) actuarían suprimiendo a los linfocitos $T\gamma\delta$ asistiendo a la proliferación de los linfocitos T CD_4 (20).

Inmunidad humoral

La respuesta humoral en paratuberculosis parece tener una relación inversa con la respuesta mediada por células. En el curso de la infección, las concentraciones serológicas de anticuerpos se incrementan precedidas por la inmunidad medida por células. Estos anticuerpos se pueden detectar por pruebas como la fijación de complemento, la inmunodifusión en gel de agar y mediante la técnica de ELISA (46, 109). A medida que la inmunidad mediada por células se debilita, proliferan las bacterias intracelulares y comienza la producción de anticuerpos; esto ocurre muchos meses después de la infección, cuando las células infectadas se lisan y liberan los antígenos (23) (Fig 1). Si embargo esta respuesta humoral es de escaso valor contra las micobacterias que aún permanecen dentro de las células. De esta forma los casos clínicos con lesiones multibacilares, tienden a tener altas concentraciones de anticuerpos. En el suero se encuentran respuestas de inmunoglobulinas G, M y escasa respuesta de Ig A (57, 164). Los estudios inmunohistoquímicos realizados por Momontani han demostrado un incremento en el intestino de animales enfermos de paratuberculosis de células productoras de Ig M y G pero no de células productoras de Ig A. Algunos autores sugieren que los anticuerpos locales pueden producir reacciones de hipersensibilidad inmediata con liberación de histamina y de esta manera colaborar con las lesiones entéricas (23).

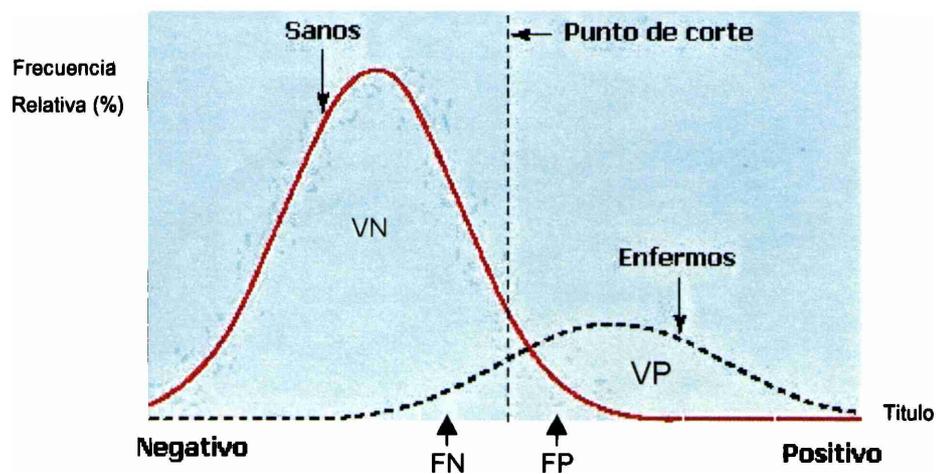
Diagnóstico

El término diagnóstico cuando se utiliza asociado a la palabra “test” o diagnóstico significa que la decisión de positivo (enfermo/infectado) o negativo (no infectado/no enfermo) se basa en el resultado de una prueba.

En un programa de control de paratuberculosis exitoso el primer paso es la identificación de los animales infectados. El diagnóstico de la enfermedad en los animales vivos se basa en los síntomas clínicos, reacciones inmunológicas e identificación del agente etiológico. El diagnóstico en el animal clínicamente enfermo con síntomas típicos y grandes cantidades de micobacterias eliminándose por materia fecal usualmente es relativamente sencillo. El desafío

radica en la identificación de los animales enfermos que no demuestran signología en donde el diagnóstico es más dificultoso, dado a que eliminan pocas bacterias en forma intermitente y normalmente son negativos a los tests que detectan anticuerpos. Estos animales constituyen el principal factor de riesgo para la permanencia de la enfermedad exigiendo la mayor sensibilidad y especificidad posible a las pruebas diagnósticas (Fig 2).

Fig 2: Demostración de la variación en la sensibilidad y especificidad de las pruebas diagnósticas modificando el punto de corte.



VN: Verdaderos negativos, VP: Verdaderos positivos, FP: Falsos positivos, FN: Falsos negativos.

Métodos bacteriológicos: La paratuberculosis fue descrita en el año 1895 por Johne y Frothingham como una enteritis crónica del ganado. Para aquella época, se asumía que el bacilo ácido alcohol resistente observado en los tejidos de los animales infectados pertenecían a formas modificadas de *Mycobacterium tuberculosis* o *Mycobacterium avium* subsp *avium* y que la enfermedad era una forma intestinal de tuberculosis (17). En 1910 Twort y Ingram describieron en forma casual la dependencia por la micobactina para su crecimiento *in vitro* (17). El cultivo de materia fecal es un método muy específico, en la paratuberculosis bovina se la considera como la técnica estándar de oro. Como contrapartida es costoso y de ejecución laboriosa, requiere de por lo menos 12 a 16 semanas de incubación para la formación de colonias visibles en medios sólidos (18). Las muestras clínicas como la materia fecal y la

mucosa intestinal normalmente están altamente contaminadas y requieren ser descontaminadas antes de ser sembradas en medios especializados. Los métodos de descontaminación son críticos en la recuperación del agente, estos métodos deben ser inocuos para la micobacteria y a la vez suprimir el desarrollo de los microorganismos contaminantes (82, 153, 154). Entre los agentes descontaminantes más usados están: el cloruro de hexadecil piridinium al 0,75%, cloruro de benzalconio al 1%, ácido oxálico al 5% y el hidróxido de sodio al 4% (153). Otro factor crítico es la centrifugación de las muestras, este proceso incrementa la detección de bacterias por gramo de materia fecal llegando a detectar 10-50 bacterias por gramo de materia fecal procesada (36, 53). Cuando se utilizan la centrifugación para incrementar la sensibilidad del cultivo es necesario utilizar antibióticos en la descontaminación y en el medio de cultivo, de lo contrario se incrementa el crecimiento de flora contaminante (125). Se pueden usar antifúngicos como anfotericina B, y antibióticos como la penicilina, vancomicina, ácido nalidíxico y cloramfenicol (118, 153). También es motivo de constante revisión la composición de los medios de cultivo (4, 93, 144, 157) Se pueden reducir los tiempos de incubación con el cultivo radiométrico y la confirmación con técnicas de PCR para la detección de IS900 (36). La sensibilidad del cultivo puede llegar al 50% y su especificidad es del 100% (27).

Métodos basados en genética molecular: Desde el descubrimiento de la secuencia de inserción específica IS900 (149) se han diseñado técnicas de PCR para ser aplicadas a muestras clínicas (54, 159, 169). Estos métodos son más veloces que los métodos de cultivo estándar pero carecen de sensibilidad por la presencia de sustancias inhibitoras de PCR en las muestras clínicas y la presencia de la yema de huevo en los medios de cultivo (126), también permiten detectar formas bacterianas con pared deficiente (19, 151). La secuencia de inserción IS900 es considerada específica para *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* pero algunas micobacterias tienen secuencias de inserción similares a IS900 y pueden dar reacciones positivas, estos problemas parecen centrarse en problemas con algunos cebadores de PCR. Estos problemas se pueden solucionar mediante el análisis de los polimorfismos de extensión de los fragmentos de restricción (RFLP), estos polimorfismos se ponen en evidencia hibridando con la secuencia de inserción IS900 (126). Esta prueba permite diferenciar cepas de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* previamente identificadas con PCR, esta

diferenciación de cepas es muy útil para la realización de estudios epidemiológicos (24, 103, 145).

Diagnóstico patológico: Las lesiones macroscópicas observadas son bastantes características aunque no conclusivas. La histopatología es un método de diagnóstico sensible y las lesiones características se pueden observar en los primeros estadios de la enfermedad, es una técnica laboriosa y requiere del análisis de varias muestras para detectar las lesiones escasas (104). También se necesita confirmar el diagnóstico mediante la puesta en evidencia del agente causal. Las tinciones con el método de Ziehl-Neelsen pueden dar resultados negativos cuando los gérmenes son escasos o cuando se encuentran bacterias con pared deficiente (151).

Inmunohistoquímica: La micobacteria se puede poner en evidencia mediante la visualización en cortes de tejidos incluidos en parafina con los métodos de inmunohistoquímica usando sueros monoclonales o policlonales (74, 75, 76, 101).

Pruebas inmunológicas: Hay muchas pruebas inmunológicas que pueden ser usadas para el diagnóstico de paratuberculosis con sus limitaciones. El diagnóstico de rutina más utilizado para la detección de los animales enfermos es el ELISA. También se siguen utilizando la fijación de complemento y la inmunodifusión. Considerando la evolución de la inmunidad en la enfermedad, estos métodos prestan su mayor utilidad en los estados clínicos de la enfermedad. Los animales subclínicos presentan bajos niveles de anticuerpos circulantes. Tomando en cuenta esto la sensibilidad de la prueba de ELISA puede variar desde el 90% en animales con enfermedad clínica hasta el 15% en los animales con enfermedad subclínica (27). Como *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* comparte muchos antígenos con otras micobacterias que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza se pueden dar falsos positivos. Una forma de disminuir estas reacciones es la preabsorción del suero con *Mycobacterium phlei* (163, 166, 167) para eliminar los anticuerpos de reactividad cruzada a pesar de esta absorción los animales con tuberculosis siguen dando en forma positiva.

Inmunidad Humoral: Las pruebas que se pueden utilizar para detectar anticuerpos en paratuberculosis pueden ser: fijación de complemento (115, 121), ELISA en suero (6, 11, 29, 31, 50, 79, 80, 81, 87, 131), ELISA en leche (130), inmunodifusión (114, 116, 121), dot-ELISA (138) y inmunobloting (western-blot) (108), siendo ELISA e inmunodifusión las pruebas más usadas.

ELISA: El principio fundamental del ELISA, a partir del cual se deriva su nombre, es la emisión de una señal a partir de una enzima para demostrar que se ha producido una unión antígeno anticuerpo y en que proporción (14). Todos los ELISA están compuestos por tres componentes, el sistema de captura, los analitos (las sustancias a ser detectadas y para las cuales se ha diseñado el ELISA) y el sistema de detección (14). Los ELISA diseñados para detectar anticuerpos están basados fundamentalmente en dos formatos: los ELISA no competitivos y los competitivos o ELISA de bloqueo. En los ELISA no competitivos los anticuerpos específicos que se han unido al antígeno inmovilizado se detectan mediante una inmunoglobulina específica unida a una enzima. Consecuentemente la cantidad de anticuerpo unido es directamente proporcional al desarrollo de color por parte de la enzima (113). Las placas de ELISA ofrecen diferentes capacidades y propiedades para la absorción pasiva de proteínas. Estas adsorciones se producen por fuerzas de atracción hidrofílicas e hidrofóbicas, en menor proporción las uniones covalentes a través de electrones compartidos y uniones iónicas a través de cargas estequiométricas de signos opuestos. Las placas con irradiación gamma presentan mayores variaciones en cuanto al background (106). Otras superficies de las microplacas utilizan grupos aminos primarios situados en el final de los brazos espaciadores injertados en la superficie de poliestireno por manipulación designado para uniones covalentes de moléculas las cuales serían difíciles de inmovilizar. El antígeno de ELISA puede ir acompañado por 2 antígenos uno LAM y uno proteico puede detectar más animales (128). No todas las placas tienen la misma afinidad por distintos antígenos, el Tween puede actuar como bloqueante (15). También hay sistemas que usan solo LAM (49) con alta sensibilidad. La estandarización de la técnica depende de la obtención de sueros positivos fuertes y débiles (48). La técnica se está utilizando en distintas especies ya sea bovinos ovinos y camélidos sudamericanos (65).

Respecto a las variaciones en la inmunidad humoral Nielsen (98), explica como varían los resultados de la técnica de ELISA con respecto a las pariciones sucesivas de los animales afectados, si bien algunos animales pueden ser positivos al primer parto las probabilidades de dar positivo son máximas a partir del segundo parto en adelante. También se encuentran variaciones a lo largo de la lactación, con un patrón inversamente proporcional entre las concentraciones de los anticuerpos en el suero con respecto a los del calostro, indicando un

cambio en la concentración de anticuerpos a lo largo de la lactación (98). Estos casos son limitados a bajos puntos de corte en el ELISA, indicando que los animales con pocos anticuerpos se encuentran infectados pero con una predominancia de respuesta celular. Desde el punto de vista diagnóstico es importante utilizar diferentes puntos de corte en la interpretación del ELISA en diferentes pariciones y en diferentes estados de lactación.

Inmunodifusión: La inmunodifusión es una técnica que presenta menor sensibilidad que ELISA, en teoría tiene un umbral de detección de 30 µg de proteína/ml, en cambio la técnica de ELISA puede llegar a detectar 0,0005 µg de proteína/ml, el radioinmunoanálisis 0,00005 y la fijación de complemento 0,05 µg de proteína/ml (136). Es una prueba rápida, tecnológicamente simple, de bajo costo, y eficiente cuando el clínico debe confirmar los casos clínicos sospechosos de paratuberculosis en animales que tienen diarrea y pérdida de peso. (114, 115, 116). Otra ventaja es que se pueden detectar anticuerpos de distintas especies sin la necesidad de realizar cambios en los reactivos. La sensibilidad y especificidad es correcta cuando se trata de ovinos y caprinos, en ganado bovino se observa una mayor proporción de falsos negativos.

Inmunidad celular: Tuberculina: La necesidad de detectar los animales con enfermedad subclínica ha focalizado el interés en las respuestas inmunes celulares. El más antiguo de los métodos es la reacción tuberculínica la cual detecta el incremento en el grosor de la piel consecuentemente a la reacción de hipersensibilidad de tipo retardado después de inocular el antígeno por la vía intradérmica. A esta prueba se la considera poco específica en paratuberculosis.

En algunas publicaciones, la johnina es más sensible que la tuberculina aviar (35). En animales artificialmente sensibilizados se produce una desensibilización en el mismo lugar que dura aproximadamente un mes, la cual no tiene influencia cuando se utiliza un lugar distinto al de la inoculación original con johnina ya sea en el mismo tiempo o más tarde (68, 117). Cuando se usa la prueba en animales previamente sensibilizados con *Mycobacterium bovis* solo se debe usar un solo lugar para inocular en la prueba utilizada en el campo ya que la inoculación de más de un lugar puede ir en detrimento de las reacciones cuando se aplican a la vez (69). El test de Stormont se usó para detectar aquellos animales que tienen poca sensibilidad, se caracteriza: por ser un test intradérmico doble basado en el hecho de que 6 o 9

días posteriores a la inyección de tuberculina los animales infectados desarrollan un incremento de la hipersensibilidad detectada por una segunda inoculación en el mismo sitio con un incremento en el grosor de la piel a las 24 horas posteriores a la segunda inoculación. El lugar de aplicación de la tuberculina con mayor sensibilidad es la tabla del cuello, puede dar 1 mm más sensible que en el pliegue anocaudal y el más específico es el pliegue anocaudal (39). En la tuberculina bovina aplicada una sola vez en el pliegue anocaudal se considera con un sensibilidad del 72% y una especificidad del 98,8% (39, 45) y para el test de Stormont 78,4% de sensibilidad y 94,7% de especificidad (39). La lectura del diámetro de la reacción puede ser medido con calibres, el cual requiere de una medición previa y puede variar de acuerdo a la dureza de la reacción o con reglas plásticas flexibles las cuales no requieren una medición previa y se mide el diámetro vertical, el diámetro horizontal y se saca la media aritmética de estos dos diámetros de la reacción (39). En aquellos animales en donde la reacción cutánea del cuello es débil, la medición del diámetro era más precisa que la medición del grosor de la piel (39).

Prueba de Stormont: Es una prueba ideada para seleccionar animales débilmente sensibilizados, es una prueba cutánea intradérmica similar a la inoculación única, en este caso es de doble inoculación y se realiza de la siguiente manera: se aplica en el cuello una inoculación similar a la aplicación única, 7 días después de la aplicación original se aplica una segunda en el mismo lugar donde se aplicó la primera inyección, se la considera positiva cuando 24 horas después de la segunda aplicación el aumento en el grosor de la piel es de 5 mm o más (10).

Prueba de Interferón gamma: Otras pruebas inmunológicas basadas en la inmunidad celular alternativas a la tuberculina, son la proliferación de linfocitos y la prueba de interferón gamma. La prueba de interferón gamma está diseñada para detectar la producción de IFN- γ en sangre entera suprimiendo la necesidad de aislar los linfocitos. Las células T previamente sensibilizadas que reconocen antígenos específicos en este caso PPD, liberan después de 24 horas de incubación IFN- γ , este interferón es detectado en un ELISA sandwich compuesto por anticuerpos monoclonales anti interferón gamma. Originalmente la prueba se utilizó en tuberculosis y luego en paratuberculosis (111,160). Actualmente existen “kits” diagnósticos comerciales basados en estos principios que usan como antígenos PPD aviar y bovino para ser

usados en forma comparada para la detección de las dos enfermedades, la especificidad de la prueba se encuentra comprometida por la presencia de antígenos de reacción cruzada que se puedan presentar por la infección con otras micobacterias las que más reacciones cruzadas pueden dar son *Mycobacterium avium* subsp *intracellulare* serovar 2 y serovar 9 las demás micobacterias producen poca interferencia (45).

Una forma de incrementar la especificidad de las pruebas humorales y celulares es la utilización de antígenos específicos de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* (40, 41). A lo largo de los últimos años la búsqueda de antígenos específicos ha sido bastante infructuosa, esto no es sorprendente dada la estrecha relación genética entre *Mycobacterium avium* subsp *avium* y *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* (16). Resulta poco sorprendente la escasez de antígenos genéticamente diferentes, probablemente las mayores diferencias entre las dos especies se encuentren en la expresión de las proteínas. El uso de antígenos específicos usualmente dan como resultado baja en la sensibilidad. Sería preferible utilizar un panel de antígenos para obtener una prueba óptima. Otra solución sería utilizar antígenos crudos como pruebas de screening seguido del uso de antígenos específicos en los animales positivos.

Control

El principal obstáculo es el período de incubación extremadamente largo y la gran proporción de animales enfermos subclínicos dificultosos de detectar mediante los métodos de detección actuales. Las medidas deberían apuntar a evitar la diseminación de la enfermedad en los rodeos libres de paratuberculosis (99). El mayor factor de riesgo es la introducción de nuevos animales dentro del rodeo. Las pruebas diagnósticas son a menudo insuficientes para detectar el verdadero estado infeccioso de un animal individual. Por lo tanto es necesario conocer el *status* de infección de todo el rodeo de origen de los animales que ingresan. Para lograr con este objetivo es necesario repetir las pruebas diagnósticas en la totalidad del rodeo (99).

En los rodeos en donde se encuentra la enfermedad es importante minimizar su difusión. Los animales de mayor edad diseminadores de la micobacteria y los emaciados deben ser

eliminados del rodeo. El riesgo de infección es máximo en los animales jóvenes, por lo tanto es crucial un buen manejo de los recién nacidos en lo que respecta al medio ambiente. Los terneros deben ser separados de los adultos inmediatamente después de nacidos, solo deberían tomar calostro de sus propias madres o de animales libres de la enfermedad (26).

Las vacunas contra la enfermedad pueden ser vivas o muertas, su eficacia es relativa en cuanto a que reducen la eliminación de bacterias en materia fecal y la enfermedad clínica. Su utilización por sí sola no es suficiente para el control de la enfermedad, y se pueden presentar casos clínicos cuando se deja de dar la vacuna. Las vacunas pueden ser vivas o células enteras muertas las cuales pueden interferir con el diagnóstico de la tuberculosis.

Actualmente no hay programas que se apliquen al control de la paratuberculosis, en general las medidas están destinadas a eliminar los animales que surjan con signología. Entre los métodos recomendados se encuentran ELISA como uno de los métodos más baratos y eficaces en el control casi equiparando al cultivo de materia fecal (26) junto con la aplicación de medidas sanitarias. Entre las medidas se debería tomar en cuenta el reemplazo de los animales enfermos por animales provenientes de rodeos sanos (120). El uso de coloraciones en materia fecal puede ser usado pero carece de sensibilidad y especificidad (154).

Tratamiento

Por el momento los tratamientos de la enfermedad son muy caros y de dudosa eficacia, solo se intentan en los casos en donde se quieran prolongar la vida de animales de mucho valor. Las drogas más usadas son la clofazimina o isoniazida y la rifabutina o etambutol seguidos de dosis diarias de isoniazida durante toda la vida (44). La isoniazida está indicada para el tratamiento de las infecciones bovinas con *Mycobacterium tuberculosis* o *Mycobacterium bovis* pero en el caso de *Mycobacterium avium* subsp *avium* y *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* presentan resistencia *in vitro*, por lo que su uso podría ser muy poco efectivo. *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* presenta susceptibilidad *in vitro* a las siguientes drogas: D-cycloserina, etambutol, amicacina, claritromicina, rifabutina y las fluoroquinolonas experimentales Bay y 3118. Los tratamientos en paratuberculosis pueden

fracasar, por los inconvenientes que deben sortear las drogas para penetrar al interior de los macrófagos (44).

Vacunación

El uso de la vacunación es un tema controvertido y aumenta los reactores a pruebas serológicas y alérgicas (35, 124) haciendo imposible diferenciar otras infecciones micobacterianas como la tuberculosis (63). La vacunación es más efectiva cuando los animales se vacunan antes de los 60 días de vida (147). Después de la vacunación aquellos animales que no reaccionan a la tuberculina o lo hacen en una forma débil tienen mas probabilidades de estar infectados (152) que aquellos animales que si reaccionan o reaccionan en forma intensa a la prueba intradérmica. Si bien la vacunación no impide la infección disminuye los signos clínicos (52).

Objetivos

Objetivo General

Diseñar un ELISA y conocer su comportamiento enfrentándolo a distintos estadios en animales naturalmente afectados de paratuberculosis

Objetivos Particulares

1. -Comparar los resultados del ELISA-PPA con: un kit de ELISA comercial, intradermoreacción con PPD-aviar y prueba de interferón gamma en animales naturalmente infectados mayores de 24 meses.
2. -Evaluar los efectos pos inoculación simple y doble (prueba de Stormont) de la PPD-aviar en el ELISA-PPA en animales naturalmente infectados menores de 24 meses.
3. -Determinar la sensibilidad y la especificidad del ELISA-PPA tomando como prueba de oro el cultivo de materia fecal en un rodeo infectado de paratuberculosis.
4. -Identificar los aislamientos con técnicas de genética molecular (PCR y FRLP).
5. -Obtener distintos antígenos de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* y *Mycobacterium avium* subsp *avium* y analizarlos con corridas electroforéticas.
6. -Evaluar el comportamiento diagnóstico de los antígenos mencionados en el punto 5 obtenidos, con el antígeno comercial PPA en la prueba de ELISA.

Materiales y métodos

1. Comparar el ELISA-PPA con el kit comercial ELISA-CSL (Australia), prueba tuberculínica aviar y prueba de interferón gamma-CSL.

Las pruebas se realizaron en 150 vacas mayores de 24 meses, provenientes de rodeos con antecedentes de paratuberculosis endémica, incluyendo 2 a 3 muertes anuales y diagnóstico previo confirmado por necropsia y cultivo de materia fecal.

De todos los animales se obtuvieron muestras de sangre entera, por punción yugular con tubos vacutainer® heparinizados, para la prueba de interferón gamma. Para las pruebas de ELISA se emplearon muestras de suero, obtenidas mediante punción de la vena coccígea en tubos sin anticoagulante y posterior centrifugación. Las muestras de materia fecal se tomaron directamente del recto de cada animal usando un guante nuevo para cada muestra. Las muestras de sueros fueron analizadas para la detección de anticuerpos antiparatuberculosos con un ELISA-PPA diseñado en nuestro laboratorio utilizando un antígeno comercial llamado PPA (PPA-Allied Monitor, Fayette, USA) y con otro kit de ELISA comercial australiano de uso internacional (ELISA-CSL). La sangre entera se analizó para la detección de interferón gamma con un kit comercial también australiano de uso internacional (IFN-gamma-CSL). La tuberculina (SENASA 0,5mg/ml, 25.000 UI/ml) se inoculó en la tabla del cuello, con lectura a las 72 horas posteriores a la inoculación. Los resultados obtenidos con el ELISA-PPA se compararon con las demás pruebas en tablas de contingencia y analizadas por el método estadístico chi cuadrado. Se detalla a continuación el protocolo de cada técnica.

Protocolo de ELISA-PPA

El ELISA-PPA consistió en una prueba indirecta en la que se analiza suero previamente absorbido con *Mycobacterium phlei* de acuerdo al método de Cox y col. (33). El absorbente bacteriano previamente mencionado se obtuvo de la siguiente manera: la bacteria se sembró en el medio de Dorset-Henley hasta que se observó la sedimentación de la película superficial, el sobrenadante se centrifugó y se precipitaron las proteínas con ácido tricloroacético a una

concentración final del 4%. El precipitado se resuspendió en una solución de buffer de fosfatos (pH 7,2) con 1 M ClNa, 2% de gelatina y 0,1% Tween 80 (ELISA-PBS) resuspendido 1/20 y conservado congelado hasta su uso. La absorción del suero se llevó a cabo mezclando 5 µl de todos los sueros con 495 µl del absorbente diluido 1/20, la solución se agitó durante 1 minuto y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 min. La placa se sensibilizó con 100 µl por pocillo de antígeno protoplasmático de *Mycobacterium paratuberculosis* (PPA-Allied Monitor, Fayette, USA) 20µg/ml en solución buffer de carbonato 0,05 M (pH 9,6) con 0.05 % de Tween 80. Las placas se incubaron toda la noche a 4°C. Luego se lavaron 6 veces con PBS, 0,05% Tween 80 (Solución buffer de lavado). A continuación 200 µl de PBS conteniendo 0,2% de gelatina se usó como solución bloqueante; después de incubar 1 hora a 35°C, las placas se lavaron 6 veces. Cien µl de los sueros control y problema diluidos 1/20 en solución absorbente se incubaron a 37°C durante 1 hora. Las placas se lavaron 6 veces y se transfirieron 100 µl de inmunoglobulinas anti Ig G bovina (Dako Denmark) diluido 1:5000 en ELISA-PBS. Después de incubar durante 1 hora a 37°C, la placa se lavó 6 veces y se adicionaron 100 µl de solución de substrato conteniendo 2 mM de peróxido de hidrógeno y 0,4 mM 2,2-azino-bis (ácido 3-etil-benzotiazolina-6-sulfónico)(Sigma Chemical Co.) en 0,05 M de buffer citrato (pH 4). Aproximadamente después de 15 min se leyó la densidad óptica con un filtro de 405 nm. El suero control positivo provino de un animal clínicamente afectado del cual se aisló *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*. Como punto de corte, “valor por encima del cual se considera a una muestra como positiva”, se tomó la densidad óptica del suero de un animal positivo a la PPD bovina.

Protocolo de ELISA-CSL

El protocolo se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante, el punto de corte fue el valor de densidad óptica del suero control negativo más 0,100.

Tuberculinización

La prueba tuberculínica comparada se realizó usando PPD aviar (SENASA 0,5mg/ml, 25.000 UI/ml) y PPD bovina (SENASA 1mg/ml 32.500 UI/ml) mediante una inoculación intradérmica de 0,1 ml en la tabla del cuello. Aproximadamente 72 horas después, se midieron los pliegues cutáneos.

Interferón gamma

El test de interferón gamma (CSL-Australia) se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En lugar de usar johnina se utilizó PPD aviar. Se extrajo sangre de la vena yugular con tubos vacutainer heparinizados, las muestras fueron incubadas dentro de las 8 horas de extraídas. Para el cultivo se extrajeron 1,5 ml de sangre entera y se distribuyeron en cada uno de tres tubos, un tubo control con PBS, un tubo con PPD bovina y un tubo con PPD aviar. Después de 24 horas de inoculación a 37°C, se extrajo el plasma y se congeló. En aquellos animales previamente sensibilizados, los linfocitos liberan interferón gamma. Los reactores a PPD aviar fueron aquellas muestras con una densidad óptica de 0,100 o mayor con respecto al control y una densidad óptica con una proporción menor a 0,7 del valor de PPD bovino con respecto al valor del PPD aviar.

Protocolo de cultivo de materia fecal

La materia fecal fue obtenida directamente del recto de cada animal usando un guante nuevo para cada muestra. Se colocaron 2 gramos de materia fecal en tubos contenedores de 50 ml de capacidad conteniendo 35 ml de agua destilada estéril (tubo de materia fecal). Se agitó vigorosamente en agitador mecánico por 30 minutos, se dejó en reposo en posición vertical a temperatura ambiente por un período de 30 minutos permitiendo decantar las fibras vegetales en el fondo del tubo. Se transfirieron 5 ml del tubo de materia fecal con una pipeta estéril a partir del borde superior de la suspensión a un segundo tubo de plástico cónico de 50 ml de capacidad conteniendo 25 ml de una solución al 9% de CHP (cloruro de hexadecil piridinium) en medio de caldo infusión cerebro corazón (concentración final del CHP 0,75%). Los tubos se incubaron a 35°C durante 18-24 horas, se centrifugaron a 900 rpm durante 30 min, se

descartó el sobrenadante y se inoculó 200 µl del culot en cada uno de dos tubos con medio de cultivo de Herrold sin antibióticos, los tubos se incubaron a 37°C. Los tubos se incubaron durante seis meses.

2. Evaluar los efectos pos Inoculación de la PPD-aviar en el ELISA-PPA en animales naturalmente infectados menores de 24 meses.

En el mismo rodeo del ítem 1, a 44 animales con edades entre los 15 y 24 meses de edad se les realizó la prueba de Stormont que consiste en dos aplicaciones de tuberculina aviar separadas por 8 días de intervalo entre la primera y la segunda inoculación, la lectura se realiza a las 24 horas de la última inoculación. A este protocolo se le introdujo una modificación que consistió en leer la primera inoculación a las 72 horas como si fuera una tuberculina rutinaria de inoculación simple, este protocolo se realizó primero del lado derecho del cuello y luego se repitió del lado izquierdo. Con el objeto de detectar los efectos de las inoculaciones en el ELISA-PPA se extrajeron muestras de sangre según el siguiente esquema de sangrado e inoculaciones intradérmicas:

Día 0: Primer sangrado y primera inoculación en el lado derecho de la tabla del cuello

Día 3: Lectura de la primera inoculación de Stormont como inoculación simple

Día 8: Segunda inoculación de Stormont y segundo sangrado

Día 9: Lectura de la prueba de Stormont

Día 37: Primera inoculación de Stormont lado izquierdo y tercer sangrado

Día 40: Lectura de la primera inoculación de Stormont como inoculación simple

Día 47: Segunda inoculación de Stormont

Día 48: Lectura de la prueba de Stormont

Día 75: Cuarto y último sangrado

Las asociaciones entre las reacciones tuberculínicas y las medias de las densidades ópticas se analizaron usando las variaciones estimadas derivadas por el modelo lineal general (General linear Models, GLM) del sistema de análisis estadístico (SAS, Statistical Analysis Systems Institute).

Los protocolos detallados de tuberculinización y de la prueba de ELISA-PPA se presentan a continuación.

Protocolo de ELISA-PPA

El protocolo usado es el mismo del ítem 1, con la siguiente modificación: No se usó punto de corte, el análisis de los resultados se realizó sobre las densidades ópticas crudas.

Tuberculinización

Se Inoculó PPD-Aviar (0,1ml de 0,5 mg/ml, 25.000UI/ml, serie: 11 SENASA-DILAB) en el tercio medio del cuello usando una jeringa semiautomática (McLintock preset syringe) del lado derecho de cada uno de los 44 animales de 15 meses de edad. El esquema de las inoculaciones se encuentra resumido en la tabla 2. Las inoculaciones se llevaron a cabo de acuerdo a la metodología de Stormont con la modificación de realizar una lectura después de transcurridas 72 hs de la primera inoculación como si fuera una inoculación de simple lectura, la lectura de la segunda inoculación en el mismo lugar se efectuó a las 24 hs de acuerdo a lo especificado por la prueba original. Los animales que presentaban una diferencia de 4 mm en la segunda inoculación se consideraron como positivos. El mismo procedimiento de inoculaciones se llevó a cabo 37 días después pero del lado izquierdo del cuello.

3. Determinar la sensibilidad y la especificidad del ELISA-PPA tomando como prueba de oro el cultivo de materia fecal en un rodeo infectado de paratuberculosis.

Se tomaron muestras de materia fecal y el suero correspondiente a cada una de 192 vacas provenientes de un rodeo en donde anualmente 4-5 animales morían con signos previos compatible con paratuberculosis. Las muestras de materia fecal se obtuvieron directamente del recto y se procesaron para el aislamiento de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*; las muestras sanguíneas fueron extraídas por punción de vena coccígea y procesadas con ELISA-

PPA para detectar anticuerpos contra paratuberculosis. El punto de corte del ELISA, se determinó con la curva ROC y el programa estadístico MedCalc ® Versión 7.0.0.2 , tomando como prueba confirmatoria los resultados del cultivo de materia fecal.

Protocolo de cultivo de materia fecal

Se utilizó el protocolo de inoculación del ítem 1 con las siguientes modificaciones. Los 2 gramos de materia fecal se resuspendieron en una solución de cloruro de hexadecil piridinium al 0,75% en caldo infusión cerebro corazón concentrado al 1/2, después de la decantación por 30 minutos se transfirió todo el sobrenadante a un segundo tubo de plástico cónico. Luego de incubar durante 24 horas a 37°C se centrifugó a 3.000 rpm durante 30 min y el culot se resuspendió con un mililitro de una suspensión antibiótica conteniendo 100 µg/ml de vancomicina y ácido nalidíxico en caldo infusión cerebro corazón. El material resuspendido se incubó 48 horas a 37°C. El medio de cultivo utilizado fue el de Herrold con los mismos antibióticos y concentraciones utilizados en el proceso de descontaminación.

Protocolo de ELISA

El ELISA se realizó con las siguientes modificaciones: El conjugado se utilizó en una dilución de 1:10.000 (Sigma-Aldrich, anti inmunoglobulina G bovina producida en conejo conjugada con peroxidasa, obtenida por afinidad), las diluciones de los sueros se realizaron 1:250, la solución bloqueante, los sueros testigos, problemas y el conjugado se incubaron durante 1 hora a 37°C. Los resultados se expresaron en porcentaje del suero positivo.

4. Identificar los aislamientos con técnicas de genética molecular (PCR y FRLP).

Se procesaron 3 cepas aisladas en nuestro laboratorio, 2 de origen bovino provenientes del rodeo del ítem 1 y una cepa ovina aislada en el servicio de diagnóstico. En todas se buscó la

presencia de la secuencia de inserción IS900, también se procesaron muestras de materia fecal y mucosa intestinal con diferentes métodos de extracción.

Protocolo de PCR

Reacción de PCR: La reacción se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito por Collins et al (25). Se amplificó un fragmento de 217 bp de la secuencia de inserción IS900 (posición 662-640 y 445-467). Después de 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 92°C, 2 min a 72°C en controlador térmico programable (PTC-100, M.J. Research Inc), 10 µl se analizaron en un gel de agarosa al 2% por electroforesis.

Extracción de ADN a partir de colonias: Se extrajeron ansadas de colonias sospechosas de ser *Mycobacterium paratuberculosis* cultivadas en medio sólido, las ansadas se suspendieron en 100µl de agua destilada estéril. Las muestras fueron hervidas durante 5 min y congeladas a -80°C, este ciclo de congelación y hervido se repitió 4 veces. El último hervido se realizó por 15 min y las muestras se conservaron durante toda la noche a -20°C hasta la realización de PCR.

Extracción de ADN a partir de materia fecal: Se suspendió un gramo de materia fecal en 10 ml de agua destilada. Se dejó sedimentar durante 15 min se extrajeron 400 µl de sobrenadante a los cuales se le adicionaron 50 µl de lisosima (10mg/ml Sigma) se agitó y se incubó durante toda la noche a 37°C. Se agregaron 10 µl de proteinasa K (10mg/ml Promega) y se incubó durante 10 min a 65°C. La mezcla se calentó a 100°C por 30 min. Se realizaron dos extracciones con un volumen de alcohol/cloroformo/alcohol-isoamílico 24:24:1 y una extracción con cloroformo/alcohol-isoamílico 24:1. Al sobrenadante se le agregaron 100 µl de 5 M CINa y 2 volúmenes de ethanol (100%). Las muestras fueron incubadas 60 min at -20°C y se centrifugaron por 15 minutos a 12.000 rpm. El pellet se lavó dos veces con 1 ml de ethanol 70%, se resuspendió en 20µl de 0,1 TE-buffer (1 mM tris HCl, 0,1 mM EDTA, pH:8). Para la realización de la reacción se utilizaron 5 µl.

Extracción de ADN a partir de mucosa intestinal: Se extrajeron partes de la mucosa con ansa de platino y se suspendieron en 400 μ l de buffer Tris-EDTA pH: 8. Se adicionaron 10 μ l de proteinasa K (10 mg/ml) y se dejó actuando a 37°C durante toda la noche. La solución fue lisada con 50 μ l de lisosima (10 mg/ml) a 37°C durante 1h, después de agregar 75 μ l de SDS/proteinasa K (100 μ l de SDS 10% + 10 μ l 10 mg/ml prot K) la solución se incubó 10 min a 65°C. Después de dos extracciones con 400 μ l de fenol/cloroformo/alcohol-isoamílico 24:24:1, se realizó una extracción con cloroformo/alcohol-isoamílico 24:1. Al sobrenadante se le agregó 100 μ l de ClNa 5 M y dos volúmenes de etanol 70%. Las muestras fueron incubadas a 60 min a -20°C y se centrifugó durante 15 min 12.000 rpm. El pellet fue lavado 2 veces con 1 ml de etanol 70% y se resuspendió en 20 μ l de 0,1 TE buffer (1 mM tris HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8), se utilizaron 5 μ l para la reacción de PCR.

Protocolo de RFLP

Aislamiento de ADN y digestión con endonucleasas: La extracción de ADN se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito por van Soolingen et al (146). El método de RFLP se realizó siguiendo las descripciones de van Embden et al (145). Después de extraer y purificar el ADN, aproximadamente 2 μ g de ADN genómico se digirió por 3 hrs a 60°C con 5 U de BstEII, se realizó una electroforesis y se hibridizó después del "Southern blotting" con una sonda de 707 pb de la secuencia de inserción IS900 en las sitios 272 a 962. La sonda fue marcada con [α -³²P] dCTP usando un kit de marcado (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los pesos moleculares usados fueron λ Hind III. Las radiografías se revelaron después de 2 días de exposición a -70°C.

5. Obtener distintos antígenos de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* y *Mycobacterium avium* subsp *avium*, identificarlos con corridas electroforéticas y evaluarlos en un rodeo infectado.

Con el objetivo de obtener antígenos de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* y *Mycobacterium avium* subsp *avium* para ser utilizados en la prueba de ELISA, se cultivaron cepas aisladas de animales paratuberculosos y una cepa aviar utilizada para la producción de PPD aviar. Las cepas se cultivaron en medios líquidos de Watson Reid. Los antígenos obtenidos fueron los siguientes: 1- Medio de cultivo líquido sin procesamiento, 2- Precipitación del medio de cultivo líquido con ácido tricloroacético, 3- Extracción por ebullición del soma bacteriano. También se agregaron tuberculina aviar proveniente de Alemania y Argentina y tuberculina bovina proveniente de Japón y Argentina para comparar las proteínas. Los antígenos fueron identificados por corrida electroforética y cada uno se utilizó como antígeno en el ELISA empleando los mismos sueros de animales sanos y enfermos en función del cultivo de materia fecal utilizado anteriormente para establecer el punto de corte del ELISA. Los resultados del ELISA se analizaron estadísticamente en base al área bajo la curva (ABC). Los protocolos detallados de cada técnica se presentan a continuación.

Obtención de antígenos a partir del medio líquido

Se precipitaron las proteínas con ácido tricloroacético a una concentración final del 4 %. Después de 1 hr se centrifugó a 4.500 rpm 20 min el precipitado, se lavó tres veces con ácido tricloroacético al 1% y luego con solución de cloruro de sodio al 5% hasta que el pH del sobrenadante se encontró en 2,7 aproximadamente, el número de lavados con cloruro de sodio necesarios para alcanzar un pH de 2,7 depende del espesor de la capa de precipitado y de la cantidad de líquido empleado. El pH nunca deberá superar 2,7 de lo contrario se empezará a resuspender.

Disolución del precipitado: Se agrega lentamente al precipitado solvente alcalino y se agita hasta que se hayan disuelto todas las partículas. Se obtiene un líquido color café cuyo pH es de 6,7 a 7 que se denomina preconcentrado y cuyo contenido proteico es de 40 a 60 mg/ml. Se

debe de emplear el menor volumen posible para disolver el PPD y se medirá la cantidad utilizada.

Solvente alcalino

Para preparar 1.000 ml, disolver

Fosfato disódico ($\text{PO}_4\text{HNa}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).....17,8g

Hidróxido de Sodio (HONa) 45%..... 2 ml

Agua destilada c.s.p..... 1.000 ml

Obtención de antígenos somáticos por ebullición

Aproximadamente 200 mg peso húmedo de soma bacteriano se hirvieron durante 10 minutos en 20 ml de solución fisiológica, el soma bacteriano se centrifugó durante 10 min a 3.000 RPM. El sobrenadante se utilizó como antígeno.

Protocolo de electroforesis. SDS-PAGE

Las muestras de los cultivos fueron diluidas en buffer de muestra (Buffer Tris-ClH 0,5 molar pH: 6,8, 5% de SDS, 1% 2-mercaptoetanol, 10% glicerol), se hirvieron durante 5 min. Se utilizaron geles de acrilamida-bisacrilamida con buffer tris-glicina de acuerdo a Laemmli (66). Los geles se corrieron durante 45 minutos a 120 Voltios. Los geles se colorearon con la coloración de plata de acuerdo a Wray (161)

6. Evaluar el comportamiento diagnóstico de los antígenos obtenidos de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* y *Mycobacterium avium* subsp *avium* en el ELISA comparándolos con el ELISA-PPA.

Los distintos antígenos se utilizaron en la prueba de ELISA comparándolos con el antígeno comercial PPA, los sueros y el protocolo fueron los utilizados para determinar la sensibilidad y especificidad del ELISA-PPA, tomando los resultados del cultivo de materia fecal como referencia. Los resultados se analizaron comparando las áreas bajo la curva utilizando el índice z.

Resultados

1. Comportamiento comparativo entre ELISA, tuberculinización e interferón gamma

Los primeros ensayos realizados en el desarrollo del ELISA consistieron en la comparación con un ELISA comercial, el empleo de PPD aviar e interferón gamma (Tabla 1). No fue posible contar con los resultados del cultivo de materia fecal por la contaminación de los medios.

Tabla 1: Resultados de tests positivos en un total de 150 animales.

N. Animal	PPD-Aviar	IFN-gamma	ELISA-CSL	ELISA-PPA
154	-	-	-	+
103	-	-	+	+
18	-	-	+	-
90	+	+	+	+
157	+	+	+	+
98	+	-	-	+
186	+	+	-	-
15	-	+	-	-
115	+	-	-	-

A esta lista se le deben adicionar 10 animales más que solo reaccionaron a PPD-Aviar.

Tabla 2: Comparación del ELISA-CSL con IFN γ CSL

		ELISA-CSL		
		Pos	Neg	Total
IFN-GAMA CSL	Pos	2	2	4
	Neg	2	144	146
	Total	4	146	150

P= 0,000

Tabla 3: Comparación de ELISA-CSL con PPD-aviar

		ELISA-CSL		
		Pos	Neg	Total
PPD-Aviar	Pos	2	17	19
	Neg	2	129	131
	Total	4	146	150

P=0,0229

Tabla 4: Comparación de ELISA-PPA con PPD-aviar

		ELISA-PPA		
		Pos	Neg	Total
PPD-Aviar	Pos	3	16	19
	Neg	2	129	131
	Total	5	145	150

P= 0,0012

Tabla 5: Comparación de PPD-aviar con IFN γ EIA

		Interferon gama		
		Pos	Neg	Total
PPD-Aviar	Pos	3	12	15
	Neg	1	134	135
	Total	4	146	150

P= 0,0000

Tabla 6: Comparación de ELISA-PPA con ELISA-CSL

		ELISA-PPA		
		Pos	Neg	Total
ELISA-CSL	Pos	3	1	4
	Neg	2	144	146
	Total	5	145	150

P= 0,0001

Tabla 7: Comparación de ELISA-PPA con IFN γ EIA

		ELISA-PPA		
		Pos	Neg	Total
Interferon-Gama	Pos	2	2	4
	Neg	3	143	146
	Total	5	145	150

P= 0,0000

2. Inoculación Stormont y relación con ELISA.

Tabla 8: Resultados de las pruebas tuberculínicas aplicadas en la tabla del cuello expresado en mm. Se consideró como positivo al test cuando reaccionaron con 3 o > mm para la inoculación simple del lado derecho e izquierdo del cuello (ISD y ISI) y con 4 o > mm para Stormont del lado derecho e izquierdo del cuello (SD y SI).

NTP	Reactores del lado D e I					Reactores del lado I							
	4TP	3TP		2TP		1TP							
NA	263	283	266	257	286	265	274	275	277	281	290	292	294
ISD	4	0	3,5	0	2	1,5	0	0	0	1	0	0	0
SD	9	5	4	4	4	3	0	3	0	1,5	1	3,5	3
ISI	3	4	4	0	0	0	0	3	0	3	0	0	0
SI	5	4	2	5	5	4	4	1	4	1	5	4	4

NTP: Números de tests positivos, 4TP: 4 tests positivos, 3TP: 3 tests positivos, 2TP: 2 tests positivos, 1TP: 1 test positivo, NA: Número de animal, ISD: Inoculación simple del lado derecho del cuello, SD: Stormont del lado derecho del cuello, ISI: Inoculación simple del lado izquierdo del cuello, SI: Stormont del lado izquierdo del cuello.

Para analizar estadísticamente el efecto de la inoculación intradérmica en la prueba de ELISA los 44 animales se dividieron en dos grupos en base a las reacciones a la prueba de Stormont del lado derecho del cuello. El grupo 1 se encuentra formado por los 39 animales negativos a la prueba de Stormont del lado derecho (animales con reacciones menores a 4 mm, tabla 10) y el grupo 2 por los 5 animales positivos (animales con reacciones iguales o mayor a 4 mm, tabla 9).

Tabla 9: Resultados y análisis estadístico de las pruebas intradérmicas y de ELISA del grupo2 formado por los reactores con 4 mm o más a la inoculación de Stormont del lado derecho (animales reactores SD de la tabla 8).

	ISD	EIA0	SD	EIA1	ISI	EIA2	SI	EIA3
NA	mm	DO	mm	DO	mm	DO	mm	DO
257	0	178	4	316	0	334	5	516
263	4	279	9	335	3	352	5	417
266	3,5	215	4	500	4	300	2	332
283	0	221	5	456	4	401	4	607
286	2	208	4	254	0	186	5	221

ELISA 0 (M= 217,67) vs. ELISA 1 (M= 345,67) P= 0,02, ES= 33,81

ELISA 0 (M= 217,67) vs. ELISA 2 (M= 301,67) P= 0,037, ES= 24,7

ELISA 0 (M= 217,67) vs. ELISA 3 (M= 400,83) P= 0,012, ES= 42,15

Referencias para tablas 9 y 10: NA: número de animal, mm: diferencia en milímetros pre y pos inoculación de la reacción intradérmica, DO: densidad óptica cruda del ELISA, ISD: inoculación cervical simple del lado derecho del cuello, EIA0: ELISA expresado en densidad óptica cruda en el día cero (primera muestra sanguínea, animal sangrado al inicio de la experiencia y previamente a la inoculación intradérmica), SD: inoculación de Stormont del lado derecho del cuello, EIA1: ELISA expresado en densidad óptica cruda en el segundo sangrado (segundo sangrado, 8 días transcurridos del inicio de la experiencia y de la primera inoculación), ISI: inoculación cervical simple del lado izquierdo del cuello, EIA2: ELISA expresado en densidad óptica cruda, (tercer sangrado, 37 días transcurridos el inicio de la experiencia y 29 días de la última inoculación), SI: inoculación de Stormont del lado izquierdo del cuello, EIA3: ELISA expresado en densidad óptica cruda, (cuarto y último sangrado transcurridos 75 días del inicio de la experiencia y 28 días de la última inoculación).

Tabla 10: Resultados de la reacción y análisis estadístico de ELISA y pruebas intradérmicas del grupo1 (formado por el resto de los animales que no reaccionaron con 4mm o más a SD de la tabla 8)

NA	ISD mm	EIA0 DO	SD mm	EIA1 DO	ISI mm	EIA2 DO	SI mm	EIA3 DO
251	0	258	2	170	0	123	0	90
252	0	163	0	270	0	524	0	190
254	0	136	0	192	0	139	2	94
255	0	154	0	172	0	167	2	162
256	0	130	0	129	0	93	2	89
258	0	470	0	224	0	170	3	191
259	0	160	0	142	0	136	0	102
260	0	330	0	321	0	345	0	289
261	0	328	1,5	295	0	309	0	289
262	0	214	3,5	221	0	214	2	461
264	0	364	3	317	0	442	3	366
265	1,5	266	3	297	0	270	4	304
267	0	233	0	237	0	357	1	267
268	0	320	0	320	0	371	2	302
270	0	169	0	197	0	419	0	394
271	2	169	1	244	0	237	3	525
272	0	156	0	151	0	252	2	674
273	0	212	0	206	0	195	2	237
274	0	296	0	408	0	274	4	439
275	0	190	3	181	3	195	1	302
276	0	195	0	207	0	318	1	220
277	0	210	0	220	0	240	4	205
278	0	202	0	207	0	220	0	209
279	0	175	0	178	0	212	3	409
280	0	201	0	196	0	199	2	211
281	1	156	1,5	360	3	261	1	432
282	0	205	0	213	0	237	0	312
284	0	219	3	200	0	263	0	312
285	0	245	3	212	0	223	1	281
287	0	142	0	154	0	217	0	165
288	0	223	1	228	0	178	0	204
289	0	155	0	145	0	144	0	143
290	0	284	1	320	0	290	5	356
291	0	149	0	207	0	162	2	253
292	0	160	3,5	166	0	290	4	234
293	0	161	2	200	0	192	1	216
294	0	187	3	190	0	226	4	271
295	0	160	1	147	0	188	0	171
299	0	164	0	218	0	212	1	208

ELISA 0 (M= 213,32) vs. ELISA 1 (M= 222,32) P= 0,58, ES= 11,36

ELISA 0 (M= 213,32) vs. ELISA 2 (M= 243,87) P= 0,12, ES= 13,57

ELISA 0 (M= 213,32) vs. ELISA 3 (M= 270,18) P= 0,019, ES= 16,80

3. ELISA y cultivo

Figura 3: Del cultivo de 194 muestras de materia fecal procesadas con el método de doble incubación, 31 dieron resultado positivo y 163 resultado negativo. La prevalencia al cultivo es de 15.97% animales positivos.

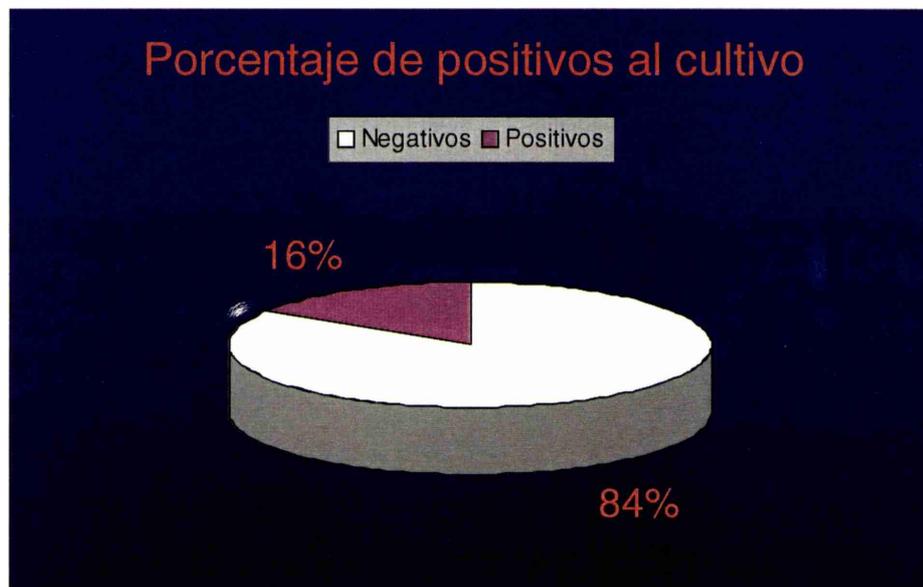


Figura 4: De los 31 animales positivos al cultivo, 16 (8%) presentaron 1-20 colonias contadas por tubo, 8 animales (4%) 20-50 colonias por tubo y 7 animales (4%) más de 50 colonias por tubo.

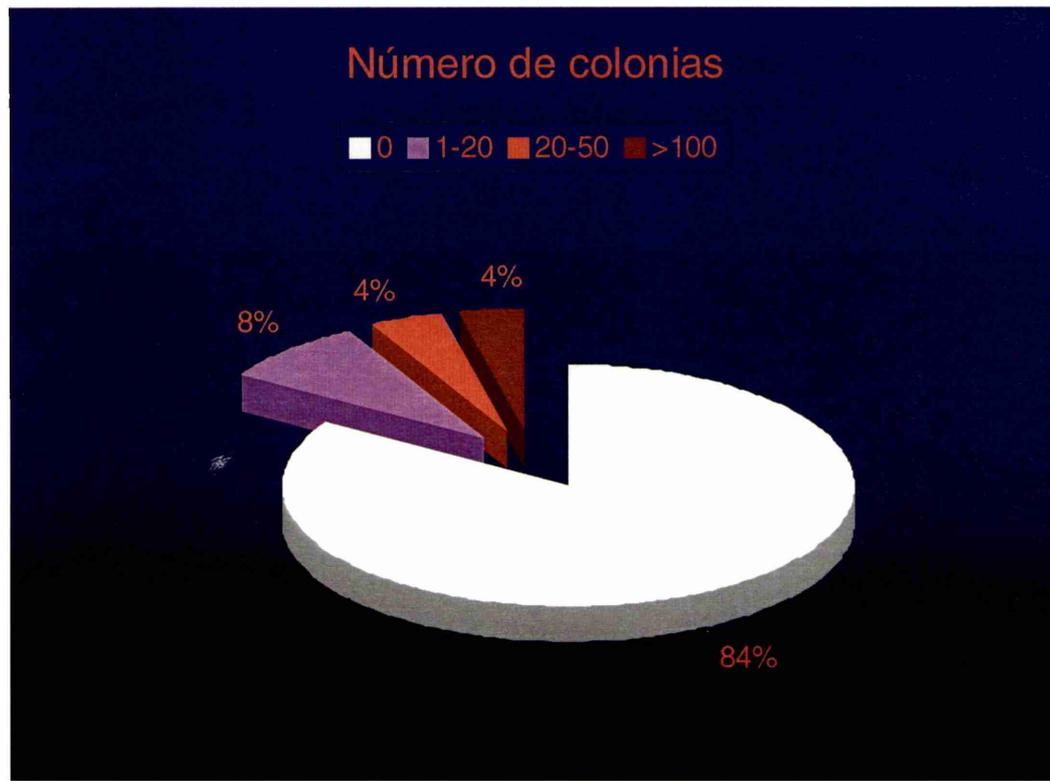


Figura 5: La curva ROC determinó como punto de corte óptimo del ELISA-PPA a aquellas muestras de suero que reaccionaban con el 48% con respecto al suero control positivo, con una sensibilidad del 38,7% (intervalo de confianza 95% 21,9 a 57,8), especificidad del 95,7% (intervalo de confianza 95% 89,5 a 98,8) y el resultado del area bajo la curva para el ELISA-PPA fue de 0,667 (error estandar de $\pm 0,059$ e intervalo de confianza al 95% de 0,577 a 0,749)

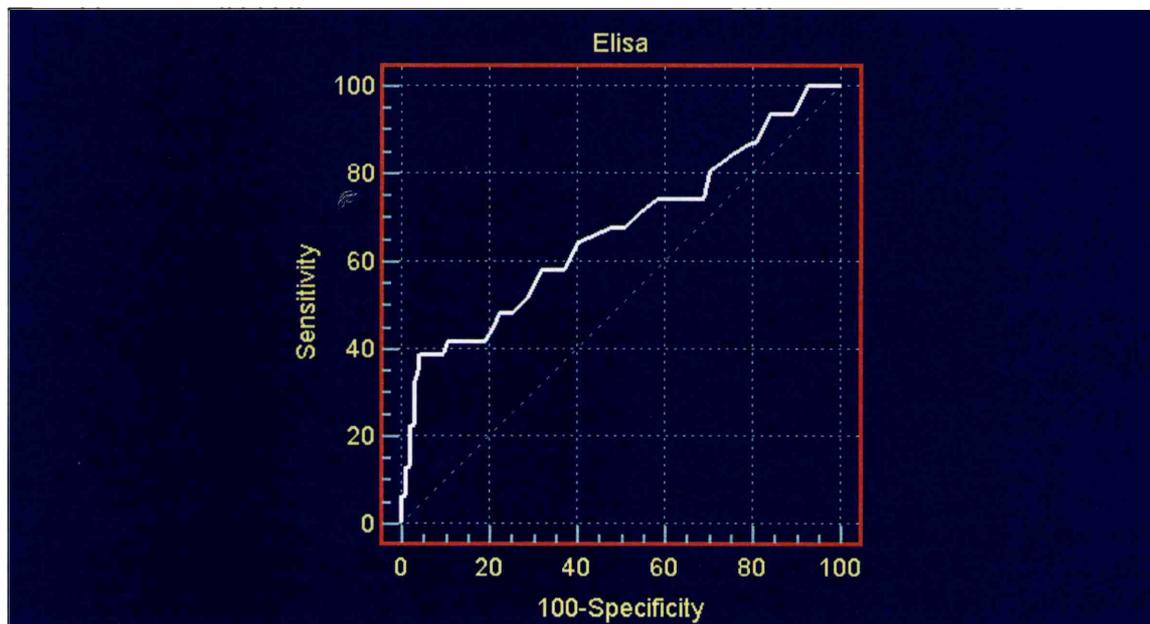


Tabla 11 Comparación del cultivo con ELISA

Resultado del ELISA	Patrón de referencia CULTIVO		
	(+)	(-)	
Positivos (+)	12 (a)	4 (b)	16 (a+b)
Negativos (-)	19 (c)	90 (d)	109 (c+d)
	31 (a+c)	94 (b+d)	125 (N)

Claves:

a = Verdaderos Positivos (VP) = enfermos con prueba positiva

b = Falsos Positivos (FP) = no enfermos con prueba positiva

c = Falsos Negativos (FN) = enfermos con prueba negativa

d = Verdaderos Negativos (VN) = sanos con prueba negativa

a+b = resultados positivos de la prueba diagnóstica

c+d = resultados negativos de la prueba diagnóstica

a+c = población enferma o positivos a la prueba de referencia

b+d = población sana o negativos a la prueba de referencia

N = a+b+c+d = total de casos. Se tomaron 125 de los 192 por limitaciones del programa

Valor Predictivo

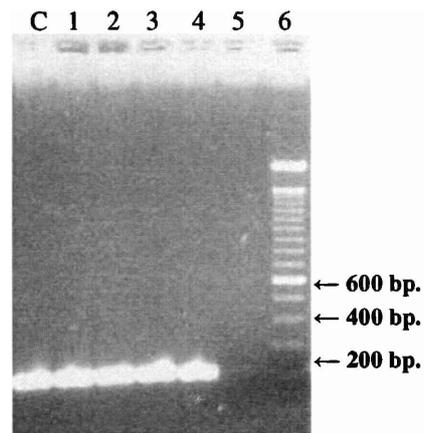
Valor Predictivo Positivo = VPP = 75%

Valor Predictivo Negativo = VPN = 82,6%

4. Identificar cepas con pruebas de genética molecular

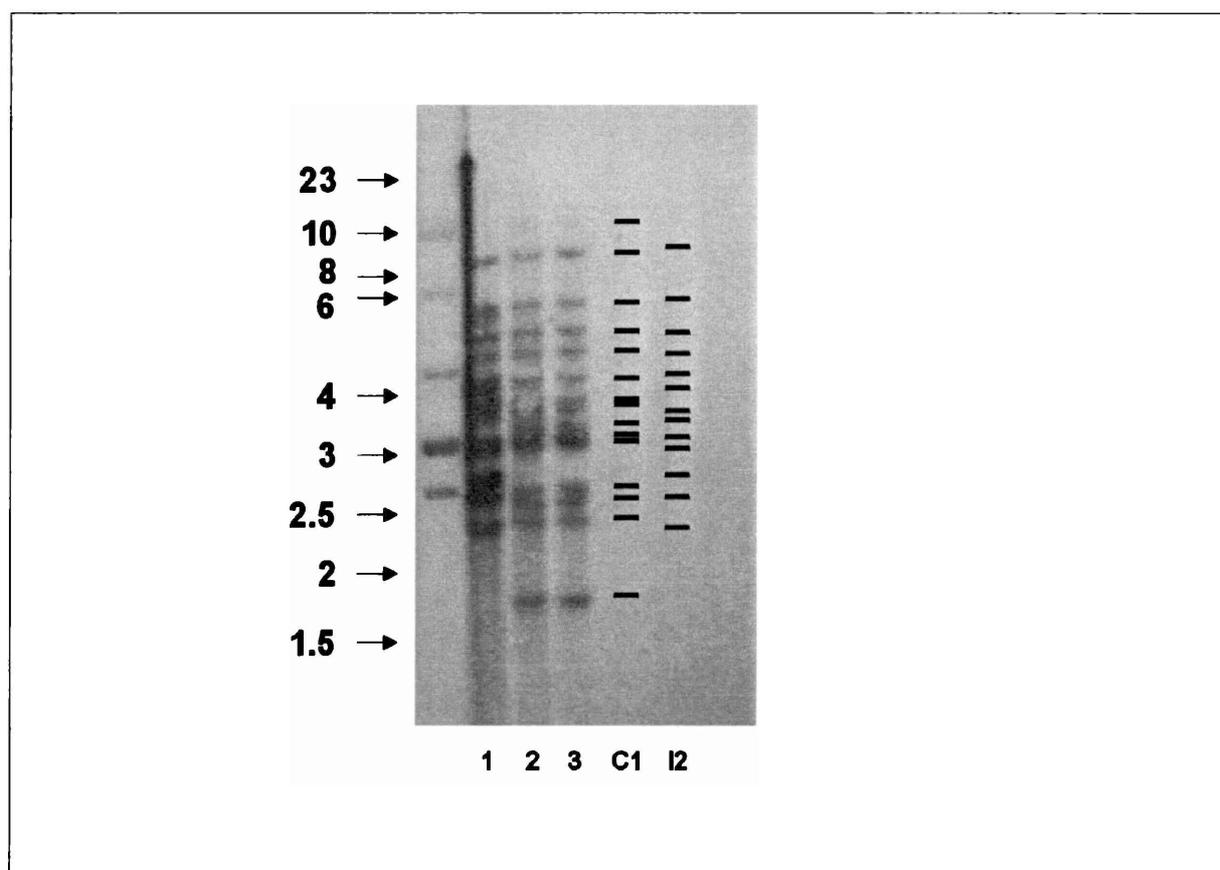
PCR

Fig 6: Corrida electroforética en gel de agarosa demostrando los productos de amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa de la secuencia de inserción IS900.



Gel de PCR: calle C, control positivo; calle 1 y 2, colonias de origen bovino; calle 3, colonia de origen ovino; calle 4, mucosa de ovino; calle 5, materia fecal ovino; calle 6, marcador de peso molecular.

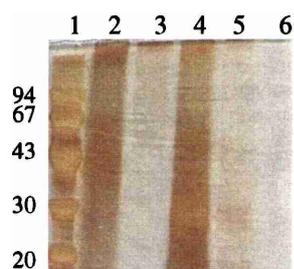
RFLP

Figura 7: Análisis de los polimorfismos de longitud utilizando la enzima de restricción *BstEII*

A la izquierda pesos moleculares expresados en Kbp, calle 1: RFLP cepa ovina, calles 2 y 3: RFLP cepas bovinas, calle C1: patrón de cepas bovinas correspondiente a cattle 1 coincide con calles 2 y 3, calle I2 patrón de cepas ovinas correspondiente a intermediate 2 coincide con calle 1.

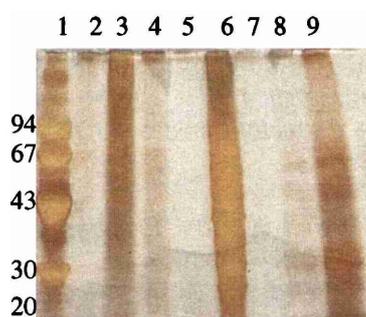
5. Identificación de los distintos antígenos en corridas electroforéticas

Figura 8: Corrida electroforética de distintos antígenos



1 Marcadores de peso molecular, 2 y 3 Proteína de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*, con distintas concentraciones, 4 y 5 Proteína de *Mycobacterium avium* subsp *avium*, con distintas concentraciones, 6 Medio líquido de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* sin procesar

Figura 9: Corrida electroforética de distintos antígenos



1 Marcadores de peso molecular, 2 Johnina Alemania, 3 PPD tuberculosis Japón, 4 PPD tuberculosis Argentina, 5 PPD aviar Argentina, 6 PPA *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* comercial, 7 soma bacteriano de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* hervido, 8 y 9 PPD preparado a partir de *Mycobacterium phlei* en distintas concentraciones.

6. Comportamiento de los antígenos utilizando el área bajo la curva

Comparación del Area Bajo la Curva

Resultados de ELISA utilizando los distintos antígenos obtenidos, comparados con el antígeno comercial PPA utilizando el área bajo la curva.

Figura 10: ELISA-PPA vs. Medio Líquido

VARIABLE 1 = Elisa-PPA
VARIABLE 2 = Medio Líquido

GRUPO POSITIVO = Cultivo=1
Tamaño de la muestra = 31
GRUPO NEGATIVO = Cultivo=0
Tamaño de la muestra = 17

Curva de ROC para Elisa
Area bajo la curva del ROC = 0,772
Error estándar = 0,067
95% Intervalo de confianza = 0.628 a 0.881

Curva de ROC para medio líquido ML
Area bajo la curva del ROC = 0,857
Error estándar = 0,063
95% de Intervalo de confianza = 0,725 a 0,941

Diferencia entre las áreas = 0,084
Error estándar = 0,086
95% intervalo de confianza = -0,083 a 0,252
Significancia: P = 0,324

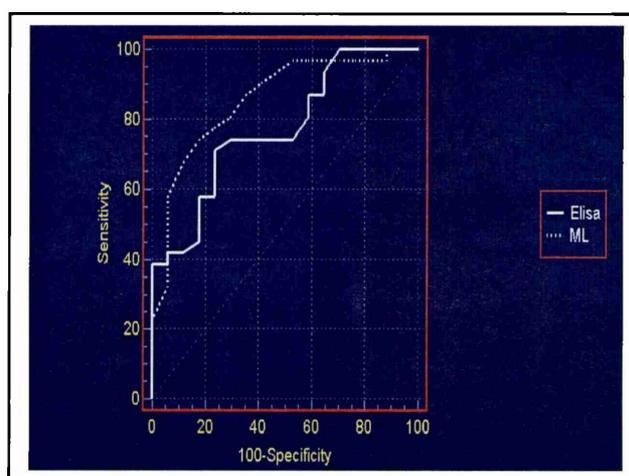


Figura 11: ELISA-PPA vs. Proteína-Ptbc

VARIABLE 1 = Elisa-PPA
 VARIABLE 2 = Proteína-Ptbc

GRUPO POSITIVO = Cultivo=1
 Tamaño de la muestra = 31
 GRUPO NEGATIVO = Cultivo=0
 Tamaño de la muestra = 17

Curva de ROC para Elisa
 Area bajo la curva del ROC = 0,772
 Error estándar = 0,067
 95% intervalo de confianza = 0,628 a 0,881

Curva ROC para Proteína
 Area bajo la curva del ROC = 0,666
 Error estándar = 0,085
 95% intervalo de confianza = 0,515 a 0,795

Diferencia entre las áreas = 0,106
 Error estándar = 0,094
 95% intervalo de confianza = -0,078 a 0,290
 Significancia P = 0,258

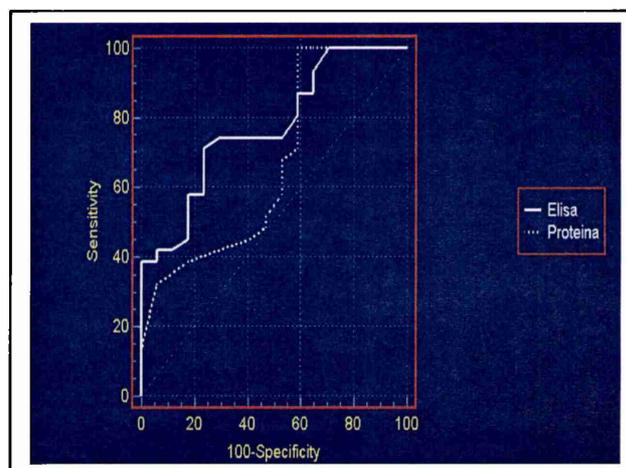


Figura 12: ELISA-PPA vs. ELISA-Antígeno hervido

VARIABLE 1 = Elisa-PPA
 VARIABLE 2 = A.hervido

GRUPO POSITIVO = Cultivo=1
 Tamaño de la muestra= 31
 GRUPO NEGATIVO= Cultivo=0
 Tamaño de la muestra= 17

Curva de ROC para Elisa-PPA
 Area bajo la curva del ROC= 0,772
 Error estándar= 0,067
 95% intervalo de confianza= 0,628 a 0,881

Curva ROC para A.hervido
 Area bajo la curva del ROC= 0,762
 Error estándar= 0,069
 95% intervalo de confianza= 0,617 a 0,873

Diferencia entre las áreas= 0,010
 Error estándar= 0,089
 95% intervalo de confianza= -0,165 a 0,186
 Significancia P = 0,907

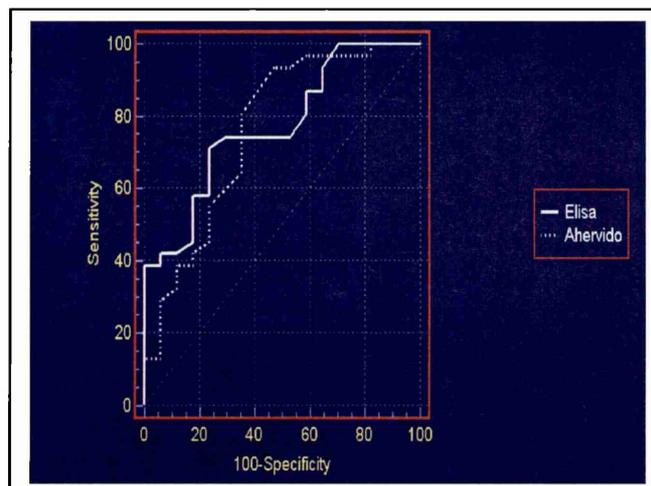


Figura 13: ELISA-PPA vs. Proteína-aviar

VARIABLE 1 = Elisa-PPA
 VARIABLE 2 = Proteína-aviar

GRUPO POSITIVO= Cultivo=1
 Tamaño de la muestra= 31
 GRUPO NEGATIVO= Cultivo=0
 Tamaño de la muestra= 17

Curva de ROC para Elisa-PPA
 Area bajo la curva del ROC= 0,772
 Error estándar= 0,067
 95% intervalo de confianza= 0,628 a 0,881

Curva de ROC para proteína-Aviar
 Area bajo la curva del ROC= 0,578
 Error estándar= 0,085
 95% intervalo de confianza= 0,427 a 0,719

Diferencia entre las áreas= 0,194
 Error estándar= 0,070
 95% intervalo de confianza= 0,057 a 0,332
 Significancia P = 0,006

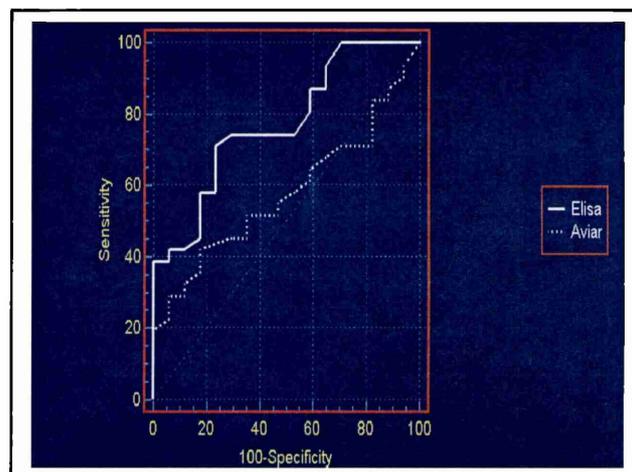


Figura 14: ELISA-PPA vs. Medio líquido aviar

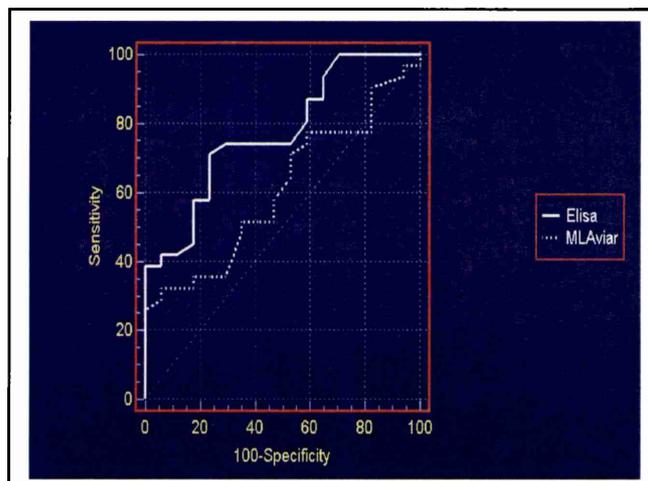
VARIABLE 1 = Elisa-PPA
 VARIABLE 2 = Medio Líquido-Aviar

GRUPO POSITIVO= Cultivo=1
 Tamaño de la muestra= 31
 GRUPO NEGATIVO= Cultivo=0
 Tamaño de la muestra= 17

Curva ROC para Elisa-PPA
 Area bajo la curva del ROC= 0,772
 Error estándar= 0,067
 95% intervalo de confianza= 0,628 a 0,881

Curva ROC para Medio Líquido-Aviar
 Area bajo la curva del ROC = 0,607
 Error estándar= 0,084
 95% intervalo de confianza= 0,456 a 0,745

Diferencia entre las áreas= 0,165
 Error estándar= 0,070
 95% intervalo de confianza= 0,028 a 0,302
 Significancia P = 0,018



Discusión y conclusiones

Discusión:

El diagnóstico de la paratuberculosis bovina es complejo lo cual dificulta tomar acciones efectivas para su control. Al ser una enfermedad que no tiene tratamiento ni vacunas aprobadas la única forma de detener su avance es identificando los animales infectados, eliminarlos del rodeo para evitar su progreso (44) y reemplazarlos por animales libres de la enfermedad (120).

Los animales con signos clínicos son los más accesibles al diagnóstico. Los enfermos subclínicos son los que requieren de la mayor sensibilidad diagnóstica, sobre todo aquellos animales que ya están eliminando micobacterias por materia fecal infectando a su descendencia, en forma insidiosa y sin ser advertido (156).

Cuando con el fin de obtener la mayor sensibilidad posible se aplican varias pruebas diagnósticas en un rodeo infectado, los resultados se deben analizar tomando en cuenta la progresión inmunológica de la enfermedad y el tipo de inmunidad que detecta el test en cuestión. Con el objetivo de conocer el comportamiento del ELISA-PPA para su desarrollo, se compararon los resultados de distintas técnicas en 150 animales adultos en un rodeo infectado con paratuberculosis. En la tabla N: 1 se encuentran resumidos los resultados de las pruebas. Por la presencia de numerosas bacterias contaminantes no fue posible disponer de los resultados del cultivo de materia fecal, por lo tanto los resultados se compararon en forma relativa a las pruebas entre sí y no en forma absoluta como hubiera sido posible con los resultados de los cultivos. Para analizar los resultados, debemos tomar en cuenta las variaciones inmunológicas producidas en las infecciones micobacterianas, la primera inmunidad que reacciona es la inmunidad celular, en la medida que esta declina le sigue la inmunidad humoral. En el caso de paratuberculosis esta progresión se continúa con eliminación de micobacterias por la materia fecal y la aparición de los signos clínicos (Fig 1). La inmunidad celular es la encargada de controlar la infección, a la inmunidad humoral no se le conocen efectos de protección y su detección es un signo ominoso de enfermedad. En la tabla 1 se pueden apreciar los primeros tres animales con resultados positivos solo a ELISA (tabla:1, animales 154, 103 y 18). Esta positividad a ELISA y reactividad negativa a las

pruebas que miden inmunidad celular podría estar relacionada a una etapa de anergia celular. La detección de anticuerpos sería un indicio de alta carga bacteriana y posible eliminación de abundantes bacterias por materia fecal, también tienen alta probabilidad de tener signología clínica o encontrarse próximos a desarrollarla, esos casos son los primeros que deberíamos eliminar porque representan el mayor peligro para los más jóvenes, a través de los cuales, la enfermedad se transmite con mayor eficiencia. Cuando se comparan los dos ELISA entre sí (tabla 6) se encuentran diferencias significativas entre ellos, estas diferencias se pueden deber a la composición del antígeno, del absorbente y del conjugado no especificados en el caso del kit comercial del ELISA-CSL. Los siguientes tres animales (tabla 1, animales 157, 90 y 98) reaccionaron a pruebas que detectan inmunidad celular y humoral, incluso dos de ellos reaccionaron a todas las pruebas (tabla 1, N: 157 y 90); es probable que estos animales se encuentren en una etapa de transición entre la inmunidad humoral y celular, que estén eliminando menor cantidad de micobacterias por materia fecal y con signología ausente o episódica. La comparación entre las pruebas de ELISA con PPD-Aviar y con la prueba de interferón gamma dan diferencias significativas (tablas 2, 3, 4, y 7), es el comportamiento esperado para pruebas que detectan distintos estadios inmunológicos (9). Otros 12 animales reaccionaron a las pruebas que detectan inmunidad celular, de estos uno (tabla 1, animal 186) resultó positivo a las dos pruebas que detectan inmunidad celular (tuberculina e interferón gamma); otro (tabla 1, animal 15) sólo reaccionó a la prueba de interferón gamma y los 10 restantes sólo reaccionaron a la PPD-Aviar. Podemos suponer que estos 12 animales se encuentran en la primera fase de la respuesta inmune, sin signos clínicos y con escasa o nula eliminación de micobacterias por materia fecal (etapa de inmunidad celular); por lo tanto no presentan anticuerpos detectables. Si tomamos como referencia a la prueba de interferón gamma, las diferencias significativas que se observan al compararla con la PPD-Aviar (tabla 5) se podrían deber a un elevado número de falsos positivos. Dentro de los mismos podríamos tener animales que han contactado con enfermos ya en su vida adulta y que por no ser susceptibles en ese periodo nunca desarrollarán signos clínicos. En cuanto a la prueba de interferón gamma, 4 animales dieron resultado positivo. Para la detección del interferón gamma se extrae la muestra de sangre con anticoagulante y se la debe procesar dentro de las 8 horas de extraída, de otro modo perderemos sensibilidad en la medida en que disminuya la

viabilidad de los linfocitos. En el laboratorio se detecta con una prueba de ELISA sándwich la producción de Interferón gamma por parte de los linfocitos cuando son estimulados con PPD-aviar, es una prueba costosa, sin embargo nos permite medir la inmunidad celular sin tener que volver al campo como ocurre con la tuberculina. Debemos tener en cuenta que la mayor parte de la literatura considera a la reacción de PPD en paratuberculosis poco sensible y específica como para ser incluida en un programa de control (18, 44, 99, 140). Con respecto a las fallas en la sensibilidad, esto es aparición de falsos negativos, se invocan varios argumentos que permitirían explicarla. Como la inmunidad celular es la primera que aparece es la que primero deberíamos buscar para diagnosticar a la enfermedad en los primeros estadios y así adelantarnos a la aparición de los signos clínicos y a la eliminación de bacterias por materia fecal (62). Las formas en que podemos detectar esta inmunidad *in vivo* son a través de las pruebas intradérmicas e *in vitro* por la proliferación de linfocitos, prueba superada más recientemente por la de interferón gamma (9, 111, 160). La falta de sensibilidad (elevado número de resultados falsos negativos) también tiene que ver con la progresión natural de la enfermedad y con la inmunopatología (Fig 1). La tuberculina es una expresión de la hipersensibilidad de tipo retardada y es directamente proporcional a la necrosis caseosa (otra expresión de la hipersensibilidad de tipo retardada) y como ya fue consignado en la paratuberculosis bovina la necrosis caseosa es prácticamente inexistente (23). La escasa expresión de esta hipersensibilidad se perderá en el transcurso de la enfermedad cuando el animal entre en anergia celular; este podría haber sido el caso de los cuatro animales negativos a la PPD. Esta situación es completamente distinta a la que se presenta en la tuberculosis bovina en donde sí hay necrosis caseosa y la tuberculina es una prueba que permite controlar la enfermedad (39). La falta de especificidad (elevado número de resultados falsos positivos) podría tener lugar en la reacción de animales adultos (animales con alta resistencia a la infección) expuestos a altas cargas bacterianas. Estos animales podrían sensibilizarse, incluso reaccionarían los animales resistentes y aquellos que posiblemente han superado la infección, también se puede dar en animales infectados con otras micobacterias. De la figura 1 se desprende que el mejor momento para utilizar una prueba de PPD es cuando el animal es joven probablemente hasta los 15 a 24 meses. De la misma forma el ELISA se recomienda utilizarlo desde los 24 meses en adelante. Además debemos tomar en cuenta que en

paratuberculosis los animales se infectan en los primeros meses de vida, por lo tanto cualquier reacción de hipersensibilidad retardada en este momento podría ser muy significativa (77, 78). Cuando se analiza la sensibilidad y especificidad de una prueba diagnóstica se deben tomar en cuenta todos los estadios de la enfermedad. Si en paratuberculosis utilizamos la reacción de PPD en todos los estadios seguramente tendremos muchos reaccionantes falsos positivos (problemas de especificidad) y falsos negativos (problema de sensibilidad) (fig 2). Por el contrario si aplicamos la prueba en animales jóvenes aumentaremos el número de reacciones negativas verdaderas (mayor especificidad). La interpretación de estos resultados es que al no estar sensibilizados no han tenido contacto con la micobacteria y en la medida que transcurre el tiempo los animales son progresivamente más resistentes a la infección. También se podría mejorar la especificidad utilizando formas antigénicas más específicas pero por el momento el uso de PPD proveniente de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* (johnina) no ofrece ventajas cuando se la compara con PPD-aviar (8). Por otro lado los que reaccionan a esta edad probablemente sean reacciones positivas verdaderas (mayor sensibilidad) porque si los animales han sido expuestos a la micobacteria a esta edad estarán con altas probabilidades de contraer la infección, otra forma de mejorar la sensibilidad es realizar la inoculación en la tabla del cuello, ya que está comprobado que este lugar es más sensible que el pliegue anocaudal (39, 135). También se podría mejorar la sensibilidad aplicando una segunda inoculación en el mismo lugar en donde se realizó la primera inoculación y realizar la lectura transcurridas 24 horas de la última aplicación; a esta reacción se la conoce como prueba de Stormont (10, 33).

Lo anterior nos sirve para analizar los estudios planteados en el ítem 2 y realizados en 44 animales menores de 15 meses inoculados con PPD aviar y analizados con ELISA. En la tabla 8 se resumen todos los animales que presentaron reacciones palpables, en la primera inoculación (prueba tuberculínica simple) del lado derecho del animal, reaccionaron sólo 2 animales con más de 3 mm (tabla 8 ISD, animales número: 263 y 266), cuando se aplicó la segunda inoculación (en el mismo lugar de la primera aplicación pero 8 días más tarde: prueba de Stormont) los reaccionantes incrementaron la intensidad de la reacción y 3 animales más reaccionaron con 4 o >4 mm (tabla 8 SD, animales número: 283, 257, 286, 263 y 266). El mismo procedimiento se realizó 28 días más tarde, esta vez utilizando la tabla del cuello

izquierda para evitar los problemas de desensibilización local (68) producidas por las primeras inoculaciones. Cuando se leyeron los resultados de la primera inoculación, 5 animales tenían resultados positivos más de 3 mm (tabla 8 ISI, animales número: 263, 283, 266, 275 y 281) y 10 animales reaccionaron a la segunda inoculación con 4 o > 4 mm (tabla 8 SI, animales número: 263, 283, 257, 286, 265, 274, 277, 290, 292 y 294). La segunda inoculación incrementó en forma sensible los animales reaccionantes a la tuberculina. De acuerdo a las conclusiones de Larsen (70) cuando más veces se repita la reacción positiva a lo largo del tiempo, mayor es la probabilidad de que el animal se encuentre infectado. Si bien las inoculaciones repetidas con PPD no sensibilizarían a los animales a reacciones posteriores a la tuberculina (inmunidad celular) (70), sí podrían tener efectos en la inmunidad humoral. Al respecto podríamos considerar que la forma usual de utilizar la tuberculina (PPD) se basa en la respuesta a la inoculación intradérmica a la tuberculina midiendo el engrosamiento en el sitio de inoculación 96 horas después (90, 96), una diferencia igual o mayor a 3 mm se considera positiva. Otros parámetros que han merecido el interés de investigadores son, por ejemplo, los cambios clínicos y hematológicos producidos por la administración endovenosa de la tuberculina (59, 64) y, entre otros, la variación de la temperatura después de su aplicación endovenosa (60, 61, 84). Tomando en cuenta esto último podría resultar útil analizar los efectos en la inmunidad humoral. Cuando Vardaman (148) utilizó la prueba de fijación de complemento para detectar anticuerpos contra la tuberculosis bovina después de aplicar johnina y tuberculina bovina en rodeos negativos a tuberculosis y paratuberculosis, no se observaron variaciones en los títulos de los animales testeados semanalmente durante un mes. Utilizando la misma prueba pero esta vez en animales enfermos Benedictus (7), expresa que un porcentaje elevado de animales paratuberculosos pasó de ser negativo a positivo a la fijación de complemento 2 a 4 semanas después de la aplicación de PPD en forma endovenosa.

Por lo expresado anteriormente, junto con la aplicación de la tuberculina en estos 44 animales también se tomaron muestras de suero sanguíneo para ser analizados con la técnica de ELISA. Para analizar los resultados de la prueba de ELISA se compararon las densidades ópticas crudas, de animales reactivos a la tuberculina y no reactivos. En la tabla 9 se resumen los resultados del ELISA expresados en densidades ópticas crudas y las diferencias pre y pos

inoculación de los animales que reaccionaron con 4 o >4 mm a la prueba de Stormont del lado derecho de la tabla del cuello. Se observaron diferencias estadísticas significativas en los primeros 8 días pos inoculación ELISA0 vs ELISA1 P: 0,02 (tabla 9), diferencias que se mantuvieron en los sangrados posteriores ELISA0 vs ELISA2 P: 0.037 y ELISA0 vs ELISA3 (tabla 9). En los animales del grupo 1 formado por los negativos a la prueba de Stormont del lado derecho de la tabla del cuello no se observaron diferencias significativas en las primeras 2 inoculaciones ELISA0 vs ELISA1 P: 0,58 y ELISA0 vs ELISA2 P: 0,12 (tabla 10), pero sí cuando se inocularon 4 veces ELISA0 vs ELISA3 P: 0.019 (tabla 10). El incremento de las densidades ópticas entre los animales del grupo 1, puede estar indicando que las repeticiones de las pruebas intradérmicas generan una respuesta humoral que no se condice con la presencia de la enfermedad. Las respuestas serológicas parecen ser más específicas cuando las inoculaciones no se repiten. También es probable que el tiempo necesario para detectar la máxima respuesta serológica específica pos inoculación se pueda extender más de 8 días. El cultivo de materia fecal en esta categoría de animales es de escaso valor por ser muy jóvenes, probablemente de estar infectados no están eliminando micobacterias por materia fecal o están comenzando a eliminar cantidades no detectables, para llegar a conclusiones más consistentes se debería esperar la progresión natural de la enfermedad, en aquellos animales enfermos, como para ser detectados por el cultivo de materia fecal. El uso de la PPD y la prueba de ELISA en animales menores de 15 meses requiere de mayores investigaciones para comprobar si un protocolo adecuado es factible de ser aplicado en una categoría de animales de por sí difícil de diagnosticar pero de mucho valor para lograr el control de la enfermedad.

El cultivo de materia fecal es considerado como la prueba de oro en la paratuberculosis bovina, las demás pruebas diagnósticas deberían estar referidas al cultivo (18). La especificidad del cultivo de materia fecal es del 100% y siguiendo protocolos detallados se puede lograr una sensibilidad del 50% (27).

De 192 animales cultivados se obtuvieron 31 animales positivos (16%) (Fig 3): en 16 animales (8%) se contaban de 1 a 20 colonias por cada tubo, en 8 animales (4%) se contaban de 20 a 50 colonias por cada tubo y en los restantes 7 animales (4%) se contaban más de 50 a 100 colonias por tubo (Fig 4); esto nos está dando una graduación (156) en cuanto al número de colonias detectadas. Los animales con mayor número de colonias son los animales que

están eliminando muchas bacterias en sus heces, la mayoría, son serológicamente positivos y presentan signología clínica. Al estar eliminando un gran número de micobacterias son animales con lesiones tipo lepromatosas (muchos macrófagos y células gigantes) (23) con macrófagos pletóricos de micobacterias (pluribacilares). Esta oferta de micobacterias también genera oferta antigénica y presentan densidades ópticas altas al ELISA con el antígeno comercial de PPA. Para determinar la sensibilidad y especificidad del ELISA-PPA se compararon sus resultados con los del cultivo de materia fecal utilizando las características de la curva operador receptor ROC, expresando los resultados del ELISA-PPA en porcentajes del suero control positivo (162). La eficiencia de los antígenos evaluados se comparó con las áreas bajo la curva. El antígeno que mejor detecta los animales positivos al cultivo es el PPA con una sensibilidad del 38,7% (similar al de otros autores) (37) y una especificidad del 95,7%; tomando como punto de corte el 48% (en relación al suero testigo positivo). De los 31 sueros positivos (tabla 11: a+c) 12 sueros (tabla 11: a) dieron resultado positivo al ELISA la mayoría son animales que tienen más de 100 colonias por tubo son eliminadores muy activos de bacterias por materia fecal, tienen alta carga bacteriana y anticuerpos elevados (figura 4 animales con 20, 50 y >50 colonias por tubo). De los 19 animales que quedaron por debajo del punto de corte (tabla 11: c) la mayoría son escasos eliminadores de bacterias por materia fecal (figura 4 animales con 1-20 colonias por tubo), como tienen poca carga bacteriana son negativos al ELISA. Los demás antígenos preparados en este trabajo no lograron la misma eficacia (figuras 10, 11, 12, 13, 14), para los casos de los antígenos provenientes del medio de cultivo líquido sin procesar (figura 10) proteína del medio líquido precipitada con ácido tricloroacético (figura 11) y antígeno somático hervido (figura 12) provenientes de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* las áreas bajo la curva no presentaban diferencias significativas. Las diferencias significativas observadas en el medio líquido sin procesar y en la proteína de medio líquido precipitada con ácido tricloroacético provenientes de *Mycobacterium avium* subsp *avium* son diferentes en favor al ELISA-PPA. Estos resultados pueden tener su explicación en la forma en que se obtienen los antígenos, ya que la forma de preparación y la pureza con que se obtienen tienen directa relación con la capacidad de los antígenos para capturar los anticuerpos en la placa de ELISA (32, 44). Otra explicación se puede encontrar en la escasa cantidad de proteína que se obtuvo a partir de las proteínas

liberadas en los medios de cultivo líquidos como lo demuestran las corridas electroforéticas en gel de poliacrilamida (Fig 8, 9). El antígeno de PPA es el que presenta la mayor cantidad de proteína; en las preparaciones de antígeno en las que se utilizó el ácido tricloracético para precipitar proteínas del medio líquido se obtuvo poca cantidad. Como el procedimiento es el mismo que se usa para obtener proteína pura derivada (PPD) para uso diagnóstico se comparan preparados comerciales de distinta procedencia (Fig 9, calles 2, 3, 4 y 5). En trabajos previos se identificaron antígenos celulares y extracelulares utilizando carbono o azufre marcado radiactivamente (141, 155), permitiendo detectar cantidades ínfimas de proteínas, estos trabajos además hacen referencia al tiempo de incubación, en la medida en que este se prolonga las proteínas cambian en su composición (139). Generalmente hay dos formas de obtener el antígeno de PPA, uno de ellos es someter la masa bacteriana a altas presiones en una prensa y el otro es sonicar el soma bacteriano. En ambos el método es seguido por centrifugación y precipitación con sulfato de amonio (86, 163). Con estas formas de obtener antígenos la cantidad y calidad es superior a la utilizada en este trabajo, como lo demuestran las corridas electroforéticas (Fig 8, 9). La resistencia que ofrecen las micobacterias cuando se quiere obtener antígenos puede tener su origen en la pared bacteriana la cual, a diferencia de otras bacterias Gram positivas esta compuesta no solo de peptidoglicanos sino también de numerosos glicolípidos. Esta inusual cantidad de lípidos de las micobacterias (10% del peso húmedo) (112) es la responsable de la resistencia a la coloración, del tiempo que necesitan para crecer *in vitro* y de las enfermedades crónicas que generalmente producen. De la misma forma la bacteria se resiste a ser procesada por el sistema inmune (20), por esta razón es que podría resultar interesante encontrar antígenos que al ser liberados al medio (antígenos extracelulares o solubles) se procesen antes que el soma bacteriano como ocurre con los antígenos constitutivos (antígenos intracelulares), los cuales requieren del procesamiento antigénico por parte de la célula presentadora de antígenos. Los antígenos liberados podrían contactar directamente con las células B y generar inmunidad humoral en forma más rápida. Esta hipótesis no se pudo comprobar en este trabajo, las causas pueden deberse: a que no tenga lugar, a que la cantidad y calidad de los antígenos no sea la adecuada o a que la expresión de los antígenos solo ocurra en el interior del hospedador bajo determinadas condiciones. Entre las densidades ópticas que sobrepasaron el punto de corte del ROC, hubo 4 sueros que dieron

positivo al ELISA y negativo al cultivo (tabla 11 b= falsos positivos), estas reacciones serológicas se consideran inespecíficas cuando se las compara con el cultivo. Estas reacciones pueden deberse entre otras causas a reacciones cruzadas inespecíficas o a animales positivos que fueron omitidos por el cultivo. Las reacciones serológicas inespecíficas en el ELISA, se pueden reducir absorbiendo el suero a testear con *Mycobacterium phlei* previamente a la realización de la prueba (32, 86, 163, 165,166, 167), esta absorción deja sin efecto muchos anticuerpos de reacción cruzada a excepción de los animales con tuberculosis o con *Mycobacterium avium* subsp *avium* (72, 99). En este trabajo se utilizó esta técnica, pero como en el rodeo testeado no se realizaron pruebas intradérmicas para descartar tuberculosis estas reacciones también se podrían deber a esta enfermedad. El cultivo de materia fecal se considera con una especificidad de 100 % (18, 157) dado a que *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* se puede diferenciar de *Mycobacterium avium* subsp *avium* por la dependencia de micobactina y el tiempo de crecimiento (18).

Una forma de asegurar la identificación exacta de las cepas aisladas, es utilizando pruebas de genética molecular. Estas pruebas se pueden utilizar directamente de la muestra clínica o de las colonias aisladas (44). Los problemas que surgen de realizar estas pruebas directamente en las muestras clínicas es la presencia de inhibidores de la polimerasa en las muestras de materia fecal (44). Como se puede apreciar en la Figura 6, cuando se realizó la prueba de PCR a partir de la materia fecal de un ovino positivo al aislamiento de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*, la prueba dio resultado negativo (25), la misma prueba realizada en la mucosa del ovino infectado resultó positiva, el mismo resultado positivo se obtuvo a partir del aislamiento del caso ovino y de 2 cepas aisladas de vacunos. La prueba de PCR utiliza la secuencia de inserción IS900 específica de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* la cual nos permite diferenciarla de las otras dos subespecies (i.e. *Mycobacterium avium* subsp *avium* , *Mycobacterium avium* subsp *silvaticum*) y de otras especies de micobacterias (126). Sin embargo con la prueba de PCR no podemos obtener información sobre las diferencias entre las cepas. Para diferenciar las distintas cepas de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* aisladas se puede utilizar el análisis de los polimorfismos de los fragmentos de restricción (RFLP) (126). En la fig 7 se pueden apreciar diferencias en los patrones de RFLP, cuando se utilizó esta prueba en la cepa ovina y en las 2 cepas aisladas de bovinos. La

cepa ovina presenta el patrón I 2 (Intermediate 2) y las cepas bovinas el patrón C13 (Cattle 13). Las denominaciones de los patrones provienen de los estudios de Collins (24), este investigador según sus observaciones fundamentó las bases en la denominación de distintos patrones según la especie de procedencia: grupos ovinos denominados con la letra S (sheep group), grupos bovinos denominados con la letra C (cattle group) y grupos intermediarios entre los bovinos y ovinos denominados con la letra I (intermediate group). Más tarde Pavlik (102) continuando el trabajo de Collins (24) agrega números a cada grupo a partir de donde se derivan las denominaciones del presente trabajo. Las diferencias genéticas observadas en los patrones de RFLP, se reflejaron en diferencias fenotípicas ya que para el caso de la cepa ovina, el crecimiento se produjo solo en medios de cultivos de Löwenstein-Jensen con micobactina de acuerdo a lo descrito por Juste (3, 51) pero no en el medio de Herrold (83) utilizado en las cepas vacunas. Otra diferencia fenotípica fue el tiempo de incubación de 6 a 8 meses para el caso de la cepa ovina a diferencia de los 3 a 4 meses para el caso de las cepas de origen bovino. Las cantidades de muestras analizadas no nos permiten realizar valoraciones que tengan implicancia epidemiológica, sí podemos afirmar que en Argentina existen por lo menos dos patrones distintos de RFLP en paratuberculosis, para el caso bovino es similar a patrones publicados previamente (91). Se requeriría analizar un mayor número de cepas y utilizar los dos medios de cultivos en las dos especies para conocer si existen infecciones cruzadas como las describe Verna (150) al encontrar patrones vacunos en ciervos y cepas con características fenotípicas similares a las vacunas en cabras.

Conclusiones:

El ELISA presenta su mayor eficiencia en animales mayores a los dos años.

La prueba de PPD presenta su mayor utilidad en los animales menores a los dos años.

Se observa una modificación en las densidades ópticas obtenidas con el el ELISA-PPA después de aplicar la PPD en animales menores a los dos años.

La prueba de interferón gamma permite testear la inmunidad celular, pero su aplicación se debe coordinar con el laboratorio por sus limitaciones operativas.

El ELISA utilizando el antígeno de PPA presenta una sensibilidad del 38% y una especificidad del 97%.

Los demás antígenos probados no lograron superar al antígeno PPA.

El cultivo de materia fecal es el método diagnóstico más sensible de los probados.

La prueba de PCR identificó al agente causal en forma rápida cuando se aplicó a las cepas aisladas y en muestras de mucosa pero no en las muestras de materia fecal.

La prueba de RFLP permitió diferenciar cepas de origen ovino de las bovinas.

Bibliografía

1. **ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. (1995) *Inmunología Celular y Molecular*. 2ªed. Ed: Interamericana McGraw-Hill. pp: 4-14.**
2. **ABOU-ZEID, C.H.; RATLIFF, T.L.; WIKER, H.G.; HARBOE, M.; BENNEDSEN, J.; ROOK, G.A.W. (1988) Characterization of Fibronectin-Binding Antigens Released by *Mycobacterium bovis* BCG. *Infection and Immunity* 56: 3046-3051.**
3. **ADÚRIZ, J.J.; JUSTE, R.A.; CORTABARRIA, N. (1995) Lack of mycobactin dependence of mycobacteria isolated on middlebrook 7H11 from clinical cases of ovine paratuberculosis. *Vet Microbiol* 45: 211-217.**
4. **AMADO, A. (1990) Improved medium for Growth of *Mycobacterium paratuberculosis* The Paratuberculosis Newsletter 2: 9-10.**
5. **BECH-NEELSEN, S.; BURIANEK, L.L.; SPANGLER, E.; HEIDER, E.L.; HOFFSIS, G.F.; DORN, R.C. (1985) Characterization of *Mycobacterium paratuberculosis* antigenic proteins. *Am J Vet Res* 46: 2418-2420.**
6. **BECH-NIELSEN, S.; JORGENSEN, J.B.; AHRENS, P.; FELD, N.C. (1992) Diagnostic Accuracy of a *Mycobacterium phlei*-Absorbed Serum Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Bovine Paratuberculosis in Dairy Cows. *J of Clin Microbiol* 30: 613-618.**
7. **BENEDICTUS, G.; and BOSMA, J. (1985) The intravenous administration of johnin in the diagnosis of paratuberculosis in practice. *The veterinary Quarterly* 2: 139-145.**

8. **BERNARDELLI, A.; NADER, A. (1992) Diagnóstico de Paratuberculosis Bovina con Tuberculina Aviar o Johnina. Vet Arg 9: 164-168.**
9. **BILLMAN-JACOB, H.; CARRIGAN, M.; COCKRAM, F.; CORNER, L.A.; GILL, I.J.; HILL, J.F.; JESSEP, T.; MILNER, A.R.; WOOD, P.R. (1992) A comparison of the interferon gamma assay with the absorbed ELISA for the diagnosis of John's disease in cattle. Aust Vet Journ 69: 25-28.**
10. **BLOOD, D.C.; and RADOSTITS, O.M. (1992) Medicina Veterinaria Septima Edición eds Interamericana. pp: 768.**
11. **BRAUN, R.K.; BUERGELT, C.D.; LITTELL, R.C.; LINDA, S.B.; SIMPSON, J.R. (1990) Use of an enzyme-linked immunosorbent assay to estimate prevalence of paratuberculosis in cattle of Florida. J of the Am Med Assoc 196: 1251-1254.**
12. **BROOKS, B.W.; YOUNG, N.M.; WATSON, D.C.; ROBERTSON, R.H.; SUGDEN, E.A.; NIELSEN, K.H.; BECKER, S.A.W.E. (1991) *Mycobacterium paratuberculosis* Antigen D: Characterization and Evidence That It is a Bacterioferritin J of Clin Microbiol 29: 1652-1658.**
13. **BURRELLS, C.; CLARKE, C.J.; COLSTON, A.; KAY, J.M.; PORTER, J.; LITTLE, D.; SHARP, J.M. (1998) A study of immunological responses of sheep clinically-affected with paratuberculosis (John's disease). The relationship of blood, mesenteric lymph node and intestinal lymphocyte responses to gross and microscopic pathology, Vet immunol and Immunopathol 68: 343-358.**
14. **BUTLER, J.E. (1994) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in Immunochemistry Eds. van Oss CJ and van Regenmortel MHV.**

15. BUTLER, J.E. (2000) Solid Supports in Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Other Solid-Phase Immunoassays. *Methods* 22: 4-23.
16. CAMPHAUSEN, R. T.; JONES, R. L.; BRENNAN, P. J. (1988) Antigenic relationship between *Mycobacterium paratuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Am J Vet Res* 49: 1307-1310.
17. CHIODINI, R. (1993) The History of Paratuberculosis (Jhone's disease): a review of the literature 1895 to 1992. The International Association for Paratuberculosis, Inc eds. pp I-III
18. CHIODINI, R.; VAN KRUNINGEN, H.J.; MERKAL, R.S. (1984) Ruminant paratuberculosis (Johne's disease) The current status and future prospects. *Cornell Vet* 74: 218-262.
19. CHIODINI, R.; VAN KRUNINGEN, H.J.; THAYER, W.R.; COUTU, A. (1986). Spheroplastic Phase of Mycobacterial Isolated from Patients with Crohn's Disease. *J of Clin Microbiol* 24: 357-363.
20. CHIODINI, R.J. (1996) Immunology: Resistance to Paratuberculosis. *Vet Clin of North Am: Food Animal Practice* 12: 313-343.
21. CICUTA, M.E.; BOEHRINGER, S.I.; ROIBON, W.R.; BERNARDELLI, A.; BAKOS, E.; BENITEZ, M.C.; KUNERT, J.A.; ARAGON L.R. (1995) Paratuberculosis in cattle and sheep of the North East of Argentina. *The Paratuberculosis Newsletter* 7: 18-23.
22. CLARKE, C. (1994) Host responses to *Mycobacterium paratuberculosis*/*M. avium* infection Proceedings of the Fourth International Colloquium on Paratuberculosis UK July 17-21: 345-365.

23. CLARKE, C.J. (1997) The Pathology and Pathogenesis of Paratuberculosis in Ruminants and Other Species. *J Comp Path* 116: 217-261.
24. COLLINS, D.M.; GABRIC, D.M.; DE LISLE, G.W. (1990) Identification of Two Groups of *Mycobacterium paratuberculosis* Strains by Restriction Endonuclease Analysis and DNA Hybridization. *J of Clin Microbiol* 28: 1591-1596.
25. COLLINS, D.M.; STEPHENS, D.; DE LISLE, G.W. (1993) Comparison of polymerase chain reaction tests and fecal culture for detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine faeces. *Veterinary Microbiology* 36: 289-299.
26. COLLINS, M.T. (1994) Clinical approach to control of bovine paratuberculosis. *JAVMA* 204: 208-210.
27. COLLINS, M.T. (1996) Diagnosis of paratuberculosis. *Vet Clin of North Am Food Animal Practice* 12:357-371.
28. COLLINS, M.T.; AND MORGAN, I.R. (1991) Economic decision analysis model of a paratuberculosis test and cull program. *JAVMA* 199: 1724-1729.
29. COLLINS, M.T.; ANGULO, A.; BUERGELT, C.D.; HENNAGER, S.G.; HIETALA, S.K.; JACOBSON, R.H.; WHIPPLE, D.L.; WHITLOCK, R.H. (1993) Reproducibility of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for bovine paratuberculosis among eight laboratories. *J Vet Diagn Invest* 5: 52-55.
30. COLLINS, M.T.; HOIBY, N.; JORGENSEN, J.B.; BERCOVIER, H.; LAMBRECHT, R.S.; JORGENSEN, E. (1991) Crossed immunoelectrophoretic analysis of *Mycobacterium paratuberculosis*. *APMIS* 99: 83-92.

31. COLLINS, M.T.; SOCKETT, D.C.; RIDGE, S.; COX, J.C. (1991) Evaluation of a Commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Johne's Disease. *J of Clin Microbiol* 29: 272-276.
32. COX, J.C.; DRANE, D.P.; JONES, S.L.; RIDGE, S.; MILNER, A.R. (1991) Development and evaluation of a rapid absorbed enzyme immunoassay test for the diagnosis of Johne's disease in cattle. *Australian Veterinary Journal* 68: 157-160.
33. DE HONG, H.; EXDAHL, M.O. (1969) Evaluation of a number of ancillary tuberculin tests in cattle. *N Zeal Vet J* 17: 213-226.
34. DE KESEL, M.; GILOT, P.; COENE, M.; COCITO, C. (1992) Composition and Immunological Properties of the Protein Fraction of A36, a Major Antigen Complex of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Scand J Immunol* 36: 201-212.
35. DIMARELI-MALLI, Z.; SARRIS, K.; PAPADOPOULOS, O.; ILIADIS, N.; XENOS, G.; MINAS, A.; PAPADOPOULOS, G. (1997) Evaluation of an inactivated whole cell experimental vaccine against paratuberculosis in sheep and goats. *The Paratuberculosis Newsletter* 9: 10-17.
36. EAMENS, G.J.; WHITTINGTON, R.J.; MARSH, I.B.; TURNER, M.J.; SAUNDERS, V.; KEMSLEY, P.D.; RAYWARD, D. (2000) Comparative sensitivity of various faecal culture methods and ELISA in dairy cattle herds with endemic Johne's disease. *Vet microbiol* 77: 357-367.
37. ENGLUND, S.; BALLAGI-PORDÁNY, A.; BÖLSKE; JOHANSSON, K.E. (1999). Single PCR and Nested PCR with a Mimic Molecule for Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Diag Microbiol Infec Dis* 33: 163-171.

38. FEOLA, R.P.; COLLINS, M.T. AND CZUPRYNSKI, C.J. (1999) Hormonal modulation of phagocytosis and intracellular growth of *Mycobacterium avium* ss. *Paratuberculosis* in bovine peripheral blood monocytes. *Microbial Pathogenesis* 26: 1-11.
39. FRANCIS, J.; SEILER, R.J.; WILKIE, I.W.; O'BOYLE, D.; LUMSDEN, M.J.; FROST, A.J. (1978) The sensitivity and specificity of various tuberculin tests using bovine PPD and other tuberculins. *The Vet Record* 4: 420-425.
40. GILOT, P.; DE KESEL, M.; COENE, M. (1993) Analysis of two thermostable antigenic complexes from *Mycobacterium paratuberculosis* and their use in the development of specific tests for paratuberculosis. *The Paratuberculosis Newsletter* 5: 44-45.
41. GILOT, P.; DE KESEL, M.; COENE, M.; COCITO, C. (1992) Induction of Cellular Immune Reactions by A36, antigen Complex of *Mycobacterium paratuberculosis*: Comparison of A36 and Johnin Components. *Scand J Immunol* 36: 811-821.
42. GODFREY, H.P. (1993) T cell fibronectin and mycobacterial adversarial strategy. *Int J Clin Lab Res* 23: 121-123.
43. GUNNARSSON, E.; FODSTAD, F.H. (1979) Analysis of Antigen in *Mycobacterium paratuberculosis*. *Acta Vet Scand* 20: 200-215.
44. HARRIS, N. B. AND BARLETTA, R.G. (2001) *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. *Clin Microbiol Review* 14: 489-512.
45. HE, ZHAO-YANG and HU, GUI-XUE. (1993) The interference of Mycobacteria from cattle to paratuberculosis allergic reaction. *The Paratuberculosis Newsletter* 5: 52-53.
46. HILBINK, F.; WEST, D.M.; DE LISLE, G.W.; KITTELBERGER, R.; HOSIE, B.D.; HUTTON, J.; COOKE, M.M.; PENROSE, M. (1994) Comparison of a complement

- fixation test, a gel diffusion test and two absorbed and unabsorbed ELISAs for the diagnosis of paratuberculosis in sheep. *Vet Microbiol* 41: 107-116.
47. HINES, M.E.; AND SNIDER, T.G. (1991) Mycobacterial glycolipid fractions inhibit activated macrophages. *Proc of the Third Int Coll on Paratuberculosis*. 355-370
48. JACOBSON, R.H. (1998) Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases. *Rev sci tech Off int Epiz* 17 (2): 469-486.
49. JARK, U.; RINGENA, I.; FRANZ, B.; GERLACH, G.F.; BEYERBACH, M.; FRANZ, B. (1997) Development of an ELISA technique for serodiagnosis of bovine paratuberculosis. *Vet Microbiol* 51: 189-198.
50. JORGE, M.C. (1988) Serological Studies on Johne's Disease in a Dairy Herd by ELISA During Three Years Period. *Proceeding of Second International Colloquium on Paratuberculosis* pp: 52-57.
51. JUSTE, R.A.; MARCO, J.C.; SAEZ DE OCARIZ, C. And ADURIZ, J.J. (1991) Comparison of different media for the isolation of small ruminant strains of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet Microbiol* 28: 385-390.
52. KALIS, C.H.J.; BENEDICTUS, G.; VAN WEERING, H.J.; FLAMAND, F.; HAAGSMA, J. (1991) Experiences with the use of an experimental vaccine in the control of paratuberculosis in The Netherlands, Chiodini, R.J. and Kreeger, J.M., Ed. *Proceedings of the Third International Colloquium on Paratuberculosis* pp: 484-494.
53. KALIS, C.H.J.; HESSELINK, J.W.; RUSSCHEN, E.W.; BARKEMA, H.W.; COLLINS, M.T.; VISSER, L.J.R. (1999) Factors influencing the isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from bovine fecal samples. *J Vet Diagn Invest* 11: 345-351.

54. KLAWONN, W.; CUBLER, K.; DRAGER, K.G.; GYRA, H.; HEB, R.G.; ZIMMER, K. (1996) Johne's disease: Evaluation of New Laboratory Tests. BCVA Edinburgh: 485-488.
55. KOETS, A.; RUTTEN, V.; HOEKA; VAN MIL, F.; MÜLLER, K.; BAKKER, D.; GRUYS, E.; VAN EDEN, W. (2002) Progressive Bovine Paratuberculosis Is Associated with Local Loss of CD⁺ T Cells, Increased Frequency of $\gamma\delta$ T Cells, and Related Changes in T-Cell Function. *Infec and Immun* 70: 3856-3864.
56. KOETS, A.P.; ADUGNA, G.; JANSSE, L.L.G.; VAN WEERING, H.J.; KALIS, C.H.J.; WENTINK, G.H.; RUTTEN, V.P.M.G.; AND SCHUKKEN, Y.H. (2000) Genetic Variation of Susceptibility to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* . *Infection in Dairy Cattle. J Dairy Sci* 83: 2702-2708.
57. KOETS, A.P.; RUTTEN, V.P.M.G.; DE BOER, M.; BAKKER, D.; VALENTIN-WEIGAND, P.; VAN EDEN, W. (2001) Differential Changes in Heat Shock Protein-, Lipoarabinomannan-, and Purified Protein Derivative-Specific Immunoglobulin G1 and G2 Isotype Responses during Bovine *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Infection. *Infec and Immun* 69: 1492-1298.
58. KOETS, A.P.; RUTTEN, V.P.M.G.; HOEK, A.; BAKKER, D.; VAN ZIJDERVELD.; MULLER, K.E.; VAN EDEN, W. (1999) Heat-shock protein-specific T-cell responses in various stages of bovine paratuberculosis. *Vet Immun and Immunophat* 70: 105-115.
59. KOPECKY, K.E.; BOOTH, G.D.; MERKAL, R.S.; LARSEN, A.B. (1971) Hematologic Changes Associated with Intravenous Johnin Testing Cattle. *Am J vet Res* 32: 1343-1347.
60. KOPECKY, K.E.; LARSEN, A.B. (1975) Intravenous johnin and Tuberculin Tests in Cattle Vaccinated with *Mycobacterium paratuberculosis* Cells and Subsequently Inoculated with *Mycobacterium bovis*. *Am J vet Res* 36: 113-116.

61. KOPECKY, K.E.; LARSEN, A.B.; PACKER, R.A. (1968) Evaluation of an Intravenous Tuberculin Test in Cattle. *Am J vet Res* 29: 31-38.
62. KORMENDY, B. (1988) Diagnostic value of mammalian, avian and Johnin PPD tuberculins in cattle herds infected by *Mycobacterium paratuberculosis*. *Acta Vet Hung* 36: 177-183.
63. KORMENDY, B. (1994) The effect of vaccination on the prevalence of paratuberculosis in large dairy herds. *Vet. Microbiol* 41: 117-125.
64. KORMENDY, B.; TUBOLY, S.; NAGY, G.Y.; TOROK, J.; ABONYI, T. (1990) Diagnostic Value of Intravenously Administered Johnin Purified Protein Derivative (PPD) in Bovine Paratuberculosis. *Acta Veterinaria Hungarica* 38: 43-53.
65. KRAMSKY, J.A.; MILLER, D.S.; HOPE, A.; COLLINS, M.T. (2000) Modification of a bovine ELISA to detect camelid antibodies to *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet Microbiol* 77: 333-337.
66. LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
67. LANGELAAR, M.; KOETS, A.; MÜLLER, K.; VAN EDEN, W.; NOORDHUIZEN, J.; HOWARD, C.; HOPE, J.; RUTTEN, V. (2002) *Mycobacterium paratuberculosis* heat shock protein 70 as a tool in control of paratuberculosis. *Vet Immun and Immunopath* 87: 239-244.
68. LARSEN, A.B.; JOHNSON, H.W. (1949) Studies on Johnin. 7. Frequency of Intradermal Testing as Related to Local Desensitization. *Am J Vet Res* 10: 344-346.

69. LARSEN, A.B.; VARDAMAN, T.H.; HARVEY, W.R. (1960) Tuberculin Reaction Size as Related to the number of Simultaneous Tuberculin Injections. *Am J Vet Res* 21: 1075-1077.
70. LARSEN, A.B.; VARDAMAN, T.H.; MERKAL, R.S. (1963) An Extended Study of a Herd of Cattle Naturally Infected with Johne's Disease. 1. The Significant of the Intradermic Johnin Test. *Am J Vet Res* 24: 91-93.
71. LISBY, G.; ANDERSEN, J.; ENGBAEK, K.; BINDER. (1994) *Mycobacterium paratuberculosis* in Intestinal Tissue from Patients with Crohn's Disease Demonstrated by a Nested Primer Polymerase Chain Reaction. *Scand J Gastroenterol* 29: 923-929.
72. LOPEZ, B.; RITTACCO, IN.; KANTOR, R.; DEBENEDETTI, R.; NADER, A.; AND BERNARDELLI, A. (1990) Evaluation of an ELISA for the serodiagnosis of bovine paratuberculosis. *The Paratuberculosis Newsletter* 2: 5-6.
73. LOWRIE, D.B.; ANDREW, P.W. (1988) Macrophage antimycobacterial mechanisms. *Brit Med Bull* 44: 624-634.
74. MASONE, A.R.; ITAGAKI, S.; KUNIO, D.; and GIMENO, E.J. (1991) Lectin histochemical Study on Normal and Paratuberculosis-Affected Bovine Ileum. *J Vet Med Sci* 53: 761-763.
75. MASONE, A.R.; MARTIN, A.A.; IBARGOYEN, G.S. and GIMENO E.J. (1990) Immunohistochemical Methods for the Visualization of *Mycobacterium paratuberculosis* in Bovine Tissues. *J Vet Med B* 37: 251-253.
76. MASONE, A.R.; MARTIN, A.A.; IBARGOYEN, G.S. and GIMENO E.J. (1991) Demonstration of *Mycobacterium paratuberculosis* in Tissue Sections: Comparative Studies of Histological and Immunohistochemical Methods. *Isr J Vet Med* 46: 48-50.

77. McDONALD, W.L.; RIDGE, S.E.; HOPE, A.F.; CONDRON, R.J. (1999) Detection of *Mycobacterium paratuberculosis* infected calves: Application of an absorbed enzyme immunoassay, bovine γ -interferon test, fecal culture and western blot. 270-279.
78. McDONALD, W.L.; RIDGE, S.E.; HOPE, A.F.; CONDRON, R.J. (1999) Evaluation of diagnostic tests for Johne's disease in young cattle. *Aust Vet J* 77: 113-119.
79. McNAB, W.B.; MEEK, A.H.; DUNCAN, J.R.; BROOKS, B.W.; VAN DREUMEL, A.A.; MARTIN, S.W.; NIELSEN, K.H.; SUGDEN, E.A.; TURCOTTE, C. (1991) An Evaluation of Selected Screening Tests for Bovine Paratuberculosis. *Can J Vet Res* 55: 252-259.
80. McNAB, W.B.; MEEK, A.H.; MARTIN, S.W.; DUNCAN, J.R. (1991) Associations between lipoarabinomannan enzyme-immuno-assay test results for paratuberculosis and farm-management factors. *Prev Vet Medi* 13: 39-51.
81. McNAB, W.B.; MEEK, A.H.; MARTIN, S.W.; DUNCAN, J.R. (1991) Association between Dairy Production Indices and Lipoarabinomannan Enzyme-immunoassay Results for Paratuberculosis. *Can J Vet Res* 55: 356-361.
82. MERKAL, R.S. (1984) Paratuberculosis: Advances in cultural, serologic, and vaccination methods. *JAVMA* 184: 939-943.
83. MERKAL, R.S. AND CURRAN, B.J. (1974) Growth and Metabolic Characteristics of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Applied Microbiology* 28: 276-279.
84. MERKAL, R.S.; LEPPER, A.W.D.; HINTZ, A.M.; RILEY, J.L. (1977) Comparison of Techniques for Measuring the Local and Systemic Responses to Tuberculin in Cattle. *Am J Vet Res* 38: 113-116.

85. MERKAL, R.S.; MCCULLOUGH, W.G.; TAKAYAMA, K. (1981) *Mycobactins The State of Art. Bull Inst Pasteur* 79: 251-260.
86. MILNER, A.R.; LEPPER, A.W.D.; SYMONDS, W.N.; GRUNER, E. (1987) Analysis by ELISA and Western blotting of antibody reactivities in cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis* after absorption of serum with *M. phlei*. *Rese in Vet Sci* 42: 140-144.
87. MILNER, A.R.; MACK, W.N.; COATES, K.J.; HILL, J.; GILL, I.; SHELDRIK, P. (1990) The sensitivity and specificity of a modified ELISA for the diagnosis of Johne's disease from a field trial in cattle. *Vet Micro* 25: 193-198.
88. MIMS, C.; PLAYFAIR, J.; ROITT, I.; WAKELIN, D.; WILLIAMS, R. (1999) *Microbiología Médica 2ªed.* Ed: Harcourt Brace. Mosby. pp: 47-79.
89. MOMONTANI, E.; WHIPPLE, D.L.; THIERMANN, A.B.; CHEVILLE, N.F. (1988) Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer patches in calves. *Vet Pathol* 25: 131-137.
90. MONAGHAN, M.L.; DOHERTY, M.L.; COLLINS, J.D.; KAZDA, J.F.; QINN, P.J. (1994) The tuberculin test. *Vet Microbiol* 40: 111-124.
91. MOREIRA, A.R.; PAOLICCHI, F.; MORSELLA, C.; ZUMARRAGA, M.; CATALDI, A.; BIGI, F.; ALITO, A.; OVERDIUM, P.; VAN SOOLINGEN, D.; ROMANO, M.I. (1999) Distribution of *IS900* restriction fragment length polymorphism types among animal *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from Argentina and Europe. *Veterinary Microbiology* 70: 251-259.

92. MOREIRA, A.R.; SPATH, E.J.A.; MORSELLA, C. (1994) Seroprevalence of Johne's disease in eleven districts of Buenos Aires, Argentina. *The Paratuberculosis Newsletter* 6:18.
93. MORRISON, N.E. (1965) Circumvention of the Mycobactin Requirement of *Mycobacterium paratuberculosis*. *J of Bacteriol* 89: 762-767.
94. MUTHARIA, L.M.; MORENO, W.; RAYMOND, M. (1997) Analysis of Culture Filtrate and Cell Wall-Associated Antigens of *Mycobacterium paratuberculosis* with Monoclonal Antibodies. *Infec and Immun* 65: 387-394.
95. MUTWIRL, G.J.; BUTTLER, D.G.; ROSENDAL, S. and WOODWAR, D. (1992) Experimental infection of severe combined immunodeficient beige mice with *Mycobacterium paratuberculosis* of bovine origin. *Infect Immun* 60: 4074-4079.
96. NADER, A.; BERNARDELLI, A. (1986) Utilizacion de un Test Tuberculínico Intradérmico Comparativo en ovinos como prueba de screening en paratuberculosis. *Rev Med Vet* 67: 335-338.
97. NAUTA, M.J.; VAN DER GIESSEN, (1998) Human exposure to *Mycobacterium paratuberculosis* via pasteurised milk: A modelling approach. *The Vet Record* 143: 293-296.
98. NIELSEN, S.S.; ENEVOLDSEN, C.; GRÖHN, Y.T. (2002) The *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* ELISA response by parity and stage of lactation. *Prev Vet Med* 54: 1-10.
99. OLSEN, I.; SIGUROARDOTTIR, O.G.; AND DJONNE, B. (2002) Paratuberculosis with special reference to cattle A review. *Veterinary Quartely* 24 (1): 12-28.

100. OLSEN, I; REITAN, L.J.; WIKER, H.G. (2000) Distinct Differences in Repertoires of Low-Molecular-Mass Secreted Antigens of *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 38: 4453-4458.
101. PAOLICCHI, F.A.; VAGNOZZI, A.; MORSELLA, C.G.; VERNA, A.E.; MASSONE, A.R.; PORTIANSKY, E.L.; GIMENO, E.J. (2001) Paratuberculosis in Red Deer (*Cervus elaphus*) an Immunohistochemical Study. *J Vet Med B* 48: 313-320.
102. PAOLICCHI, F; Morsella, C; Verna, A; SPATH, E; MARTINIS, D; ZUMARRAGA, M; GIOFREE, A; CATALDI, A AND ROMANO, M (2002) Diagnosis, epidemiology, and Program of control of Paratuberculosis in bovine herds of Argentina. 7th International Colloquium on Paratuberculosis. S7. P1(114): 132.
103. PAVLIK, I; HORVATHOVA, A; DVORSKA, L; SVASTOVA, P; DU MAINE, R; FIXA, B; RYCHLIK, I (1999) Homogeneity/Heterogeneity of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Strains: Correlation Between RFLP-Type and Source (Animal, Environment Human). Proceedings of the Sixth International Colloquium on Paratuberculosis pp: 321-329.
104. PEREZ, V.; TELLECHEA, J.; CORPA, J.M.; GUTIERREZ, M.; GARCIA MARIN, J.F. (1999) Relation between pathologic findings and cellular immune responses in sheep with acquired paratuberculosis. *Am J Vet Res* 60: 123-127.
105. RATLIFF, T.L.; MCGARR, J.A.; ABOU-ZEID, C.H.; ROOK, A.W.; STANFORD, J.L.; ASLANZADEH, J.; BROWN, E.J. (1988) Attachment of Mycobacteria to Fibronectin-coated Surfaces. *J of General Microb* 134: 1307-1313.
106. REBESKI, D.R.; WINGER, E.M.; SHIN, Y.K.; LELENTA, M.; ROBINSON, M.M.; VARECKA, R.; CROWTHER, J.R. (1999) Identification of unacceptable background caused by non-specific protein absorption to the plastic surface of 96-well immunoassay

- plates using a standardized enzyme-linked immunosorbent assay procedure. *J of Immun Meth* 226: 85-92.
107. REICHEL, M.P.; KITTELBERGER, R.; MEYNELL, R.M.; GWÓZDZ, J.M.; MARSHALL, D.J.; WHITTINGTON, R.; COE, A.; COUSINS, D. (1999) Analysis of the antibody Response by ELISA and Immunoblot in Sheep Infected with *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*. Proceedings of the Sixth International Colloquium on Paratuberculosis pp: 604-614.
108. REICHEL, M.P.; KITTELBERGER, R.; PENROSE, M.E.; MEYNELL, R.M.; COUSINS, D.; TREVOR, E.; MUTHARIA, L.M.; SUGDEN, E.A.; JOHNS, A.H.; DE LISLE, G.W. (1999) Comparison of serological tests and faecal culture for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle and analysis of the antigens involved. *Vet Microbiol* 66: 135-150.
109. RIDGE, S.E.; MORGAN, I.R.; SOCKETT, D.C.; COLLINS, M.T.; CONDRON, R.J.; SKILBECK, N.W.; WEBBER, J.J. (1991) Comparison of the Johne's absorbed EIA and the complement-fixation test for the diagnosis of Johne's disease in cattle. *Aust Vet J* 68: 253-257.
110. ROSENBUSCH, F. (1937) La enfermedad de Johne o enteritis paratuberculosa del bovino en la Argentina. *Anales de la Sociedad Rural Argentina* 5: 475-480.
111. ROTHEL, J.S.; JONES, S.L.; CORNER, L.A.; COX, J.C.; WOOD, P.R. (1990) A Sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon- γ and its use for the detection of tuberculosis in cattle. *Aust Vet J* 67: 134-137.
112. SALYERS, A.A.; AND WHITT D.D. (1994) *Bacterial Pathogenesis a Molecular Approach*. ASM Press, pp: 311.

113. SCHRIJVER, R.S.; KRAMPS, J.A. (1998) Critical factors affecting the diagnostic reliability of enzyme-linked immunosorbent assays formats. *Rev sci tech Off int Epiz* 17 (2): 550-561.
114. SHERMAN, D.M.; BRAY, B.; GAY, J.M.; BATES, F. (1989) Evaluation of the agar gel immunodiffusion test for diagnosis of subclinical paratuberculosis in cattle. *Am J Vet Res* 50: 525-530.
115. SHERMAN, D.M.; GAY, J.M.; BOULEY, D.S.; NELSON, G.H. (1990) Comparison of the complement-fixation and agar gel immunodiffusion tests for diagnosis of subclinical bovine paratuberculosis. *Am J Vet Res* 50: 461-465.
116. SHERMAN, D.M.; MARKHAM, R.J.F.; BATES, F. (1984) Agar gel immunodifusion test for diagnosis of clinical paratuberculosis in cattle. *JAVM* 185: 179-182.
117. SIKES, D. (1953) Sensitivity Studies with Repeated Intradermal Johnin Tests in Cattle Naturally Infected with *Mycobacterium paratuberculosis* (Johne's Disease). *Am J Vet Res* 12-15.
118. SINGH, S.N.; MADDUX, R.L.; KADEL, W.L. (1991) Comparative evaluation of conventional sedimentation versus new double incubation culture method for the isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples. Chiodini, R.J. and Kreeger, J.M., Ed. *Proceedings of the Third International Colloquium on Paratuberculosis* pp: 84-92.
119. SNOW, G.A. (1970) Mycobactins: Iron-Chelating Growth Factors from Mycobacteria. *Bacteriol Review* 34: 99-125.
120. SOCKETT, D. (1995) *Mycobacterium paratuberculosis*-Free herd Replacements. *The Paratuberculosis Newsletter* 7: 28-29.

121. SOCKETT, D.C.; CONRAD, T.A.; THOMAS, C.R.; COLLINS, M.T. (1992) Evaluation of Four Serological Tests for Bovine Paratuberculosis. *J of Clin Microbiol* 30: 1134-1139.
122. SPANGLER, E.; BECH-NIELSEN, S. AND HEIDER, L.E. (1992) Diagnostic performance of two serologic tests and fecal culture for subclinical paratuberculosis, and associations with production. *Prev Vet Med* 13: 185-195.
123. SPANGLER, E.; BECH-NIELSEN, S.; HEIDER, L.E.; DORN, C.R. (1992) Interpretation of an enzyme-linked immunosorbent test using different cut-offs between positive and negative samples for diagnosis of paratuberculosis. *Prev Vet Med* 13: 197-204.
124. SPANGLER, E.; LAWRENCE, E.H.; BECH-NIELSEN, S. (1991) Serologic enzyme-linked immunosorbent assay responses of calves vaccinated with a killed *Mycobacterium paratuberculosis* vaccine. *Am Vet Res* 52: 1197-1200.
125. STABEL, J.R. (1997) An improved method for cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples and comparison to three other methods. *J Vet Diagn Invest* 9: 375-380.
126. STEVENSON K. AND SHARP J.M. (1997) The Contribution of Molecular Biology to *Mycobacterium avium* Subspecies *Paratuberculosis* Research. *The Veterinary Journal* 153: 269-286.
127. SUGDEN, E. A. (1997) Serodiagnosis of *Mycobacterium paratuberculosis* infections in cattle using lipoarabinomannan in an absorbed enzyme linked immunosorbent assay. *The Paratuberculosis Newsletter* 9: 8-9.

128. SUGDEN, E.A.; SAMAGH, B.S.; BUNDLE, D.R.; DUNCAN, J.R. (1987) Lipoarabinomannan and Lipid-Free Arabinomannan Antigens of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Infection and Immunity* 55: 762-770.
129. SWEENEY, R.W. (1996) Transmission of paratuberculosis, *Vet Clin of North Am: Food Animal Practice* 12: 305-311.
130. SWEENEY, R.W.; WHITLOCK, R.H.; BUCKLEY, C.L.; SPENCER, P.; ROSENBERGER, A.E.; LAWRENCE, B.S.; HUTCHINSON, L.J. (1994) Diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle, using enzyme-linked immunosorbent assay for detection in antibodies against *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. *Am J Vet Res* 55: 905-909.
131. SWEENEY, R.W.; WHITLOCK, R.H.; BUCKLEY, C.L.; SPENCER, P.A. (1995) Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle. *J Vet Diagn Invest* 7: 488-493.
132. SWEENEY, R.W.; WHITLOCK, R.H.; ROSENBERGER, A. E. (1992) *Mycobacterium paratuberculosis* isolated from fetuses of cows not manifesting signs of the disease. *Am. J. of Vet. Res* 53: 477-480.
133. SWEENEY, R.W.; WHITLOCK, R.H.; ROSENBERGER, A. E., (1992) *Mycobacterium paratuberculosis* Cultured from milk and Supramammary Lymph Nodes of Infected Asymptomatic Cows. *J of Clin Microbiol* 30: 166-171.
134. THOEN, C.O. AND HAAGSMA, J. (1996) Molecular techniques in the diagnosis and control of paratuberculosis in cattle. *JAVMA* 209: 734-737.
135. THURSTON, J.R.; LARSEN, A.B.; LEHMANN, R.P. (1966) Intradermic Tuberculin Tests of Cattle aturally Sensitieve to Johnin: Reactions to Simultaneous Innoculations of Two Tuberculin Concentrations. *Am J Vet Res* 27: 541-547.

136. TIZARD, I (1989) *Inmunología Veterinaria*. 3ªed. Ed: Interamericana. pp: 134.
137. TIZARD, M.L.V.; MOSS, M.T.; SANDERSON, J.D.; HERMON-TYLOR, J. (1991) IS900, the p43 protein and *Mycobacterium paratuberculosis*. Chiodini, R.J. and Kreeger, J.M., Ed. *Proceedings of the Third International Colloquium on Paratuberculosis* pp: 246-253.
138. TSAI, S.J.; HUTCHINSON, L.; ZARKOWER, A. (1989) Comparison of Dot Immunobinding Assay, Enzyme-linked Immunosorbent Assay and Immunodiffusion for Serodiagnosis of Paratuberculosis. *Can J Vet Res* 53: 405-410.
139. TURCOTTE, R.; DESORMEAUX, Y. (1972) Influence of the age of mycobacterial cultures on the protein and carbohydrate composition of tuberculins. *Can J Microbiol* 18: 637-645.
140. VALENTIN-WEIGAND, P.; GOETHE, R. (1999) Pathogenesis of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infections in ruminants: still more questions than answers. *Microbes and Infections* 1: 1121-1127.
141. VALENTIN-WEIGAND, P.; MORIARTY, K.M. (1992) *Mycobacterium paratuberculosis* binds fibronectin. *Res Microbiol* 143: 75-79.
142. VALENTIN-WEIGAND, P.; MORIARTY, K.M. (1992) Protein Antigens Secreted by *Mycobacterium paratuberculosis* *J Vet Med B* 39: 762-766.
143. VALENTIN-WEIGAND, P.; MURRAY, C.; MORIARTY, K. (1991) Antibody reactivities of *Mycobacterium paratuberculosis* infected sheep as analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay and Western blotting. *FEMS Microbiol Letters* 78: 145-148.

144. VAN BOXTEL, R.M.; LAMBRECHT, R.S.; COLLINS, M.T. (1990) Effect of polyoxyethylene sorbate compounds (Tween) on colonial morphology, growth, and ultrastructure of *Mycobacterium paratuberculosis*. *APMIS* 98 (10): 901-908.
145. VAN EMBDEN, J.D.A.; CAVE, D.; CRAWFORD, J.T.; DALE, J.W.; EISENACH, K.D.; GICQUEL, B.; HERMANS, P.W.M.; MARTIN, C.; MC ADAM, R.; SHINNICK, T.M.; SMALL, P. (1993) Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 31: 406-409.
146. VAN SOOLINGEN, D.; HERMAN P.W.M.; DE HASS, P.E.W.; SOLL, D.R.; VAN EMBDEN, J.D.A. (1991) The occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains evaluations of IS-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 29: 2578-2585.
147. VAN WEERING, H.J.; BREUKINK, H.J.; VAN DER GIESSEN, J.; HAAGSMA, J.; KALIS, C.H.J.; DE LANGE, D.; SNOEP, J.J.; DE VRIES, G.; WENTINK, G.H. (1995) Intermediate report on the vaccination of Johne's disease in the Netherlands. *The Paratuberculosis Newsletter* 7: 4-8.
148. VARDAMAN, T.H. AND LARSEN, A.B. (1966) Effect of Intradermal Johnin and Tuberculin Testing on the Complement-Fixation Test for Bovine Tuberculosis *Am J Vet Res* 27: 545-547.
149. VARY, P.H.; ANDERSEN, P.R.; GREEN, E.; HERMON-TAYLOR, J.; MCFADDEN, J.J. (1990) Use of Highly Specific DNA Probes and Polymerase Chain Reaction To Detect *Mycobacterium paratuberculosis* in Johne's Disease. *J of Clin Microbiol* 28: 933-937.

150. VERNA, A.E.; MORSELLA, C.; PAOLICCHI, F.; CASARO, A. (2000) Characterization of infection by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Red Deer (*Cervus elaphus*) by serological, bacteriological, and molecular biological tests. The Paratuberculosis Newsletter 12: 26-29.
151. WALL, S.; KUNZE, Z.M.; SABOOR, S.; SOUFLERI, I.; SEECHURN, P.; CHIODINI, R. AND McFADDEN, J.J. (1993) Identification of Spheroplast-Like Agents Isolated from Tissues of Patients with Crohn's Disease and Control Tissues by Polymerase Chain Reaction. J of Clin Microbiol 31: 1241-1245.
152. WENTINK, G.H.; BONGERS, J.H.; ZEEUWEN, A.A.P.A. (1991) Skin test for jhonin after vaccination against paratuberculosis: Relationship with post mortem findings. Chiodini, R.J. and Kreeger, J.M., Ed. Proceedings of the Third International Colloquium on Paratuberculosis pp: 499-503.
153. WHIPPLE, D.L. (1991) Laboratory diagnosis of paratuberculosis. Chiodini, R.J. and Kreeger, J.M., Ed. Proceedings of the Third International Colloquium on Paratuberculosis pp: 523-528.
154. WHIPPLE, D.L.; CALLIHAN, D.R.; JARNAGIN, J.L. (1991) Cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal specimens and a suggested standardized procedure. J Vet Diagn Invest 3: 368-373.
155. WHITE, W.B.; WHIPPLE, D.L.; STABEL, J.R.; BOLIN, C.A. (1994) Comparison of cellular and extracellular proteins expressed by various isolates of *Mycobacterium paratuberculosis* and other mycobacterial species. Am J Vet Res 55: 1399-1405.
156. WHITLOCK, R.H.; BUERGELT, C. (1996) Preclinical and Clinical Manifestations of Paratuberculosis (Including Pathology). Vet Clin of North Am: Food Animal Practice 12: 345-355.

157. WHITLOCK, R.H.; ROSENBERGER, A.E.; SWEENEY, R.W.; HUTCHINSON, L.J. (1991) Culture techniques and media constituents for the isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples. Chiodini, R.J. and Kreeger, J.M., Ed. Proceedings of the Third International Colloquium on Paratuberculosis pp: 94-111.
158. WHITTINGTON, R.J.; MARSH, I.; MCALLISTER, S.; TURNER, M.J.; MARSHALL, D.J.; and FRASER, C.A. (1999) Evaluation of Modified BACTEC 12 B Radiometric medium and Solid Media for Culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from Sheep. J of Clin Microbiol 37: 1077-1083.
159. WHITTINGTON, R.J.; REDDACLIFF, L.; MARSH, I.; SAUNDERS, V. (1999) Detection of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in formalin-fixed paraffin-embedded intestinal tissue by IS900 polymerase chain reaction. Aust Vet J 77: 392-397.
160. WOOD, P.R.; CORNER, L.A.; PLACKETT, P. (1990) Development of a simple, rapid in vitro cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of γ interferon. Rese in Vet Sci 49: 46-49.
161. WRAY, B.; BOULIKAS, T.; WRAY, V.P.; AND HANCOCK, R. (1981) Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. Anal Biochem 118: 197-203.
162. WRIGHT, P.F.; TOUNKARA, K.; LELENTA, M.; JEGGO, M.H. (1997) International -reference standards: antibody standards for the indirect enzyme-linked immunosorbent assay. Rev sci tech Off int Epizz. 16: 824-832.
163. YOKOMIZO, Y. (1986) Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Using *Mycobacterium phlei* Absorbed Serum for the Diagnosis of Bovine paratuberculosis in a Field Study. JARQ 20: 60-67.

164. YOKOMIZO, Y.; HIRAMUNE, T.; ISAYAMA, Y. (1970) Antibodies Produced in a Cow Naturally Infected with Johne's Disease. *Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart* 10: 137-142.
165. YOKOMIZO, Y.; KISHIMA, M.; MORI, Y.; NISHIMORI, K. (1991) Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in Comparison with Complement Fixation Test for the Diagnosis of Subclinical Paratuberculosis in Cattle. *J Vet Med Sci* 53: 577-584.
166. YOKOMIZO, Y.; MERKAL, R.S.; LYLE, P.A.S. (1983) Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine immunoglobulin G1 antibody to a protoplasmatic antigen of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am J Vet Res* 44: 2205-2207.
167. YOKOMIZO, Y.; YUGI, H.; MERKAL, R.S. (1984) A method for Avoiding False-Positive Reactions in an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the Diagnosis of Bovine Paratuberculosis. *Jpn J Vet Sci* 47: 111-119.
168. YOUNG, D.B. (1988) Structure of mycobacterial antigens. *Brit Medical Bull* 44: 562-583.
169. ZIMMER, K.; DRAGER, G.K.; KLAWONN, W.; HESS, R.G. (1999) Contribution to the Diagnosis of Johne's Disease in Cattle. Comparative Studies on the Validity of Ziehl Neelsen Staining , Faecal Culture and a Commercially Available DNA-Probe Test in Detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in Faeces from Cattle. *J Vet Med B* 46: 137-140.