



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de DOCTORA EN CIENCIAS VETERINARIAS

**Implementación de un medio de cultivo líquido en el diagnóstico
de paratuberculosis bovina**

Médica Veterinaria ROMERO, Magali Andrea.

DIRECTOR: TRAVERÍA, Gabriel Eduardo.

CODIRECTOR: SANTANGELO, María de la Paz.

LUGAR DE TRABAJO: Centro de Diagnóstico e Investigaciones Veterinarias
(CEDIVE), Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP.

MIEMBROS DEL JURADO:

PAOLICCHI, Fernando Alberto.

GIACOBONI, Gabriela.

ROMANO, María Isabel.

AÑO 2019

*En honor a estos tres pibes... Que me enseñaron a jamás bajar los
brazos...*



AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todos aquellos que han puesto su granito de arena para que pueda llegar hasta aquí completando uno de los trabajos más difíciles de mi vida. Tengo la suerte de poder decir que son muchísimas las personas e instituciones, así que espero no olvidarme de mencionar a nadie.

Primero quiero agradecer a mi querida Universidad Nacional de La Plata -por siempre pública y no remunerada- gracias a la cual obtuve mi título de grado, y en la cual estoy terminando dos posgrados, uno de ellos con este manuscrito. Agradecer también a todos los docentes y no docentes de la Facultad de Ciencias Veterinarias, sin los cuales no habría llegado a donde estoy.

A todos los docentes y no docentes del CEDIVE, porque todos han colaborado en mayor o menor medida para que este trabajo se complete; en este sentido quiero hacer un especial agradecimiento al equipo de trabajo de parasitología: al Dr. Romero quién con todo y sus “particularidades” me ha apoyado desde el inicio y a lo largo de todo el proceso; al Dr. César Pruzzo y Méd. Vet. Federico Illanes y Álvaro Niño Uribe por ayudarme a crecer en lo personal y abrirme paso en lo profesional pese a todo, siendo ellos gran parte de mi sistema de apoyo emocional. También al Méd. Vet. Luis María Peralta, por ayudarme y aguantarme, al igual que la Técnica en Laboratorio Carla Passerini.

Al grupo de trabajo del laboratorio de paratuberculosis del departamento de biotecnología de INTA Castelar, porque todos ellos me han dado una mano para poder resolver gran parte de este trabajo de tesis. En particular quiero hacer mención del Dr. Damián Moyano, quién ha sido mi mano derecha en todos los

trabajos que realicé allá, enseñándome paso a paso y con gran paciencia. También de la Dras. María Laura Mon, Alejandra Colombatti y Natalia Alonso, la Méd. Vet. Ximena Cuerda y el Lic. Natanael Griffa, todos ellos colaboradores en este trabajo y excelentes compañeros.

Quiero agradecer también a mis compañeros de las cátedras de histología en la Facultad de Ciencias Veterinarias (mi cuna docente) y en la Facultad de Ciencias Médicas, también a los que han sido o son estudiantes con los que compartimos aula, porque todos ellos me han dado un apoyo enorme en todo momento y me han alentado a seguir adelante para poder terminar este trabajo. Quiero destacar al Dr. Claudio Barbeito por ser el primero en creer en mí, allá por 2008, cuando dije que quería hacer un doctorado mientras cursaba mi primer año de la carrera de Cs. Veterinarias. Él fue el único que me dijo que yo iba a lograr lo que me propusiera si mi objetivo estaba claro. Me alegra poder darte la razón una vez más, muchas gracias. También quiero agradecer enormemente a las Dras. Laura Andrini y Mónica Diessler quienes además de ser dos de mis modelos como docentes y como personas, me han ayudado muchísimo tanto en lo profesional como en lo emocional.

Al equipo de la cátedra de bioquímica, FCV, UNLP, especialmente al Med. Vet. Javier Barberón y al Dr. Pedro Zeinsteger por la inmensa colaboración en este trabajo y el apoyo profesional y emocional. En este sentido también necesito agradecer a Paula y Miguel Risso, en especial a Paula que me ha bancado también con mis dudas estadísticas.

A Fabiana Landoni e Inés Velloso, por la paciencia, la ayuda y las recomendaciones para este trabajo.

A mis amigos, Beto Goncebat, Rodo Montenegro, Lucas y Dani Podestá, Nico Cabrera, Facu Nuñez, Seba (pincha) Serrano, Loli, Jorge, Gaby Soria, y especialmente a Sofi Martinez, Tato Ardiles, Diana Saray Moreno, Alfi Quiroga y Melisa Couselo, sin ellos no habría llegado a ningún lado.

También quiero agradecer a la comunidad salsera, por el apoyo brindado en lo que siempre será el peor momento de mi vida. En especial a Rodo Montenegro, Facundo Barneche y Joaca Sanabria. Gracias al club de la timba, por darme una forma de empezar la semana con gusto.

A mi familia, mi prometido Ignacio Javier Avalo, quien fue mi contrapeso y mi paño frío en cada intento de abandono de este trabajo, y el amor de mi vida. A nuestros hijos: Dulce, Cheddar, Watson y Crick, que absorben todo lo que me pasa y son la razón por la que sigo adelante.

A mis padres, Andrea A. Schuler y Marcelo F. Mazzuchi, quienes han hecho todo lo que estuvo a su alcance para traerme paz y fuerza para seguir. Gracias.

A mi hermana Macarena Romero, mi cuñado Santiago Maquieira, mi sobrina Estefanía Denise Correa y mi sobrino Facundo Maquieira, que estuvieron conmigo en todo momento, pese a mis ausencias.

CITAS BIBLIOGRÁFICAS CORRESPONDIENTES A LAS PUBLICACIONES
PARCIALES DEL TRABAJO DE TESIS

**Romero M, Alvarado Pinedo M, Moyano R, Peralta L, Sosa P,
Santangelo M, Travería G.**

Medio de cultivo líquido para el diagnóstico de paratuberculosis bovina. Aplicación y análisis comparativo con el medio de Herrold: resultados preliminares.

Analecta veterinaria. 2018. 38 (1): 50-55. Doi: 10.24215/15142590e025

Romero Magali; Moyano Roberto; Santangelo María de la Paz; Travería Gabriel. "Micobactina de producción nacional para utilizar en el cultivo de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*: prueba biológica preliminar" XXII Reunión Científico Técnica. Fecha: 15 ,16 y 17 de noviembre de 2018, Río Cuarto, Córdoba. Organizado por la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico (AAVLD).

Romero MA; Moyano RD; Santangelo MP; Travería GE. "Extracción de micobactina y eficiencia en medio de cultivo líquido" VII Jornadas de jóvenes investigadores, FCV, UBA. Fecha: 6, 7 y 8 de junio de 2017. Libro de resúmenes disponible en http://157.92.104.4/archivos/noticia-evento/libro_de_resumenes_JJI_2017.pdf Pág. 102.

Romero Magali; Peralta Luis; Alvarado María; Travería Gabriel. "Indicadores de crecimiento para la aproximación diagnóstica de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en medio de cultivo líquido" XXI Reunión Científico Técnica. Fecha: 6, 7 y 8 de octubre de 2016, San Salvador de Jujuy.

Organizado por la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico (AAVLD).

Romero Magali; Santangelo María; Travería Gabriel. "Uso del cultivo líquido para el desarrollo temprano de paratuberculosis" 3er Congreso Internacional Científico y Tecnológico. Fecha: 1ero de septiembre de 2016. Organizado por la Comisión de Investigaciones Científicas.

Romero Magali; Alvarado María, Di Paolo Adrián, Santangelo María, Travería Gabriel. "Uso de un medio de cultivo líquido para el desarrollo temprano de paratuberculosis". Presentación oral del trabajo en las VI Jornadas de Jóvenes investigadores. Fecha: 10 de junio 2016. Organizado por la Universidad de Buenos Aires. Resolución (CD) N° 1510/15. http://www.fvet.uba.ar/investigacion/vi_jji_libro_de_resumenes.pdf Pag.149.

Romero, Magali Andrea; Alvarado Pinedo, María Fiorella; Moyano, Roberto Damián; Santangelo, María De La Paz; Travería, Gabriel Eduardo. "Incubation time for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in liquid medium (M7H9C) from bovine clinical samples". 13th International Colloquium on paratuberculosis. P.03-1; Pág. 89. Fecha: 20 al 24 de junio 2016, Nantes, Francia.

Romero Magali; Santangelo María; Travería Gabriel. "Medio de cultivo líquido para el desarrollo temprano de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*" 2do Congreso Internacional Científico y Tecnológico. Fecha: 1ero de octubre de 2015. Organizado por la Comisión de Investigaciones Científicas.

Romero MA; Alvarado MF, Di Paolo LA; Peralta LM; Fernandez M; Moyano RD; Santangelo M; Traveria GE. “Medios de cultivo alternativos para el desarrollo de distintas micobacterias”. IX Jornadas Internacionales de Veterinaria Práctica. Fecha: 28 y 29 de agosto de 2015. Organizado por el Colegio de Veterinarios de la provincia de Buenos Aires. Mar del Plata. Buenos Aires. Argentina. Resumen disponible en <http://cvpba.org/wp-content/uploads/2015/09/16.microbiologia.pdf>

INDICE

1. <u>Título, palabras clave y resumen.....</u>	<u>1</u>
2. <u>Title, key words and abstract.....</u>	<u>3</u>
3. <u>Introducción.....</u>	<u>5</u>
3.1 <u>Generalidades y relevancia.....</u>	<u>5</u>
3.2 <u>El agente.....</u>	<u>8</u>
3.3 <u>La enfermedad.....</u>	<u>14</u>
3.4 <u>La enfermedad en humanos.....</u>	<u>16</u>
3.5 <u>Relevancia.....</u>	<u>17</u>
3.6 <u>Inmunopatogenia.....</u>	<u>22</u>
3.7 <u>Tratamiento y prevención.....</u>	<u>25</u>
3.8 <u>Diagnóstico.....</u>	<u>26</u>
3.8.1 <u>Pruebas indirectas.....</u>	<u>26</u>
3.8.1.1 <u>Diagnóstico serológico mediante técnicas de inmunodifusión en gel de agar (AGID) o ELISA indirecto</u>	<u>26</u>
3.8.1.2 <u>Diagnóstico celular.....</u>	<u>27</u>
3.8.2 <u>Pruebas directas.....</u>	<u>29</u>
3.8.2.1 <u>Necropsia (macrolesiones).....</u>	<u>29</u>
3.8.2.2 <u>Histopatología (microlesiones).....</u>	<u>31</u>
3.8.2.3 <u>Cultivo de materia fecal y coloración específica.....</u>	<u>32</u>
3.8.2.4 <u>PCR IS900.....</u>	<u>37</u>
3.9 <u>Micobactina.....</u>	<u>38</u>

3.10	<u>Hipótesis.....</u>	<u>40</u>
3.11	<u>Objetivos.....</u>	<u>40</u>
4	<u>Materiales y métodos.....</u>	<u>42</u>
	<u>Animales.....</u>	<u>42</u>
4.1	<u>Prueba preliminar del medio de cultivo líquido.....</u>	<u>44</u>
4.2	<u>Comparación de los medios de cultivo líquido y HEYM.....</u>	<u>45</u>
4.3	<u>Valoración del medio de cultivo líquido experimental.....</u>	<u>51</u>
4.4	<u>Indicadores cromógenos de crecimiento. Prueba preliminar.....</u>	<u>52</u>
4.5	<u>Elección del medio de cultivo y de la cepa micobacteriana más adecuada para la producción de micobactina nacional.....</u>	<u>53</u>
4.6	<u>Prueba biológica preliminar de las micobactinas obtenidas a partir de Maa, Ms y Mp.....</u>	<u>56</u>
4.7	<u>Extracción y purificación de micobactina nacional.....</u>	<u>57</u>
4.8	<u>Cuantificación de la micobactina nacional producida.....</u>	<u>61</u>
4.9	<u>Implementación de la micobactina nacional en el medio de cultivo líquido.....</u>	<u>64</u>
4.10	<u>Prueba de eficiencia de la micobactina nacional.....</u>	<u>66</u>
4.11	<u>Genotipificación de los aislamientos obtenidos.....</u>	<u>67</u>
5	<u>Resultados.....</u>	<u>69</u>
5.1	<u>Prueba preliminar del medio de cultivo líquido.....</u>	<u>70</u>
5.2	<u>Comparación de los medios de cultivo líquido y HEYM.....</u>	<u>71</u>
5.3	<u>Valoración del medio de cultivo líquido experimental.....</u>	<u>74</u>

5.4	<u>Indicadores cromógenos de crecimiento. Prueba preliminar.....</u>	76
5.5	<u>Elección del medio de cultivo y de la cepa micobacteriana más adecuada para la producción de micobactina nacional.....</u>	78
5.6	<u>Prueba biológica preliminar de las micobactinas obtenidas a partir de Maa, Ms y Mp.....</u>	81
5.7	<u>Extracción y purificación de micobactina nacional.....</u>	82
5.8	<u>Cuantificación de la micobactina nacional producida.....</u>	83
5.9	<u>Implementación de la micobactina nacional en el medio de cultivo líquido.....</u>	88
5.10	<u>Prueba de eficiencia de la micobactina nacional.....</u>	89
5.11	<u>Genotipificación de los aislamientos obtenidos.....</u>	91
6	<u>Discusión.....</u>	93
7	<u>Conclusiones.....</u>	104
8	<u>Referencias bibliográficas.....</u>	106
9	<u>Anexo.....</u>	126

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

US\$: dólares

\$: pesos argentinos

ADN: ácido desoxirribonucleico

AGID: inmunodifusión en gel de agar

ANOVA: análisis de varianza

AUC: área bajo la curva

BAAR: bacilo ácido – alcohol resistente

PTB: paratuberculosis

DMSO: dimetil sulfóxido

ELISA: inmuno absorción ligado a enzimas

HEYM: medio de Herrold con yema de huevo y micobactina J®

HPC: cloruro de hexadecilpiridinio

HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia

IC: intervalo de confianza

ICB: intervalo de credibilidad bayesiana

IFN γ : interferón gamma

Ig: inmunoglobulinas

IL: interleuquina

INMV: patrón de genotipo INRA Nouzilly MIRU - VNTR

INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

IS: segmento de inserción

LAMP: amplificación isotérmica mediada por bucle

Maa: *Mycobacterium avium* subsp. *avium*

Mah: *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*

Map: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

Mas: *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum*

MICE: *modelling for infectious disease center*

MIRU: unidades repetitivas intergénicas de micobacterias

MJ: micobactina J®

MN: micobactina nacional (extracto sin purificar)

Mp: *Mycobacterium phlei*

Ms: *Mycobacterium smegmatis*

OD: densidad óptica

OIE: oficina internacional de epizootias

PBA: Provincia de Buenos Aires

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PFGE: electroforesis en campo pulsado

PPDa: derivado protéico purificado de *Mycobacterium avium* subsp. *avium*

PPDb: derivado protéico purificado de *Mycobacterium bovis*

qPCR: PCR cuantitativa

REDOX: reacciones de óxido – reducción

RFLP: restricción de segmentos polimórficos largos

SENASA: servicio nacional de sanidad y calidad agroalimentaria

SSR: repetición de secuencias cortas

TBB: tuberculosis bovina

TLC: cromatografía en capa delgada

TTD: *time to detection* – tiempo hasta la detección

UV: ultravioleta

VNTR: número variable de repetición en tándem

ZN: Ziehl Neelsen

Implementación de un medio de cultivo líquido en el diagnóstico de paratuberculosis bovina

Palabras clave: paratuberculosis; diagnóstico; cultivo líquido; micobactina.

RESUMEN

La paratuberculosis bovina es una enfermedad inflamatoria intestinal crónica producida por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, un bacilo ácido – alcohol resistente que está relacionado con ciertas enfermedades en el humano. El diagnóstico es la llave para el manejo sanitario y la técnica diagnóstica de oro de esta enfermedad es el cultivo bacteriológico. El medio de cultivo más utilizado es el de Herrold con micobactina (HEYM), un medio sólido con el que se tarda entre 2 y 4 meses para dar un resultado concreto y tiene una baja sensibilidad, cercana al 50%. A pesar de que con los medios líquidos se obtienen mejores resultados, para el diagnóstico de paratuberculosis los que existen son kits comerciales importados y de alto costo.

Se implementó un medio de cultivo líquido no comercial, con Middlebrook 7H9 y yema de huevo. Se lo comparó con el HEYM y se demostró mediante la prueba de modelos latentes bayesianos una mayor sensibilidad del medio líquido (94%) sin ir en detrimento de la especificidad (92%), con un área bajo la curva de 0,93 en contraste con el área bajo la curva del HEYM, de 0,84. También se demostró una disminución significativa en el tiempo de incubación requerido para obtener un resultado positivo ($p=7,14^{-12}$) con este medio, promediando en 19 días para el líquido y 64 para el HEYM (animales clínicos). Además, se reemplazaron los

ingredientes importados, incluyendo la micobactina, logrando reducir el costo de producción de un litro de medio en más de \$7000 (129,69USD/107 Kg carne pv¹). La micobactina se extrajo a partir de *Mycobacterium avium* subsp *avium* cepa D4ER, utilizando el método de Snow y se demostró que la actividad biológica del extracto recuperado (micobactina nacional, MN) es equiparable a la micobactina J®, con una eficiencia similar y un costo de producción de 33\$ (0,57USD/0,5 Kg carne pv) /mg de MN producido.

^{1 1} Referido al precio promedio de novillo según el mercado de Liniers al 23 de agosto de 2019.
<https://www.elrural.com/mercado/novillo-arrendamiento-136001/>

Implementation of a liquid culture medium for the diagnosis of bovine paratuberculosis

KEY WORDS: paratuberculosis; diagnosis; liquid culture; mycobactin.

ABSTRACT

Bovine paratuberculosis is a chronic inflammatory intestinal disease caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, an acid-fast bacilli that is also related to some human diseases. Diagnosis is the key for the sanitary control and the gold standard for the disease is the bacteriological culture. The most commonly used culture is Herrold supplemented with egg yolk and mycobactin (HEYM). This solid medium requires an incubation time of about 2 – 4 months and has a really low sensitivity, approaching 50%. Liquid media show better results but, for the diagnosis of paratuberculosis, this are imported commercial kits with a high cost.

Noncommercial Middlebrook 7H9 with egg yolk liquid culture was implemented and compare with HEYM. Bayesian latent class model showed a greater sensitivity of liquid medium (94%) without decline the specificity (92%). The area under the curve was 0,93 for the liquid media and 0,84 for the HEYM. As well, time to detection (TTD) was significantly decreased ($p=7,14^{-12}$) averaging in 19 days in the liquid medium and 64 days in the HEYM (clinical animals). Also, the imported ingredients were replaced, including mycobactin, and the production

cost was decreased in more of AR\$7000 (129,69USD/107 Kg meat lw²). Mycobactin was extracted from *Mycobacterium avium* subsp. *avium* D4ER reference strain using the Snow technic. The extract obtained (national mycobactin, MN) show a biological activity comparable to the mycobactin J® (MJ). The efficiency of MN and MJ was similar but the cost for the production of 1 mg of MN was AR\$33 (0,57USD/0,5 Kg meat lw). Thus, the liquid culture medium reduces the cost and improves the sensitivity and diagnostic time for the implementation of the gold standard.

² Referred to the average steer price according to the Liniers market at August 23, 2019.
<https://www.elrural.com/mercado/novillo-arrendamiento-136001/>

INTRODUCCIÓN

PARATUBERCULOSIS BOVINA. GENERALIDADES Y RELEVANCIA

La paratuberculosis (PTB) bovina es una enfermedad crónica, caracterizada por una enteritis producida por *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* (Map), que resulta en un deterioro progresivo del animal enfermo causando diarreas severas, pérdida de peso y hasta la muerte. Su importancia radica en las grandes pérdidas productivas y económicas en la ganadería a nivel mundial debido a la disminución en la producción de carne y leche, a la muerte prematura de animales infectados o a la necesidad de sacrificar animales positivos (1-4). Las pérdidas económicas calculadas en el año 2007 para esta enfermedad en la Provincia de Buenos Aires fueron de U\$S 22 millones en cría bovina en la cuenca del salado y de U\$S 6,6 millones en cuencas lecheras (5). Hasta el momento no existen tratamientos ni métodos preventivos, por lo que la única forma de manejar o llevar a cabo un control de la enfermedad es mediante técnicas de manejo que consisten en diagnosticar a los animales infectados y sacarlos del rodeo.

La infección ocurre a temprana edad y la principal vía de contagio de Map es fecal-oral. La enfermedad presenta un período de incubación prolongado, lo que hace que se presenten 4 etapas de la misma, de duración variable, donde las primeras 2 son de muy difícil diagnóstico (6,7). En los periodos tempranos de la infección, los animales pueden eliminar micobacterias al medio ambiente, mucho antes de presentar síntomas clínicos; y estas bacterias pueden sobrevivir semanas o meses en el medio, infectando nuevos animales susceptibles. A medida que se produce la progresión de la infección se desarrollan los signos clínicos, que se

caracterizan por lesiones granulomatosas en el intestino, proliferación del patógeno y la transmisión de la enfermedad por medio de la eliminación del patógeno en la materia fecal, manteniendo así el ciclo de la infección, lo que a su vez lleva al debilitamiento y finalmente la muerte del animal. Debido a la dinámica que presenta esta enfermedad se sabe que los animales que presentan signos clínicos en un rodeo representan una fracción muy pequeña en relación con la cantidad real de animales infectados del lugar (6).

La técnica de oro para el diagnóstico de la enfermedad es el cultivo de materia fecal, donde se evidencia la presencia del agente causal y su viabilidad. Sin embargo, tiene limitaciones en detectar animales que aún no se encuentran en etapas avanzadas de la enfermedad. Además, en los medios de cultivo tradicionales como el medio de cultivo sólido de Herrold con yema de huevo y suplementado con micobactina (HEYM) la incubación para el desarrollo de colonias visibles demora entre 2 y 4 meses, y está estipulado que se espere hasta los 6 meses para considerar una muestra negativa (8,9). Esto dificulta la implementación de planes de control de la enfermedad debido a que es poco probable que un productor espere esos 2 a 6 meses para tomar una decisión sobre el destino de esos animales.

Sumado a esto, para que Map desarrolle en los medios de cultivo requiere de un quelante de hierro o sideróforo denominado micobactina (10,11), producido por algunas micobacterias como *Mycobacterium avium* subsp. *avium*, *M. smegmatis* y *M. phlei*, pero Map no lo produce. Es por eso que debe ser suplementada en el medio de cultivo y este es un insumo costoso, producido y comercializado por una empresa internacional y su importación lleva entre 3 a 6 meses.

Se ha demostrado que los medios de cultivo líquidos agilizan el desarrollo de los microorganismos de diversa índole, debido a que en estos medios se facilita el acceso a los nutrientes (9,12,13). En particular, para el caso del diagnóstico de paratuberculosis, se han probado con éxito ciertos medios de cultivo líquido como el BACTEC™12B® y el MIGT®, pero éstos también son costosos y deben ser importados a nuestro país. En el año 2013, Whittington describió su experiencia favorable con la utilización de un medio de cultivo líquido con yema de huevo utilizando Middlebrook M7H9 caldo® como base, y suplementado con la mitad de micobactina que el medio HEYM, esta innovación fue la que inspiró, en parte, este trabajo de tesis (14). Para confirmar la presencia de Map luego del diagnóstico por cultivo, se recomienda utilizar técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa o PCR por sus siglas en inglés (*Polymerase chain reaction*) y LAMP (*Loop-mediated isothermal amplification*). Estas técnicas son altamente específicas por detectar secuencias de inserción (IS) exclusivas de esta especie. Sin embargo, presentan la dificultad de ser altamente complejas y presentar muchas variables que pueden llevar al error en la técnica. En el caso de la PCR es necesario, además, contar con un termociclador, equipamiento de alto costo al que los laboratorios de baja complejidad muchas veces no pueden acceder. Por otro lado, el LAMP es una técnica similar a la PCR ya que se amplifican regiones génicas específicas de la especie, pero es isotérmica por lo que no se necesita un termociclador para llevarla a cabo. Sin embargo, hasta el momento no ha sido estandarizada la técnica de LAMP para el diagnóstico de Map. Si se evalúan los costos de ambas pruebas, es necesario tener en cuenta que si bien el LAMP tiene un costo mayor de reactivos por necesitar 4

pares de *primers* en lugar de 2 (PCR) -y en mayor cantidad- y una enzima para la desnaturalización del ADN, el costo del equipo para PCR es de 4000 – 6000 U\$\$ y para su revelado son necesarias cubas electroforéticas (580 U\$\$) con fuentes de poder (540 U\$\$) además del costo de reactivos y tiempo de ejecución (precios obtenidos de OneLab <https://www.onelab.com.ar/>).

Las técnicas moleculares se utilizan como técnicas complementarias al cultivo para la detección de Map, debido a que éstas detectan la presencia de un fragmento de ADN en una muestra, aunque el agente podría no estar viable y no ser causal de enfermedad.

EL AGENTE

El agente causal de la paratuberculosis bovina es *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map). Pertenece a la clase Actinobacteria, orden Actinomycetales, familia Mycobacteriaceae y género *Mycobacterium*. Forma parte del complejo llamado “complejo *M. avium*” o complejo MAC del que también forman parte otras 3 subespecies: *Mycobacterium avium* subsp. *avium* (Maa), *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* (Mah) y *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* (Mas), y otras especies de importancia en el humano (tabla 1). Si bien las cuatro subespecies de *Mycobacterium avium* pueden producir enfermedad en diversas especies, todos tienen hospedadores de preferencia. Así, Maa produce enfermedad de tipo tuberculosa en aves, Mah produce enfermedad en cerdos, aunque también puede afectar al ser humano, y Mas se ha aislado principalmente en palomas. Para la identificación de la subespecie se utilizan técnicas de biología molecular como la PCR, ya que existen variaciones en la

presencia y distribución de ciertas secuencias de inserción (IS) en sus genomas (15).

Tabla 1. Especies y subespecies del complejo MAC. Adaptado de Rindi y Garzelli (16)

Especies	Subespecies	Hospedador de preferencia
<i>M. avium</i>	Subsp. <i>avium</i>	Aves
	Subsp. <i>paratuberculosis</i>	Rumiantes
	Subsp. <i>hominissuis</i>	Porcinos y humanos
	Subsp. <i>silvaticum</i>	Palomas
<i>M. intracellulare</i>		Humanos
<i>M. colombiense</i>		Humanos
<i>M. chimaera</i>		Humanos
<i>M. marseillense</i>		Humanos
<i>M. timonense</i>		Humanos
<i>M. boucherdurhonense</i>		Humanos
<i>M. vulneris</i>		Humanos
<i>M. arosiense</i>		Humanos
"otras MAC"		Humanos

El género *Mycobacterium* está integrado por bacilos inmóviles, no esporulados, Gram variables, pero con ácido alcohol resistencia debido a las características de su pared celular. Esta pared presenta en su composición una elevada cantidad de lípidos, entre ellos los ácidos micólicos, quienes son los causales de la característica ácido - alcohol resistencia de las micobacterias (retienen la fucsina de Ziehl luego de la decoloración con ácidos). Se pueden diferenciar tres capas formando la pared, la más interna está formada por peptidoglicanos, la capa intermedia formada por un polisacárido, el arabinogalactano, esterificado en sus

extremos distales con ácidos grasos de alto peso molecular: los ácidos micólicos antes mencionados, que poseen una longitud de entre 60 y 90 átomos de carbono; por último, la capa externa, que presenta glicolípidos en su composición (figura 1) (17). Otra característica general de las micobacterias es su comportamiento en medios de cultivo, tardan mínimo 48h en desarrollar, por lo que se dice que son bacterias de crecimiento lento. Aunque todas las especies de micobacterias desarrollan lentamente en medios de cultivo, algunas lo hacen más rápido que otras, y esto se utiliza como criterio para clasificarlas. Así describimos micobacterias de crecimiento rápido si tardan menos de 7 días en dar colonias observables en los medios de cultivo incluso a temperatura ambiente, y micobacterias de crecimiento lento si tardan más de 7 días en dar colonias observables en medios de cultivo a 37°C. Runyon en el año 1959 contempló la formación de pigmento como característica diferencial en ciertas micobacterias y la utilizó en conjunto con el tiempo de desarrollo para dividir las en 4 grupos (tabla 2). En la clasificación de Runyon quedan excluidas ciertas especies de interés que se agrupan en el llamado “Complejo *M. tuberculosis*”.

Otra forma de clasificación de las micobacterias se relaciona con la capacidad de producir o no enfermedad. Así, las distintas especies del género *Mycobacterium* se clasifican como patógenas (complejo *M. tuberculosis*, complejo MAC, *M. leprae*) o no patógenas (muchas veces llamadas atípicas o ambientales, como por ejemplo *M. nonchromogenicum*, *M. phlei*, *M. smegmatis*, etcétera). Dentro del grupo de las micobacterias patógenas podemos mencionar a las especies que integran el complejo *M. tuberculosis*: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canetti*, *Mycobacterium bovis*,

Mycobacterium microti, *Mycobacterium caprae* y *Mycobacterium pinnipedii*. Este complejo de micobacterias tiene gran importancia en salud pública ya que producen enfermedad en variedad de animales y en el ser humano. *M. leprae*, por su parte, es el agente causal de la lepra en el ser humano. Por último, y como se mencionó anteriormente Map pertenece al complejo MAC, y forma parte también del grupo de micobacterias patógenas, ya que afecta principalmente a rumiantes y también a un gran grupo de animales salvajes, aunque cobra mayor importancia en nuestro país su efecto a nivel productivo en el ganado bovino y por ello es objeto de estudio en este trabajo.

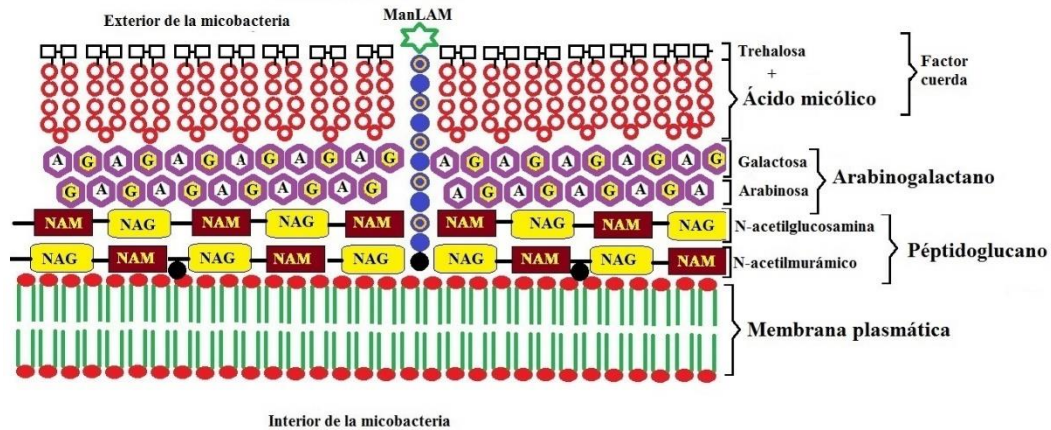
Tabla 2. Clasificación de Runyon

Grupo	Características diferenciales	Especies de <i>Mycobacterium</i>
I	Fotocromógenos ¹ de crecimiento lento	<i>M. kansasii</i> , <i>M. simiae</i> , <i>M. marinum</i> , <i>M. asiaticum</i> .
II	Escotocromógenos ² de crecimiento lento	<i>M. kansasii</i> , <i>M. flavescens</i> , <i>M. gordonae</i> , <i>M. srofulaceum</i> .
III	No fotocromógenos ¹ y no cromógenos de crecimiento lento	Complejo <i>M. avium</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. intracellularis</i> , <i>M. nonchromogenicum</i>
IV	Crecimiento rápido (<1 semana a 25 o 37°C)	<i>M. thermoresistible</i> , <i>M. smegmatis</i> , <i>M. vaccae</i> , complejo <i>M. parafortuitum</i> , <i>M. phlei</i>

¹Producen pigmento en presencia de luz.

²producen pigmento en ausencia de luz

Figura 1. Pared de la micobacteria y moléculas que la componen.



Esquema de la pared micobacteriana, tomada del capítulo de micobacterias del libro de cátedra "Patogenicidad Microbiana en Medicina Veterinaria", volumen de bacteriología, 2018. Se representan la membrana plasmática, peptidoglicano, arabinogalactano y los ácidos micólicos.

Mycobacterium avium subsp *paratuberculosis* es una micobacteria de crecimiento lento, bacilar, que mide entre 0,5 y 1,5 μm . En medios de cultivo tradicionales tarda entre 2 y 4 meses en desarrollar y dar colonias visibles. A su vez, tiene la particularidad de formar grupos bacilares que se hacen evidentes en una coloración específica como la de Ziehl Neelsen (ZN) y esto ayuda en su diferenciación del resto de las especies del género. También, Map presenta secuencias de inserción específicas en su genoma que pueden ser detectadas mediante técnicas moleculares como PCR para su diagnóstico o confirmación, las secuencias más utilizadas son la F57 y la IS900, siendo esta última la más sensible y, por ese motivo, la más utilizada de las dos.

Basado en polimorfismos de secuencias de inserción (Restricción de segmentos polimórficos largos - Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLP) IS900 e IS1311, Map fue inicialmente clasificada en dos grupos que reflejan parcialmente su especificidad de hospedador: Tipo S (Sheep - ovinos), la cual se

aísla principalmente de ovejas y el Tipo C (Cattle - bovinos) que afecta principalmente a los bovinos y caprinos (18). Dos años después se encontró en dos ovejas un tercer grupo que compartía polimorfismos genéticos con los dos grupos descritos anteriormente, por lo cual se la llamó I (Intermediate) (19). Posteriormente, gracias a la PCR y análisis con enzimas de restricción (PCR - REA) de la secuencia específica *IS1311*, se ha extendido el estudio filogenético de las cepas de Map definiendo los tipos I y III (subtipos de S) y II (Subtipo de C), lo cual fue corroborado mediante técnicas de electroforesis en campo pulsado (20,21). Posteriormente, se describió una cepa B (Bison) aislada inicialmente de bisón, aunque no es exclusiva de esta especie (22). A esta última se la clasificó también como un subtipo de la cepa C (23) debido a que sus perfiles genómicos, obtenidos mediante las técnicas de *microarray* y electroforesis en campo pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis* - PFGE), son los mismos.

En la actualidad la genotipificación de las cepas se realiza mediante técnicas de biología molecular que buscan las unidades repetitivas intergénicas de micobacterias (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Units*- MIRUs) dispersas en el genoma. Una de las técnicas que ha dado buenos resultados para la genotipificación de Map es la MIRU VNTR (*Variable Number Tandem Repeats*) (24–26), usando 8 MIRU VNTR loci (MIRU 292, MIRU X3, VNTR 25, VNTR 47, VNTR 3, VNTR 7, VNTR 10 y VNTR 32) para clasificar, según el número de copias repetidas en tándem de cada MIRU VNTR, en cada cepa (INMV) (15,24). Los patrones INMV se numeran 1 a 25 y se obtienen verificando en una base de datos MAC - INMV (<http://mac-inmv.tours.inra.fr/>). Esta técnica posee mayor poder discriminatorio que la técnica *IS900* - RFLP (0,75 en comparación con 0,

48, respectivamente) (24). Otra técnica de tipificación, SSR (*Short Sequence Repeat*), se basa en la amplificación de secuencias cortas repetidas (di o tri nucleótidos) en diferentes loci, y su posterior secuenciación; es más exacta que la anterior, aunque más laboriosa y costosa (27).

Recientemente se ha obtenido el genoma completo de Map, secuenciado a partir de la cepa de referencia K-10 aislada de un bovino, perteneciente al Tipo II.

El mismo consiste en un fragmento de ADN circular de 4.829.781 pares de bases que codifican para 4.350 ORFs. El análisis *in silico* del mismo permite identificar más de 3.000 genes homólogos con *M. tuberculosis* y 161 regiones que codifican 39 genes propios de Map (28).

LA ENFERMEDAD

La paratuberculosis o “Enfermedad de Johne” fue descubierta en 1895 por Johne y Frothingham, es una enfermedad crónica que afecta principalmente a rumiantes, aunque también a otros animales silvestres, lo que dificulta aún más su control. Es producida por Map y tiene un período de incubación muy prolongado, pudiendo tardar 2 a 12 años entre la infección y los primeros signos clínicos (6,29). Esta enfermedad genera en el animal infectado una enteritis, específicamente una ileocolitis de tipo granulomatosa y carácter crónico y debilitante. Las lesiones más evidentes se localizan en las últimas porciones de intestino (íleon, válvula ileocecal y colon) y en los nódulos linfáticos asociados (30). Estas lesiones producen en el animal un síndrome mal-absortivo que lo lleva en principio a diarrea intermitente y progresa hacia una pérdida importante de la condición corporal con descenso en la producción, hipoproteinemia y consecuente edema en zonas

declives. El progreso de la enfermedad resulta en la muerte del animal produciendo pérdidas productivas y económicas importantes a lo largo de todo el mundo (1-5,29).

PATOGENIA

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* es un bacilo intracelular obligado que se transmite vía fecal – oral principalmente, aunque también está descrita una transmisión transplacentaria y mediante la leche en terneros en lactancia (7,31,32); por cualquiera de estas vías las micobacterias llegan al intestino donde ingresan a través de las placas de Peyer del íleon mediante las células M para luego parasitar los macrófagos. Dentro de ellos logran sobrevivir y replicarse, evadiendo los mecanismos bactericidas de los macrófagos, hasta que la célula se lisa y miles de micobacterias son liberadas nuevamente a la luz intestinal y son eliminadas posteriormente con la materia fecal. Debido al largo período de incubación de la enfermedad, los animales pasan por 4 etapas luego de su infección (6,7):

- Primera etapa, o etapa silente: animales jóvenes, generalmente menores de 4 meses, aunque pueden ser de hasta dos años de edad, que están infectados, pero no tienen ningún tipo de respuesta inmune detectable ni signología de la enfermedad, tampoco eliminan micobacterias por materia fecal. Son muy difíciles de diagnosticar mediante los métodos disponibles actualmente.
- Segunda etapa, o etapa subclínica: animales que presentan alteraciones de su sistema inmune pudiendo mostrar una respuesta de tipo celular, incluso

a veces detectable. No presentan signos clínicos, pero comienzan a eliminar micobacterias en materia fecal de manera intermitente, aunque indetectable por las técnicas diagnósticas actuales.

- Tercer etapa o etapa clínica: animales que presentan los signos clínicos característicos de la enfermedad. Su sistema inmune generó anticuerpos contra Map, con lo que pueden ser detectados mediante técnicas serológicas. Además, estos animales son eliminadores de Map por materia fecal y puede ser evidenciado el agente mediante cultivo bacteriológico.
- Cuarta etapa o enfermedad clínica avanzada: animales con título de anticuerpos altos, que eliminan gran cantidad de micobacterias por las heces (10.000 UFC/gramo de materia fecal), motivo por el cual se los llama “super eliminadores”. A medida que la enfermedad progresa comienza una etapa agónica donde el título de anticuerpos baja por la hipoproteinemia, el animal se encuentra ya emaciado, con trastorno locomotor o incluso postrado hasta que muere.

LA ENFERMEDAD EN HUMANOS

Si bien no está comprobada una implicancia zoonótica de Map, en los últimos años se han realizado varios trabajos que demuestran la existencia de una relación entre la presencia de este agente y ciertas enfermedades en el humano. Se presume que Map sería un factor predisponente en enfermedades autoinmunes como la enfermedad de Crohn (33,34), tiroiditis de Hashimoto (35), diabetes mellitus tipo I (36–38), esclerosis múltiple, entre otras. Sin embargo, la más estudiada ha sido la enfermedad de Crohn, y es cada vez más clara la relación de Map con esta enfermedad, aunque existe controversia sobre si Map es el agente etiológico de la

enfermedad. La enfermedad de Crohn se agrupa dentro de las denominadas enfermedades digestivas inflamatorias junto a otras enfermedades, y tiene semejanzas con la paratuberculosis bovina ya que causa una inflamación granulomatosa en íleon y zona ileocecal. Existen tres teorías principales sobre su etiología (39), o combinación de varias (40): la teoría de autoinmunidad, la de inmunodeficiencia y la infección micobacteriana. Es por esto que se enfatiza en el potencial riesgo que existe para la salud pública por la presencia de Map en la cadena alimenticia humana (41–46). En Argentina y en otras partes del mundo (UK, USA, República Checa, India, etc.) se ha aislado Map a partir de leches pasteurizadas e incluso quesos y yogurts comerciales, lo que indica que estos productos pueden ser fuentes de exposición al humano (47–50). Por este motivo, mundialmente se está poniendo un alerta en el consumo de productos, particularmente leche, de animales con PTB (51,52). Debido a todo lo expuesto, existe una necesidad inminente de mejorar el diagnóstico de la enfermedad en los animales, no solo por las pérdidas productivas y económicas de los productores ganaderos, sino también por una posible afección humana ligada a la presencia del agente.

RELEVANCIA

En el año 1963, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) concluyó que PTB es una de las enfermedades que más afecta a la industria ganadera bovina y actualmente es motivo de intensos programas sanitarios de control en Europa, Estados Unidos, Nueva Zelanda y Australia. En el año 2009, la Organización Mundial de Sanidad Animal (hasta el 2003 conocida como Oficina Internacional de Epizootias, OIE) inscribió a PTB

dentro de la lista del Código Sanitario para los Animales Terrestres, y en él se explicita que su identificación es de declaración obligatoria y debe ser notificada ante esa organización mediante la autoridad sanitaria correspondiente. En el comercio de carne, China propone como condición sanitaria la ausencia de casos de paratuberculosis en los rodeos de origen, junto a: tuberculosis, brucelosis, rabia y lengua azul.

En nuestro país, la autoridad sanitaria competente es el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). Paratuberculosis fue reconocida por SENASA en el año 1969 declarando por medio del decreto número 5561 que, en caso de aparición de animales con la enfermedad, y en los casos que por razones sanitarias se requiera, se podrá pedir el sacrificio de los mismos pagándose al productor la indemnización correspondiente. En el año 2000, SENASA publicó un manual de procedimiento técnico para el diagnóstico de PTB, avalado tanto por la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca como por el laboratorio de referencia de la OIE para América del Sur, América Central, México y Caribe (53) para controlar la enfermedad. En Argentina, la población bovina es de aproximadamente 52 millones de cabezas, y la mayor densidad de bovinos (70% del stock ganadero) se encuentra en la Cuenca del Salado de Buenos Aires. Con respecto a la producción láctea, el país cuenta con 3.5 millones de bovinos en tambo y en las cuencas lecheras de las provincias de Buenos Aires, Santa Fe y Córdoba se concentran el 62,87% de los bovinos de producción láctea (Datos de SENASA <http://www.senasa.gov.ar/>).

Los datos epidemiológicos de esta enfermedad son escasos y sólo proporcionan datos de seroprevalencia (por ELISA indirecto). En el año 2007, desde el Instituto

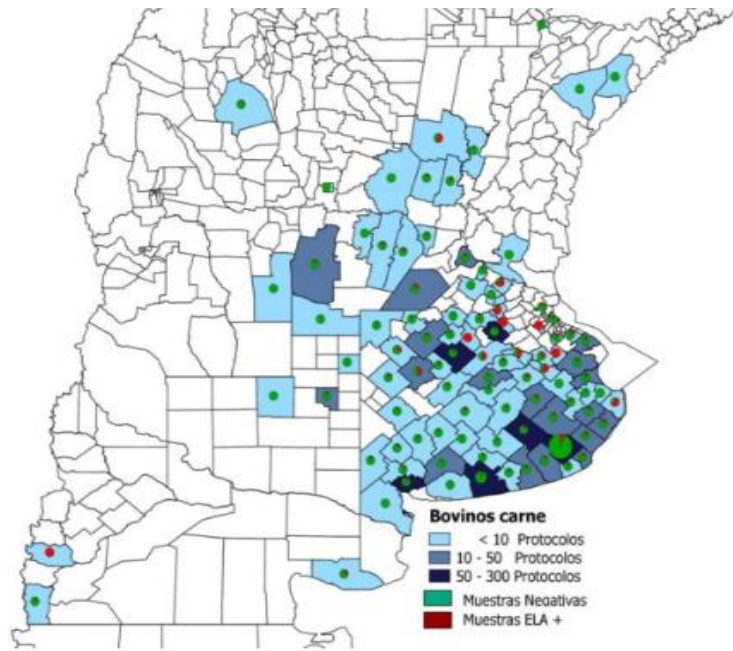
Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) de Balcarce, se presentaron cifras alarmantes sobre el impacto de esta enfermedad en la producción de la Provincia de Buenos Aires (PBA). Calcularon que, en esta Provincia, la seroprevalencia para la enfermedad en rodeos de cría de la Cuenca del Río Salado es de un 7.2-19.6%. También calcularon que sólo en el año 2007 las pérdidas económicas rondaron los U\$S 22 millones en la zona de cría bovina en la Cuenca del Río Salado y los U\$S 6.3 millones en las cuencas lecheras (PBA) (5). En 2012 se presentó un boletín donde se muestran resultados de 8 años de estudio de enfermedades que afectan al ganado bovino, utilizando un total de 1527 muestras pertenecientes a distintas categorías animales para su análisis, y donde se muestra que la principal enfermedad que afecta al ganado bovino en este estudio es PTB (tabla 3) (54).

Tabla 3. Diagnóstico de enfermedades infecciosas bovinas en las Provincias de Buenos Aires, Santa Fe, La Pampa, Córdoba, entre otras, en el período transcurrido entre los años 1997 – 2004. Adaptado del boletín n° 160 de INTA Balcarce (54).

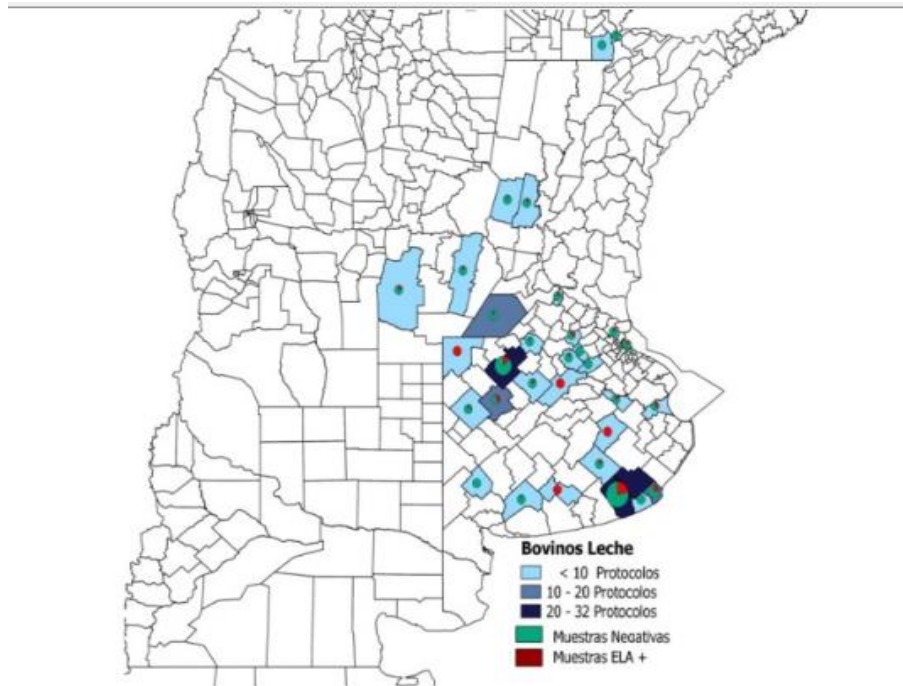
Diagnóstico	Vaca	Vaquillona	Toro	Ternero	Novillito	Novillo	Sin dato	Total	%
Paratuberculosis	385	56	22	0	0	2	0	425	27.8
Brucelosis	244	40	12	0	0	0	0	296	19.4
Campylobacteriosis	58	10	66	0	0	0	0	134	8.8
Leptospirosis	80	11	0	15	0	0	0	106	6.9
DVB	43	22	0	16	8	7	0	96	6.3
Neumonía	3	4	0	42	12	1	0	62	4.1
Diarrea neonatal	0	0	0	51	0	0	0	51	3.3
Queratoconjuntivitis	5	6	4	20	11	0	0	46	3.0
IBR	12	8	2	4	5	7	0	38	2.5
Carbunco	15	10	1	0	2	5	0	33	2.2
Salmonelosis	0	0	0	29	0	0	0	29	1.9
Listeriosis	6	2	3	2	5	6	0	24	1.6
Otras	99	41	6	18	11	6	6	187	12.2
Total	950	170	116	197	54	34	6	1527	100
%	62,2	11,1	7,6	12,9	3,5	2,2	0,4	100	

En el año 2018 se presentaron resultados de 25 años de estudio (1991-2016) donde se muestra la distribución encontrada de la enfermedad en bovinos de cría y

de leche (figura 2) de la Provincia de Buenos Aires y otras Provincias de Argentina (55).



A



B

Figura 2. Origen de las muestras analizadas de bovinos de carne (A) y de leche (B) en Argentina. El color de las localidades indica la cantidad de protocolos analizados y el gráfico de torta dentro de cada una de ellas indica el porcentaje de muestras positivas (rojo) por sobre el total de muestras analizadas (verde). Adaptado del trabajo de Paolicchi y col (55).

En el año 2014 se instauró, en la zona de Chascomús y Lezama y promovido por la Fundación anti aftosa y la Sociedad Rural de Chascomús, el programa “Rodeo Sano = más terneros”, donde se fomenta y estimula a los productores a realizar controles más rigurosos de ciertas enfermedades para la compra y venta de animales, entre ellas incluida PTB (<http://www.asociacionruraldechasmus.com.ar/mision/>). Esto demuestra la creciente preocupación de los productores por la importancia de esta enfermedad y sus consecuencias económico – productivas, la cual empiezan a notar cada vez más.

INMUNOPATOGENIA

Como se mencionó anteriormente, el animal resulta infectado generalmente a edades muy tempranas, normalmente en la lactancia, y mediante la ingestión de alimento contaminado por la presencia de Map. De esta manera, Map logra llegar al íleon distal y yeyuno e ingresar a las placas de Peyer, principalmente mediante las células M presentes en ellas, aunque también se ha descrito un ingreso de menor importancia por el espacio entre los enterocitos del mismo epitelio (56,57). Una vez dentro de las células M, Map es transportado hacia la zona basolateral de las mismas para acercarlas a los macrófagos intra y subepiteliales quienes lo fagocitan para intentar eliminarlo (58). A partir de ese momento Map comienza a desplegar diversos mecanismos orientados a evitar su destrucción por parte de los macrófagos. Según varios estudios, la vía de ingreso de Map al macrófago es determinante en el progreso de la infección. Por un lado, si es reconocido por receptores de tipo Toll – 2, Map se aloja en fagosomas tempranos e impide que éstos se unan a los lisosomas y se acidifique el medio, de forma que bloquea su maduración y evita ser degradado por las lisozimas (59–62). Por el contrario, si es reconocido por la región Fc (cristalizada) de los anticuerpos se envían señales pro – inflamatorias y se desencadena el estallido respiratorio, donde la Nicotinamida Dinucleótido Fosfato en su estado reducido (NADPH) promueve la utilización el consumo abrupto de oxígeno generando un ascenso crítico de especies reactivas del oxígeno que actúan como microbicida eliminando a Map y provocan la muerte celular debido a los daños producidos. La posible apoptosis como mecanismo de defensa por parte de los macrófagos es un tema de discusión incluso en la actualidad, si bien la mayoría coincide que este mecanismo es evadido por Map

(60,63), existe un trabajo donde se demuestra un incremento en muerte apoptótica de macrófagos infectados por Map (64).

Más allá de las investigaciones actuales sobre el detalle de los procesos inmunitarios que se activan en el huésped, se sabe que posterior a los mecanismos de inmunidad innata se desencadena la inmunidad adaptativa, representada inicialmente por una respuesta de tipo celular (con participación principalmente de linfocitos T) y luego por una respuesta de tipo humoral (con participación de linfocitos B, plasmocitos e inmunoglobulinas de tipo G y M). Así, cuando el macrófago infectado presenta en su superficie receptores del complejo mayor de histocompatibilidad I o II para la presentación antigénica, los linfocitos T los reconocen mediante sus receptores $T\gamma\delta$ y $T\alpha\beta$. Las células $T\alpha\beta$ se subdividen según los marcadores de grupo que expresan en CD4 (ayudantes o *helper*) y CD8, y a su vez, las T CD4 presentan subgrupos de ayudantes tipo I (Th1) y tipo II (Th2). Las células Th se diferencian en tipo I y II según las citoquinas que liberan. Así, las Th1 liberan IFN- γ , interleuquina (IL) 2 y 12 y participan en la activación del macrófago y la hipersensibilidad retardada (HTR). Se asocia la acción de los linfocitos Th1 con una baja cantidad de micobacterias ya que muchas son eliminadas por el macrófago activado. Por otro lado, las células Th2 secretan IL4, 5, 10 y asisten al desarrollo de los linfocitos B y la producción de anticuerpos. La IL10 tiene un efecto anti inflamatorio, impidiendo, entre otras cosas, la activación del macrófago, y provocando que las micobacterias puedan sobrevivir y multiplicarse en él. Como estas células Th tienen efectos antagónicos, a medida que la respuesta Th2 (asociada a respuesta de tipo humoral por su papel en la producción de anticuerpos) aumenta, la Th1 (asociada a respuesta de tipo celular,

ya que son las células Th y T citotóxicos quienes controlan la infección) disminuye. Los linfocitos $T\gamma\delta$ se acumulan al inicio de la infección en el epitelio y actúan suprimiendo a los linfocitos T CD4, limitando el potencial daño de los mismos. Los linfocitos T CD8 se localizan en la periferia de las lesiones granulomatosas y actúan suprimiendo a los linfocitos $T\gamma\delta$ y promoviendo la proliferación de linfocitos T CD4.

Teniendo en cuenta las bases inmunológicas explicadas, según el estadio de la enfermedad en el que se encuentre el animal, se pueden utilizar distintas técnicas para poder arribar al diagnóstico. Las técnicas de diagnóstico se explicarán detalladamente más adelante, pero podemos ver su relación con los estadios de la enfermedad y la respuesta inmune que desarrolla el animal en la figura 3.

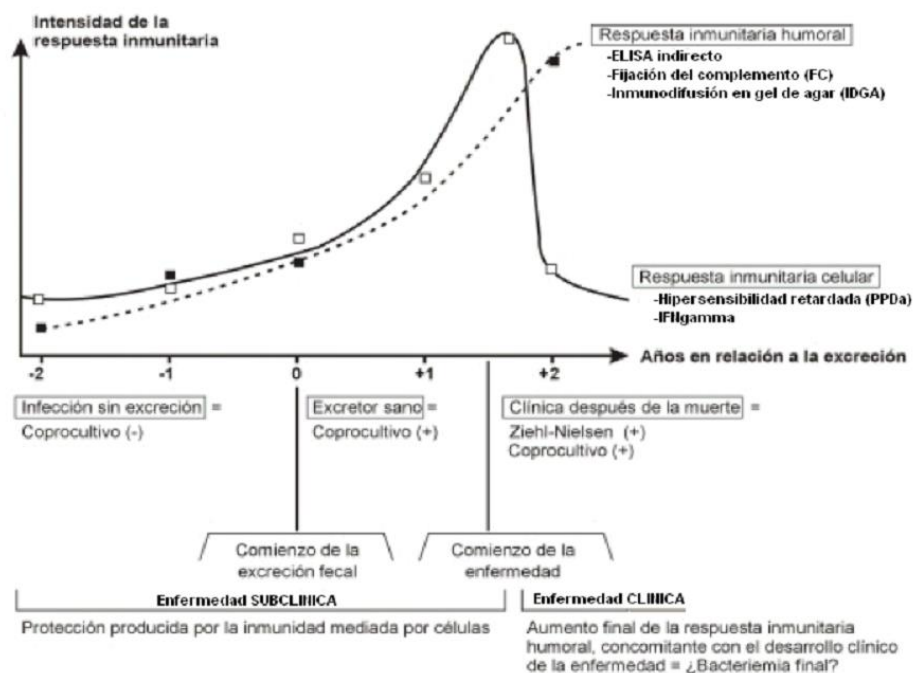


Figura 3. Relación entre la respuesta inmunitaria celular y humoral en el animal y el comienzo de la excreción de Map por materia fecal. También se observa, basado en lo anterior, las posibles herramientas diagnósticas. Adaptado de Bernardelli 2000 (53).

TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN

Hasta el momento, la enfermedad no tiene tratamiento efectivo y las vacunas que se han probado en Nueva Zelanda, EEUU, Australia y otros Países de Europa, si bien disminuyen los signos clínicos, no evitan la infección y, además, interfieren con el diagnóstico de tuberculosis bovina, por lo que en nuestro País no han sido aprobadas por SENASA. El control de la enfermedad se realiza mediante estrategias de manejo que están basadas en el diagnóstico y eliminación de animales positivos, o en el control de riesgos al trasladar animales o ingresar nuevos (4,31,65–67). Los programas de control basados en el riesgo, se basan en el conocimiento del riesgo de ingreso de la enfermedad al comprar o trasladar animales. Para esto, se combinan factores e indicadores de riesgo (según datos clínicos y productivos) tomados de varias bases de datos nacionales, las que proveen un asesoramiento de riesgos para cada campo y determina rutas de movimiento de animales según si son categorizados como infectados o no. Estos programas han mostrado ser altamente eficientes (68,69), pero requieren un compromiso por parte del gobierno nacional para la generación de una base de datos que en nuestro País no existe por el momento. Por otro lado, los programas de control basados en el diagnóstico y eliminación de los animales (refugio) positivos, si bien son de gran ayuda, se ven limitados por la baja sensibilidad de la técnica diagnóstica de oro (cultivo bacteriológico a partir de materia fecal) y la variabilidad en la sensibilidad de otras técnicas utilizadas como ELISA indirecto y PCR. A su vez, todas estas técnicas son costosas, y si bien son efectivas en estadios avanzados de la enfermedad, difícilmente detectan animales que estén

cursando estadio subclínico. Es por este motivo que una mejora en las técnicas diagnósticas es importante para el control de esta enfermedad, objetivo perseguido en este trabajo de tesis.

DIAGNÓSTICO

A lo largo de los años el diagnóstico de la paratuberculosis ha cobrado importancia debido a las pérdidas económicas que genera en todo el mundo (1,3,5). Las técnicas diagnósticas actuales tienen baja sensibilidad, pero ésta va aumentando a medida que progresa la enfermedad, debido a la respuesta del sistema inmune adaptativo (70,71). En la actualidad se utilizan principalmente los siguientes métodos diagnósticos:

Pruebas indirectas: Consisten en la detección de la respuesta inmune en distintos estadios de la infección (figura 3).

- Diagnóstico serológico mediante técnicas de inmunodifusión en gel de agar (AGID) o ELISA indirecto.

Las pruebas de inmunodifusión en gel de agar es una técnica sencilla y de bajo costo. Mediante esta prueba se logra la detección de anticuerpos específicos contra la enfermedad. Se fundamenta en la formación de inmunocomplejos entre los anticuerpos específicos de la muestra (en sueros positivos) y el antígeno de *Mycobacterium* sp. al que se la enfrenta. Es una prueba muy específica, pero de baja sensibilidad, de manera que es útil para el diagnóstico en casos de enfermedad clínica avanzada.

La técnica de ELISA (acrónimo del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, “ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas”) es una prueba de mayor complejidad y mayor costo. También detecta IgG, pero es más sensible que la AGID y puede ser utilizada para el diagnóstico en estadios más tempranos de la enfermedad. Puede haber reacciones cruzadas de forma tal de generar falsos positivos, pero se pueden adsorber los sueros con *Mycobacterium phlei* para eliminar los anticuerpos inespecíficos (72). Para la lectura en esta técnica es necesario contar con un espectrofotómetro, de manera que no puede realizarse sino en un laboratorio de cierta complejidad. Por su sensibilidad es utilizada para la implementación de planes de control en campos donde la situación respecto de la enfermedad es desconocida, a modo de prueba tamiz, aunque también como prueba diagnóstica.

- Diagnóstico celular: Las técnicas que detectan respuesta inmune de tipo celular están destinadas al diagnóstico de animales jóvenes, en los que no se detecta aún respuesta inmune humoral. Estos animales comprenden un punto de control muy importante ya que son la categoría más susceptible.

La prueba tuberculínica consiste en la inoculación intradérmica de un derivado proteico purificado de *Mycobacterium avium* subsp *avium* (PPDa) en la tabla del cuello o en el pliegue ano caudal interno. La prueba tuberculínica es una técnica sencilla que se realiza a campo y no requiere demasiado equipamiento. Para su realización se procede a la inoculación intradérmica de 0,1 mL de PPDa (concentrado a 0,5 mg/mL) en el pliegue anocaudal interno o en la tabla del cuello, y luego de 72 horas se observa la diferencia entre mediciones previa y post

inoculación. Se considera positivo todo animal donde se observen diferencias iguales o mayores a 3 mm.

En general la reacción intradérmica se utiliza para el diagnóstico de tuberculosis bovina (TBB). En Argentina existe un Plan de erradicación de la TBB (Resolución SENASA N° 128/2012) el cual determina realizar la intradermorreacción ano caudal con PPD_b en los bovinos a partir de los 3 o 6 meses de edad dependiendo del tipo de explotación. Por esto, muchas veces se puede realizar la inoculación en tabla del cuello de ambas tuberculinas, prueba que se denomina doble comparativa, donde se considera positiva la reacción, si el aumento del grosor de la piel en el sitio de la inyección de PPD_b supera en 4 mm o más la reacción en el sitio de la inyección aviar. La reacción no es concluyente, si el incremento comparativo está entre 1 y 4 mm, y se considera negativa, si el incremento del grosor de la piel en el sitio de la inyección de PPD_b es menor o igual que el observado en el sitio de la inyección de PPD_a (73).

Las técnicas de linfoproliferación e interferón gamma (IFN γ) son pruebas complejas que se realizan a partir de sangre entera de los animales. En estas pruebas las muestras deben ser manipuladas con mucho cuidado y necesitan ser procesadas dentro de las primeras horas luego de la extracción en laboratorios específicos. Ninguna de ellas está aprobada por SENASA para su utilización en el Plan de Control Oficial de la enfermedad.

La prueba de interferón gamma se basa en la liberación de IFN γ por los linfocitos sensibilizados. Para esto, en su utilización diagnóstica de PTB, son incubados por un período entre 18 y 36 h con un antígeno específico (generalmente PPD_a) y

luego cuantificada su detección mediante un ELISA tipo *sandwich*, utilizando dos anticuerpos monoclonales con la misma especificidad para el IFN γ , sólo que uno está marcado y el otro no (73).

La prueba de linfoproliferación se utiliza para detectar si hubo exposición a algún microorganismo intracelular mediante el enfrentamiento *in vitro* a un antígeno en particular. Así, en el diagnóstico de PTB se toma muestra de sangre a partir de punción venosa y se coloca en tubos heparinizados para evitar la coagulación y poder recuperar mediante centrifugación los linfocitos. Estos son expuestos a algún/os antígeno/s específico/s de PTB (74) e incubados en estufa con un colorante como bromuro de tetrazolio por 72 h a 37°C. Este colorante es reducido por las mitocondrias a formazán, impartiendo un color oscuro. Si los linfocitos han sido expuestos al antígeno en el animal, al ser enfrentados al mismo *in vitro*, proliferan, y esto se verá reflejado en la intensidad del color expresado como densidad óptica (DO) por la reducción del colorante. La DO puede ser leída con espectrofotómetro con una longitud de onda de 570 nm y así determinar si hubo o no proliferación, lo cual se vincula a la previa exposición determinando positivo o negativo el animal.

Pruebas directas: Consisten en la detección directa del patógeno (Map). Existen pruebas directas *post – mortem* y *ante – mortem*.

Post – mortem:

- Diagnóstico por observación macroscópica de lesiones, necropsia.

La PTB genera una ileocolitis granulomatosa con síndrome malabsortivo consecuente. Debido a esto, en la necropsia, las lesiones características se encuentran en el sistema digestivo principalmente, pero también hay signos generales como mala condición corporal, edema en zonas declives (papada) y cola manchada como evidencia de diarrea en el animal, previo a la muerte. En muchos casos puede que estas lesiones o parte de ellas sean solamente un hallazgo y el animal haya muerto por causas distintas a paratuberculosis, pero en los casos en los que esta enfermedad es la causa de la muerte las lesiones son evidentes y llevan al diagnóstico con casi total seguridad, si bien es necesaria la confirmación mediante detección del agente. En el yeyuno, íleon y colon suele encontrarse engrosamiento y edema, caracterizados por un aspecto cerebroide de la mucosa afectada (imagen 1). También es común observar linfangiectasia, inclusive en el

meso acompañante, y edema y tumefacción de linfonodos regionales.



Imagen 1. En la imagen se puede observar la mucosa del íleon engrosada y con edema, dando un aspecto cerebroide típico.

- Diagnóstico por observación microscópica de lesiones, histopatología.

Las lesiones microscópicas se corresponden, según el avance de la enfermedad, con una enteritis de menor o mayor grado en la mucosa intestinal. Así, en casos leves se observan células gigantes tipo Langhans en la lámina propia intestinal y en el área paracortical de linfonodos, pudiendo encontrar también células epiteloideas con citoplasma bien eosinófilo. En estos casos normalmente no se ven bacilos ácido – alcohol resistentes (BAAR) intracelulares con la coloración de Ziehl Neelsen (ZN). En casos moderados la extensión es mayor observando

macrófagos y células gigantes agrupados en la lámina propia y submucosa intestinal, y pudiendo encontrar las mismas células en los senos subcapsulares y área paracortical de linfonodos (imagen 2). En los casos más graves encontramos las mismas células invadiendo incluso la muscular y serosa intestinal, y se puede observar que las criptas intestinales son invadidas por polimorfonucleares neutrófilos y mucus y están distendidas. En los casos moderados a graves podemos encontrar BAAR intracelulares con coloración de ZN.

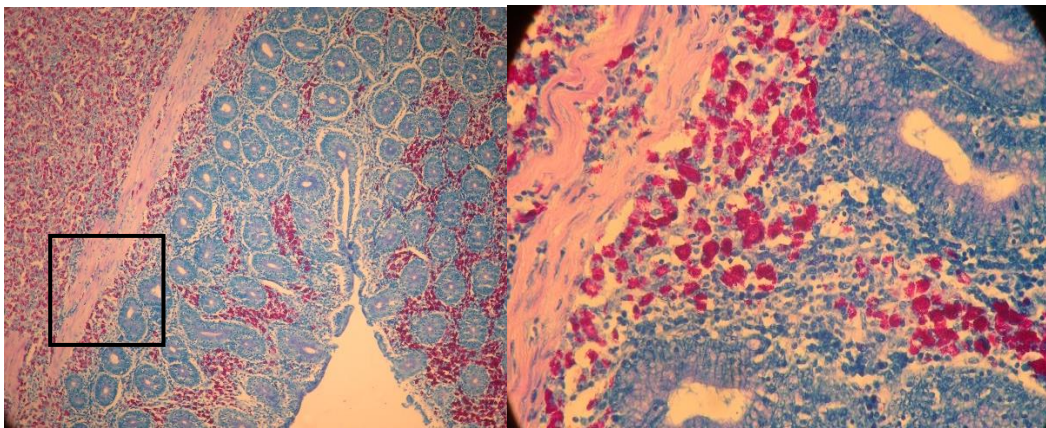


Imagen 2. Cortes histopatológicos de intestino delgado coloreados con ZN. A la izquierda: Imagen en 10X donde se observan múltiples focos color fucsia correspondientes a BAAR que invaden mucosa y submucosa. A la derecha: Imagen ampliada a 40X del recuadro de la imagen de la izquierda donde se ve mayor detalle

Ante – mortem:

Diagnóstico microbiológico mediante cultivo bacteriano (*gold standard*) y coloraciones específicas (Ziehl Neelsen).

- Cultivo bacteriológico

El cultivo bacteriológico a partir de materia fecal es considerado la prueba de referencia para el diagnóstico de PTB en animales vivos. Esto es debido a que esta técnica no solo demuestra la presencia de Map en la muestra sino también la

viabilidad de la bacteria. Se considera que no existen con esta técnica “falsos positivos”, es decir que es 100% específica.

La técnica de cultivo de Map es compleja, ya que esta micobacteria es de crecimiento lento y tiene grandes requerimientos para poder crecer y desarrollar *in vitro*. El requerimiento más importante a destacar es la micobactina, un sideróforo, quelante de hierro, imprescindible para el desarrollo de este agente ya que, a diferencia de otras micobacterias, Map no la produce. Tal es la exigencia que su dependencia se ha utilizado como factor a tener en cuenta para el diagnóstico de Map (10,11). Sumado a ello, para el cultivo es necesario realizar una intensa decontaminación con cloruro de hexadecilpiridinio (HPC), lo que dificulta aún más esta técnica.

Si bien muchos medios de cultivo se han evaluado al día de hoy para el diagnóstico y aislamiento de Map, el más difundido es el medio sólido de Herrold con yema de huevo y micobactina (HEYM) (75,76). Este medio de cultivo necesita entre dos a cuatro meses de incubación para que Map desarrolle y se formen colonias visibles a ojo desnudo, y se debe esperar hasta los seis meses para determinar un resultado negativo (8,9). Ese es el primer y más importante inconveniente sobre este medio de cultivo, pero a él se suma que su límite de detección es de 100 micobacterias por gramo de materia fecal (77). Así, su sensibilidad es baja para el diagnóstico de animales con enfermedad subclínica (23-29%) y aumenta en animales con enfermedad clínica (alcanzando el 70%) (78). Además, si bien es poco probable dado el proceso de decontaminación, pueden crecer otro tipo de micobacterias en este medio, por lo que la

confirmación definitiva del diagnóstico se realiza amplificando secuencias específicas del genoma, principalmente por PCR IS900 (70).

Debido a los tiempos necesarios para el diagnóstico con HEYM, se han probado medios de cultivo líquidos, sobre la premisa que en estos medios se agiliza el desarrollo por facilitar a las bacterias el acceso a los nutrientes. Distintos estudios lograron determinar que se obtienen mejores resultados con la utilización de medios de cultivo líquidos (9,12,13), encontrando mayor sensibilidad analítica y resultados más rápidos que con el medio de cultivo sólido convencional (79–81).

Los medios de cultivo líquidos que más se utilizan a nivel mundial hasta el momento son el BACTEC 12B® y el BD BACTEC™ MGIT™®, que se basan en un sistema automatizado de detección de crecimiento con métodos radiométricos y no radiométricos. A nivel país no es sencillo conseguir este tipo de medios comerciales debido a los trámites requeridos para su importación y, en el caso de conseguirlos, su costo limita el uso (79–81).

Además del tiempo requerido con los medios de cultivo sólidos tradicionales y de la exigencia de Map para su desarrollo *in vitro*, se suma a lo anterior, la dinámica propia de la enfermedad. Como se mencionó anteriormente, los animales infectados atraviesan distintas etapas de la enfermedad, y sólo en las últimas tres el animal libera Map en su materia fecal. La liberación de Map en materia fecal es intermitente, sin embargo en la etapa clínica puede superar las 10^8 UFC/gr. Basados en todo lo expuesto es fácil suponer que la sensibilidad de esta técnica es baja, y de hecho estudios previos demuestran que ésta apenas llega al 50% (77),

aunque otros autores describen que alcanza hasta un 91% en los casos clínicos (82).

- Coloración de Ziehl Neelsen

Las coloraciones específicas como la de Ziehl Neelsen (ZN), son de gran utilidad como complemento a las demás técnicas diagnósticas. Se utilizan cotidianamente en los laboratorios de diagnóstico para colorear muestras de materia fecal o tejidos, previo a su decontaminación y cultivo. En esta técnica se utiliza fucsina de Ziehl como colorante marcador, aprovechando la característica ácido alcohol resistencia que presentan las micobacterias para poder visualizarlas. Recordemos que la característica ácido alcohol resistencia de las micobacterias se debe a la presencia de ácidos micólicos en la composición de la pared de este tipo de bacterias, lo que permite que retengan la fucsina de Ziehl aún después de un decolorante ácido. Esta peculiaridad es distintiva de las micobacterias, pero no entre ellas; sin embargo, permite, en conjunto con las características morfológicas

de las mismas, acercarnos al diagnóstico (imagen 3 y 4).

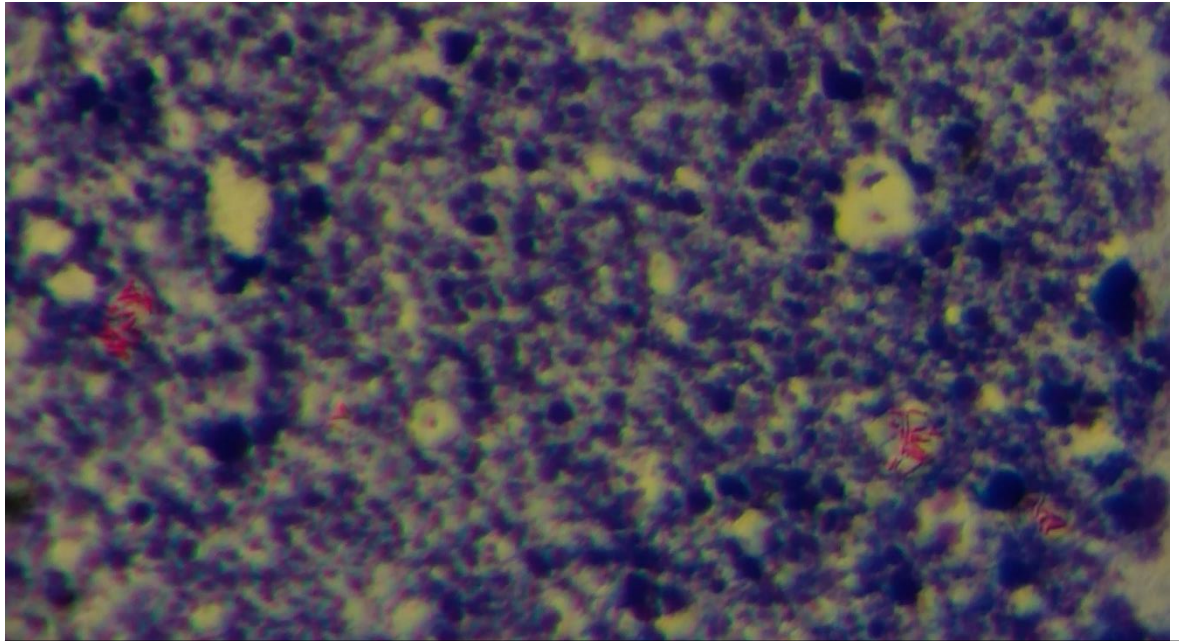


Imagen 3. Coloración de ZN donde se observan bacilos fucsias, ácido alcohol resistentes, teñidos intensamente con la fucsina de Ziehl.

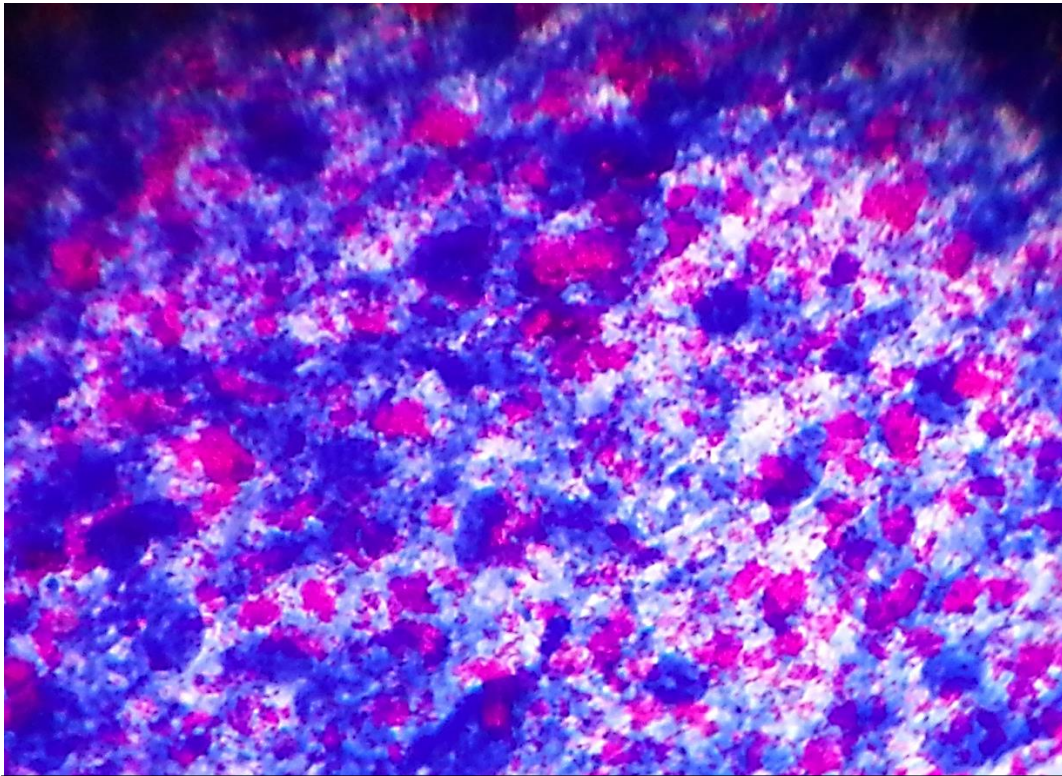


Imagen 4. Coloración de ZN de impronta de yeyuno donde se observan BAAR en abundancia. La muestra fue obtenida en la necropsia de un animal con signos compatibles con la enfermedad.

- Detección del segmento de inserción *IS900* mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La PCR es una técnica con la cual se logra la amplificación de un gen o un segmento de ADN utilizando cebadores o *primers* específicos. Para la detección de Map con fines diagnósticos se utilizan secuencias de inserción específicas como F57, *IS1311* e *IS900*. En el genoma de Map, la secuencia *IS1311* se encuentra en 7 copias, en cambio *IS900* se encuentra repetida entre 15 y 25 veces (83) por lo que es más sencilla su detección pero menos específico que la secuencia F57, de la que se encuentra solo una copia en todo el genoma (84).

MICOBACTINA

Fue a principios de siglo XX cuando los investigadores Mohler, Meissner, Mettam, entre otros, notaron que todas las micobacterias podían aislarlas en los medios de cultivo de su laboratorio a excepción de dos. Uno era el bacilo que se encontraba en las lesiones leprosas (85), y el otro era causal de una enteritis crónica en el ganado bovino. A partir de allí, hicieron numerosos intentos agregando tejidos animales y otros suplementos a los medios de cultivo para lograr su crecimiento. Fue recién en 1912/1913 que Twort e Ingram lograron el crecimiento de Map mediante el agregado del bacilo tuberculoso al medio de cultivo (86). Posteriormente comprobaron que también crecía con el agregado de otro tipo de micobacterias e incluso con extractos preparados a partir de ellas con solventes orgánicos, concluyendo que este tipo de micobacterias requiere el agregado de una “sustancia esencial” que es vital para su crecimiento (86). Años después se logró el aislamiento de ese elemento a partir de *Mycobacterium phlei* (Mp), una micobacteria no patógena y de rápido crecimiento (87), mediante la cristalización con complejos de aluminio (10). Este logro fue sucedido por nuevas investigaciones en relación a la purificación del elemento y a la recuperación de este tipo de factor de crecimiento a partir de otras micobacterias, al que le dieron el nombre de micobactina (88–90). Fueron reportados gran cantidad de factores de crecimiento extraídos a partir de bacterias, y el factor común entre ellos fue la fuerte capacidad quelante que tenían sobre el hierro.

Es lógico pensar entonces, y de hecho está comprobado, que la producción de micobactina se incrementa cuando existe en el medio de cultivo una deficiencia de hierro (91,92).

En base a los estudios mencionados, ahora se sabe que la micobactina es un sideróforo necesario para el crecimiento *in vitro* de Map, derivado del salicilato, hidrofóbico, y que es producido por ciertos tipos de micobacterias ya que forma parte de su pared celular.

In vivo, Map posee aparentemente mecanismos de adquisición del hierro por una vía alternativa. Se ha detectado en el genoma de la cepa de referencia K10 un homólogo al *cluster* genético *mbtA* (perteneciente a *M. tuberculosis*), el cual codifica la primera enzima que actúa sobre el ácido salicílico para la formación de micobactina; sin embargo, éste se ve bloqueado inactivando la producción (93).

Dado que la micobactina se necesita para el diagnóstico mediante cultivo bacteriológico, desde hace años se ha intentado su producción. La primer micobactina producida y utilizada fue la micobactina P[®], extraída a partir de cultivos de *Mycobacterium phlei*, y de ahí su nombre (91). Posteriormente se extrajo micobactina J[®], llamada así por porque se creía que era producida por una cepa de crecimiento rápido de Map (89), aunque posteriormente se descubrió que esa cepa (cepa 18) era de Maa (94). Esta micobactina J[®] actualmente es la que se utiliza de rutina, y es importada y muy costosa, lo que limita la utilización del cultivo como técnica diagnóstica.

En el presente trabajo se evaluó la implementación de un medio de cultivo líquido para el desarrollo temprano de Map evidenciando su crecimiento mediante la coloración de ZN de manera de acelerar los tiempos diagnósticos utilizando la técnica de oro. Los aislamientos obtenidos fueron corroborados mediante técnicas moleculares como PCR IS900 y caracterizados mediante MIRU – VNTR Y SSR.

Por otro lado, se obtuvo micobactina a partir de la cepa D4ER de *Mycobacterium avium* subsp *avium* (Maa). Se evaluó y cuantificó suplementando el medio de cultivo desarrollado, en comparación con la micobactina comercial. Este producto no es desarrollado actualmente en el país por lo que para su adquisición es necesaria la importación. En esta tesis se demuestra la eficiencia biológica de la micobactina nacional en relación con la micobactina importada mediante su utilización en medios de cultivo líquidos implementados y analizados en esta misma tesis, dando lugar a una alternativa económica para la extensión en los usos del cultivo bacteriológico.

HIPÓTESIS

El desarrollo de un medio de cultivo líquido que permita mejorar el acceso a los nutrientes, en combinación con técnicas moleculares, permitirán mejorar el diagnóstico de Map mediante una disminución en el tiempo de detección de la bacteria. Asimismo, la producción de una micobactina nacional, permitirá reducir los costos en el diagnóstico, posibilitando su uso en laboratorios de baja complejidad.

OBJETIVOS

En este trabajo nos proponemos hacer más eficiente el diagnóstico de Map mediante la técnica de oro, el cultivo bacteriológico, y disminuir los costos de su implementación en Argentina. Para eso se desarrollará un medio de cultivo

líquido que siga las bases del medio descrito por Whittington (14), adaptándolo a los recursos disponibles en nuestro país. A su vez nos proponemos disminuir el tiempo hasta la detección de los animales que se encuentren eliminando Map para que pueda ser utilizado en planes de control de la enfermedad. Se probará su eficiencia contrastándolo con el HEYM y mediante la utilización de técnicas moleculares como PCR IS900 se confirmará el diagnóstico. Otro objetivo importante para cumplir con el primer punto es la producción y recuperación de micobactina nacional para ser utilizada en los medios de cultivo para el aislamiento primario de Map a partir de muestras clínicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

ANIMALES

Para esta tesis se utilizan muestras provenientes de 248 animales en distintos estadios de la enfermedad, incluyendo sanos o silentes. Los animales muestreados se dividen en 228 bovinos de cría con predominancia de raza Aberdeen Angus y 20 de explotaciones lecheras con predominancia de raza Holando Argentino. Su rango de edad es de entre 1 y 5 años y las categorías muestreadas son vaquillonas (18), vacas (214) y toros (16). Todos los campos involucrados en esta tesis se localizan en la Provincia de Buenos Aires (figura 4), y tienen distintos status sanitarios y prevalencias de la enfermedad, no pudiendo ser determinados en cada establecimiento para los fines de esta tesis, aunque la mayoría de ellos presentaban rodeos con signos clínicos (alta prevalencia).

Las muestras fueron tomadas, en algunos casos, por veterinarios externos para el servicio diagnóstico del centro de diagnóstico e investigaciones veterinarias (CEDIVE) de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP), en su mayoría provenientes de animales en el estadio clínico de la enfermedad. También, el grupo de servicio del CEDIVE, recuperó muestras de animales pertenecientes a campos donde nos encontramos realizando un plan de control de la enfermedad, obteniendo así muestras de animales clínicos, sub clínicos y sanos o silentes.

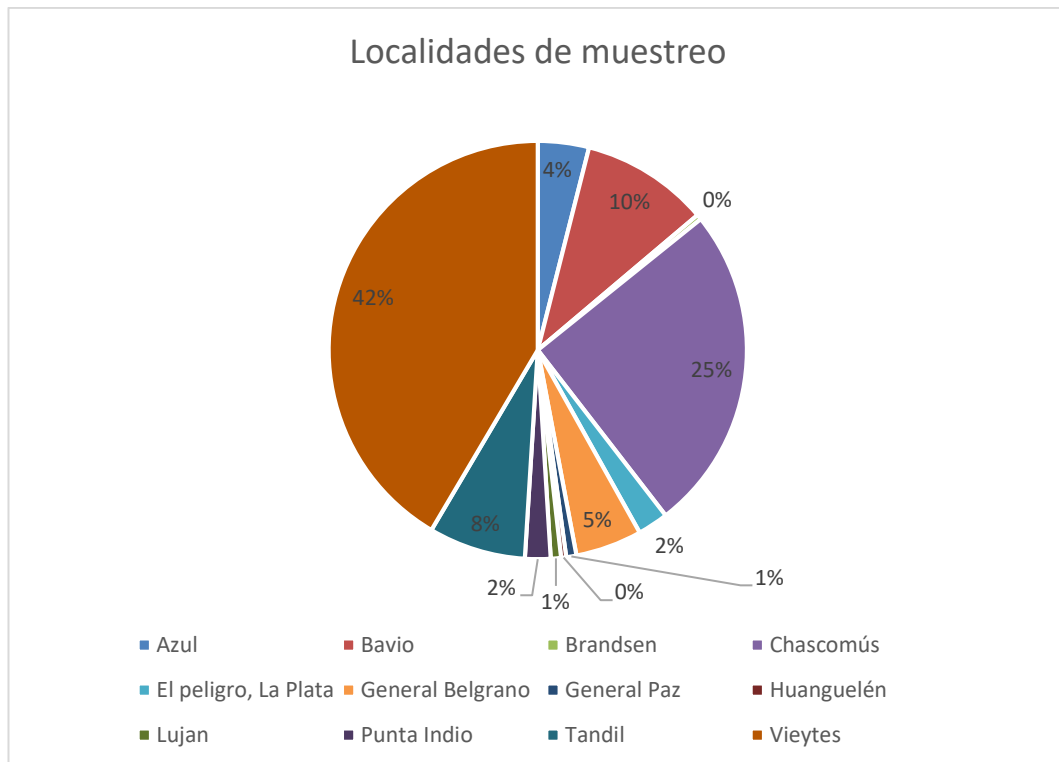


Figura 4. Gráfico de torta donde se ven representadas las localidades que participaron en los muestreos de este trabajo de tesis. Como puede observarse cerca del 70% de las muestras fueron tomadas en Chascomús y Vieytes.

Las muestras de materia fecal fueron tomadas directamente del recto de los animales, y almacenadas en bolsas plásticas correctamente rotuladas para su traslado al laboratorio y procesamiento en fresco (la decontaminación fue iniciada el mismo día de su recolección).

Las muestras de sangre fueron obtenidas mediante extracción a partir de la vena coccígea con jeringa y aguja estéril y se dejaron coagular para la obtención del suero en tubos de polipropileno de 12 mm por 75 mm.

En unos pocos casos obtuvimos muestras de tejido derivadas de la necropsia de animales con signos compatibles con la enfermedad, los cuales fueron resguardados en colectores biológicos estériles en heladera hasta su procesamiento (no más de 24 horas después).

1. Prueba preliminar del medio de cultivo líquido

Se procedió a probar el medio de cultivo líquido descrito por Whittington (14) para su implementación en nuestro laboratorio. Este medio lleva como ingredientes básicos Middlebrook 7H9 broth®, yema de huevo, mezcla de antibióticos comercial PANTA® y ADC® como suplemento de crecimiento. Nuestro primer inconveniente fue no conseguir los tubos de 30 mL utilizados en Australia, cuyas características principales son: el material de policarbonato, la base plana y las dimensiones de 27 mm de diámetro por 8 cm de altura (donde colocan 6 mL del medio de cultivo). En consecuencia, utilizamos los tubos con los que contamos en el laboratorio, de vidrio, base plana y sus dimensiones de 12 mm de diámetro por 7 cm de altura con tapa plástica a rosca.

Debido al cambio de tipo de tubo, no se logró homogeneizar el medio de Whittington en toda la columna, sino que la yema de huevo precipitó. Teniendo en cuenta que la yema de huevo es una de las fuentes nutricionales más importantes de este medio de cultivo, probamos el agregado de distintas concentraciones de agar con el objeto de lograr la homogeneidad de este ingrediente en la columna del tubo evitando la solidificación del medio. Así se probaron 10 concentraciones posibles de agar, que se describen en la tabla 4.

Tabla 4. Prueba preliminar. Concentraciones de agar en el medio para verificar la cantidad necesaria exacta.

Tubo	Concentración de agar (%)
1	1
2	0,5
3	0,25
4	0,125
5	0,06
6	0,03
7	0,015
8	0,007
9	0,0035
10	0,00175

2. Comparación de los medios de cultivo líquido y Herrold con micobactina

En el siguiente paso de este trabajo se probó la implementación del medio de cultivo líquido, con las modificaciones requeridas según los resultados de la primera experiencia, y su comparación con el medio de cultivo de HEYM. Para ello se utilizaron 144 muestras de materia fecal y 7 muestras de tejidos, estos últimos pertenecientes a dos animales muertos con signos compatibles con PTB. De las 151 muestras utilizadas en esta experiencia, se pudo obtener sangre para realizar la serología de 148.

El medio HEYM se preparó utilizando la receta de Herrold (75) y se fraccionó colocando 10 mL de medio en botellas de cultivo celular de 50 mL (imagen 5, método propuesto por Whitlock, comunicación personal). Los detalles de sus componentes se detallan en la tabla 5.



Imagen 5: Medio de cultivo sólido HEYM fraccionado en botellas de cultivo celular de 50 mL.

Por otro lado, el medio de cultivo líquido se preparó según la formulación que se detalla en la tabla 1, donde también se describen los componentes del medio de cultivo de Whittington (14) en el que toma base este medio. El medio de cultivo líquido experimental se preparó utilizando Middlebrook ADC® como suplemento comercial para el aporte de albúmina, dextrosa y catalasa, y se fraccionó colocando 5 mL en tubos de vidrio con tapa plástica a rosca (imagen 6).



Imagen 6. Medio de cultivo líquido experimental fraccionado 5 mL de medio por tubo de vidrio.

Tabla 5. Composición (para un litro) de cada medio.

Ingredientes	A ⁽¹⁾	B ⁽²⁾	C ⁽³⁾
Base medio M7H9*	3,1 g	3,1 g	
Albúmina bovina* ¹	1,34 g	1,6 g	
Dextrosa* ²	0,52 g	0,64 g	
Catalasa	0,8 mg	9,6 mg	
Bacto casitone®* ³	666 mg	680 mg	
Cloruro de sodio	0,22 g	0,22 g	4,5 g
Yema de huevo	167 mL	170 mL	120 mL
Micobactina j	0,8 mg	1 mg	2 mg
Panta plus®	30 mL	30 mL	
Ácido nalidíxico		200 mg	100 mg
Nistatina		800 mg	800 mg
Vancomicina			100 mg
Agar* ⁴		1,8 g	15,3 g
Peptona de carne			9 g
Piruvato de sodio			4,1 g
Extracto de carne			2,7 g
Glicerol			34 mL
Verde de malaquita al 2%			5,2 mL
Agua tridestilada	800 mL	770 mL	840,9 mL

¹. Medio descrito por Whittington *et al.* (2013).

². Medio líquido experimental del trabajo.

³. Medio sólido HEYM.

*Difco BD. Lote: 9076359

*¹Laboratorio Internegocios S.A., lote: 3682

*²Anedra, lote: 14041

*³Difco. Lote: 741894

*⁴Britania. Lote: 251

Procesamiento de las muestras para cultivo

Las muestras de materia fecal y tejidos se decontaminaron indistintamente, utilizando el método de doble incubación – centrifugación descrito por Stabel, J (9). El inóculo para la siembra fue de 800 µL en el medio de cultivo de HEYM (determinado por la superficie de contacto con el medio) y de 100 µL en el medio

de cultivo líquido siguiendo lo propuesto en la bibliografía consultada (14). Se incubaron ambos medios en estufa a 37°C.

Seguimiento y criterios de positividad en ambos medios de cultivo

Se realizó semanalmente la observación o lectura mediante coloración de ZN de los medios de cultivo HEYM y líquido, respectivamente. En el HEYM se consideraron positivas aquellas muestras que evidenciaron al menos una colonia blanquecina, lisa, brillante y visible a ojo desnudo. Para el caso del medio de cultivo líquido, la lectura se realizó microscópicamente utilizando coloración de ZN para poner de manifiesto BAAR. Se utilizó para ello un microscopio óptico Nikon Eclipse E400 con un objetivo de 1000 aumentos y observación con aceite de inmersión de un mínimo de 50 campos. En este caso se consideraron positivas aquellas muestras que, al microscopio óptico, mostraron un mínimo de 4 BAAR agrupados y morfológicamente compatibles con Map.

Confirmación de resultados positivos

Para la confirmación de los aislamientos en ambos medios de cultivo se utilizó la técnica de PCR IS900, específico de Map, siguiendo el protocolo descrito por Collins (95). Se decidió la utilización de este segmento de inserción debido a su mayor sensibilidad, como consecuencia de estar presente en el genoma de Map en 15-25 copias (83,96). Se usaron los *primers* F: GATCGGAACGTCGGCTGGTCAGG y R: GATCGCCTTGCTCATCGCTGCCG, utilizando GoTaq® Green Master Mix, USA y el termociclador *Evo MPI M – 02*®, La Plata, Argentina y se obtuvo un producto de 280 pb que fue revelado mediante corrida electroforética en gel de

agarosa al 1%. Para la extracción de ADN del medio HEYM se tomó una colonia con ansa de platino y se diluyó en 200 μ L de agua ultra pura para PCR, sometiéndola a shock térmico mediante 3 ciclos de hervido y congelación. En el caso del medio de cultivo líquido se presentó la dificultad de la presencia de inhibidores de la PCR en el huevo, por lo que fue necesario hacer un repique a un Lowenstein Jensen con micobactina. En este medio de cultivo se observó el desarrollo de colonias en 5 a 10 días de incubación a 37°C. De allí se tomó una colonia para diluir en 200 μ L y se continuó la extracción de igual forma que para el HEYM.

Procesamiento de sangre para diagnóstico serológico

Las muestras de sangre entera obtenidas se dejaron coagular en tubos de polipropileno, previamente descriptos, para extraer suero. Los sueros se procesaron mediante la técnica de ELISA descrita por Travería, G (97) con las modificaciones de Costanzo *et al* (98) para detección de anticuerpos específicos para la enfermedad.

Análisis estadístico de la segunda experiencia

Se utilizó la prueba de diferencia de dos proporciones bayesianas para demostrar si existen diferencias estadísticamente significativas en los resultados obtenidos con ambos medios de cultivo respecto a la detección de positividad. Para este análisis se utilizó 3.1 Epidat software®, una distribución beta, prior no informativa ($a=1$, $b=1$) y 20000 simulaciones considerando un intervalo de credibilidad bayesiana (ICB) de 95%. La elección de considerar ambos medios de

cultivo con igual posibilidad de dar resultado negativo o positivo (prior no informativa) hace de nuestro análisis estadístico una herramienta más objetiva para valorarlos, ya que del nuevo medio de cultivo aún no hay información que lo ajuste.

Para la valoración del tiempo hasta la detección de las muestras positivas se utilizó Kruskal – Wallis sin distinguir entre muestras de materia fecal y de tejidos.

La sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo de ambos medios fueron calculados utilizando una herramienta estadística relativamente nueva que se utiliza cuando no existe una prueba diagnóstica de oro, ésta se denomina “prueba de modelos latentes” (99) y toma en cuenta los resultados de todas las técnicas diagnósticas disponibles en su conjunto, considerando que todas ellas tienen un grado de error. Para realizar dicho análisis se utilizó el procesador *on line: Modelling of Infectious Disease Center* (MICE) Solutions de la universidad de Oxford (<http://mice.tropmedres.ac/joblist.aspx>) en su interfaz avanzada para 3 técnicas diagnósticas sobre una población en estudio (Model 104) colocando los resultados de ambos medios de cultivo y del ELISA.

Dado que la PCR IS900 no se realizó a partir de la muestra original sino del/los cultivos, no pudo ser incluida en este análisis. Sin embargo, se procedió a ajustar la especificidad arrojada por la prueba de modelos latentes con los resultados de la PCR IS900.

Con los valores de sensibilidad y especificidad de cada medio de cultivo obtenidos con la prueba de modelos latentes y, en el caso del medio líquido, la especificidad ajustada según los resultados obtenidos con la PCR IS900, se

realizaron las curvas de ROC comparadas y se calculó el área bajo la curva (AUC) para cada uno.

3. Valoración del medio de cultivo líquido experimental

El alto costo requerido para la realización del medio de cultivo HEYM y su menor rendimiento respecto del medio de cultivo líquido, sumado a los buenos resultados obtenidos en la segunda experiencia hicieron que este medio fuera reemplazado por el medio líquido en nuestro laboratorio. No solo se dejó de utilizar para este trabajo de tesis sino también para el servicio diagnóstico que ofrece nuestro grupo de trabajo. Así, en esta tercera experiencia se realizó la siembra de 101 muestras de materia fecal en el medio de cultivo líquido, se utilizó el mismo protocolo descrito anteriormente para la decontaminación, siembra, seguimiento y confirmación. A su vez, de estos 101 animales se obtuvo sangre de 91 de ellos para el diagnóstico serológico.

Si bien las muestras que se describieron para esta experiencia fueron 101, con el objetivo de hacer más robusto y fehaciente el análisis estadístico, se sumaron los resultados de las muestras sembradas en el medio líquido para la segunda experiencia (151) dando un total de 252 cultivos de los cuales tenemos el resultado de la serología de 237 de ellos.

Con estos datos, analizamos nuevamente los valores de sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivo y negativo del medio de cultivo líquido: repetimos el análisis de modelos latentes bayesianos, pero utilizando los resultados de la confirmación mediante PCR IS900 como tercera prueba

diagnóstica, para poder valorar en conjunto los resultados del medio líquido, el ELISA y la confirmación de la presencia de Map en esos animales.

4. Indicadores cromógenos de crecimiento. Prueba preliminar

Durante la implementación del medio de cultivo líquido fue notoria su principal desventaja: el crecimiento no se evidencia a simple vista y, por lo tanto, es necesario realizar coloración de ZN semanalmente. Es por este motivo que se intentó la incorporación en el medio de cultivo de 4 indicadores de crecimiento (viraje de color) para mejorar la practicidad de su uso.

Se utilizaron en principio 8 tubos de vidrio con 5 mL de medio de cultivo líquido en los cuales se probaron por duplicado resazurina y tetrazolium, como indicadores de reacciones REDOX, y verde de malaquita y rojo fenol, como indicadores de variación de pH, a una concentración de 250µg/mL. Debido a la distorsión que genera la yema de huevo, en los medios de cultivo sin sembrar, la resazurina se observó color violeta, el tetrazolium color amarillo, el verde de malaquita color celeste y el rojo fenol color anaranjado. Se sembró en estos tubos aislamientos de *Mycobacterium chelonae* (*M. chelonae*), una micobacteria de crecimiento rápido, a fin de obtener un resultado rápido sobre la eficacia de estos indicadores. Se incubaron durante 7 días a 37°C y se evaluó el cambio de color.

Posteriormente, en un segundo paso, se utilizaron 4 tubos idénticos a los anteriores donde se agregó tetrazolium 250 µg/mL en cada uno: en el primero se sembró *M. chelonae*, en el segundo se sembró *Map* mediante el repique de una cepa diagnosticada en el medio de cultivo líquido sin indicador de crecimiento, la cual fue confirmada por PCR IS900 y el tercero y el cuarto se dejaron sin sembrar

como controles negativos. Se realizó coloración de ZN para la valoración de crecimiento en cada prueba.

5. Elección del medio de cultivo y de la cepa micobacteriana más adecuada para la producción de micobactina nacional

Una de las dificultades que presenta la utilización del medio de cultivo como prueba diagnóstica es la necesidad de suplementar con el sideróforo micobactina para el desarrollo de Map. Este producto actualmente se produce en Estados Unidos y se comercializa por Allied Monitor Inc., Fayette, USA como micobactina J®. Por lo tanto, tiene un costo elevado y su importación tarda entre 3 y 6 meses.

Esta experiencia es el punto de partida para cumplir con el siguiente objetivo de este trabajo de tesis: la producción, extracción, actividad biológica y valoración de micobactina nacional. Para ello se procedió a la selección del medio de cultivo y cepas para el desarrollo de masa micobacteriana.

Se evaluaron diferentes medios de cultivo para la recuperación de masa bacteriana, a partir de *Mycobacterium phlei* (Mp, cepa de referencia de SENASA), *Mycobacterium smegmatis* (Ms, cepa de referencia mc²155 (100)) y *Mycobacterium avium* subsp *avium* (Maa, cepa de referencia D4 ER) para determinar en qué medio es conveniente crecer la micobacteria productora de micobactina y cuál es la micobacteria más indicada según los resultados observados en la eficiencia de las micobactinas resultantes. Todos los medios de cultivo utilizados fueron seleccionados bajo la premisa de que la deficiencia o

ausencia de hierro favorece la expresión de micobactina en la pared micobacteriana.

Los medios de cultivo probados fueron los siguientes:

- Lowenstein Jensen con el agregado de agar al 1,5% el cual fue fraccionado en tubos de vidrio de 1,8 cm de diámetro por 10 cm, colocando aproximadamente 12 mL de medio en cada uno y solidificado en pico de flauta. En la sección de resultados lo mencionaremos como M1.
- Bifásico con base en el protocolo de Lowenstein Jensen. La fase sólida se preparó al igual que el medio anteriormente descrito, pero sin harina de papa y con el aumento del pH mediante la sustitución del fosfato de potasio monobásico por el fosfato de sodio dibásico, quedando regulado en 7. Este medio se autoclavó en botellas de Roux dejándolos inclinados para que solidifique de esa manera. Una vez sólido se agregó el caldo o fase líquida de este medio, el cual se preparó con los siguientes ingredientes: 320 mL de agua destilada; 0,077 gr. de fosfato disódico; 0,05 gr. de sulfato de magnesio; 0,12 gr. de citrato de magnesio; 0,72 gr. de asparragina; 2,8 mL de glicerina. En la sección de resultados lo llamaremos M2.
- Medio sólido descrito por Hall y Ratledge (101) fraccionado en tubos formando un pico de flauta. En los resultados lo llamaremos M3.
- Medio bifásico con base en el descrito en el trabajo de Hall y Ratledge (101). Se fraccionó en botellas de Roux colocando 200 mL de medio sólido y posteriormente entre 150 y 200 mL de medio líquido. En los resultados lo mencionaremos como M4.

Los dos últimos medios de cultivo tienen escaso contenido de hierro para favorecer la producción de micobactina por parte de las micobacterias (91).

En los primeros dos medios descritos se sembró Mp y en los dos últimos se sembraron Mp, Ms y Maa. En todos los casos se incubó en estufa a 37°C.

Las micobactinas producidas por Mp y Maa fueron las elegidas para continuar la producción y recuperación con el fin de evaluar su efectividad (88). Esta decisión se tomó sobre la base de que fueron la micobactina P® y la micobactina J® las que se utilizaron en investigación con buenos resultados (88,91,102).

Se probó la utilización de otros medios de cultivo para la producción y mantenimiento de masa bacteriana continua de Mp y Maa con el fin de recuperar mayor cantidad de micobactina a partir de ellas:

- Caldo glicerinado: Este medio de cultivo se preparó con los siguientes ingredientes: 5gr de extracto de carne, 5gr de cloruro de sodio, 1,5gr de peptona de carne, 70 mL de glicerina y 1 Lt de agua tridestilada y se fraccionó colocando 200 a 250 mL en botellas de Roux estériles según el tamaño (chica o grande, imagen 7). Se sembró y mantuvo en incubación a 37°C por un período variable entre 20 y 30 días.
- Dorset: este medio se preparó con 14 gr de L- asparragina monohidrato, 0.9 gr de citrato trisódico dihidrato, 1.8 gr de fosfato de potasio dibásico, 1.5 gr de sulfato de magnesio, 0.3 gr de citrato férrico n-hidrato, 70 mL (Maa) o 7 mL (Mp) de glicerol, 10 gr de glucosa al 1% w/v (dextrosa anhidro) y 1 litro de agua tridestilada. Se ajustó el pH a 7 – 7.2 utilizando hidróxido de sodio 1N y se fraccionó en botellas de Roux estériles

colocando 200 o 250 mL en cada una según el tamaño. Se autoclavó, se sembró y mantuvo en incubación a 37°C por un período variable entre 20 y 30 días.

Se cosecharon los botellones con Mp y Maa a partir de ambos medios de cultivo (caldo glicerinado y Dorset) y se realizó la extracción de las micobactinas utilizando el método de Snow (87).

Todos los extractos obtenidos a partir de Ms, Maa (del medio de Dorset y del caldo glicerinado) y Mp (del medio de Dorset y del caldo glicerinado) fueron sembrados en una placa de sílica para comprobar la presencia de micobactina mediante cromatografía en capa delgada (TLC).

6. Prueba biológica preliminar de las micobactinas obtenidas a partir de Maa, Ms y Mp

A partir de las micobactinas obtenidas en la experiencia descrita previamente, se realizaron dos ensayos:

- Primer ensayo: se preparó medio de cultivo líquido colocando tubos con cada una de las micobactinas obtenidas (cantidad desconocida), con micobactina J® como control positivo y sin micobactina como control negativo. Luego, se realizó un repique en cada uno a partir de un cultivo líquido positivo. Se revisaron semanalmente mediante coloración de ZN y observación microscópica para determinar crecimiento.
- Segundo ensayo: se preparó medio de cultivo líquido colocando tubos con cada una de las micobactinas obtenidas (cantidad desconocida), con micobactina J® como control positivo y sin micobactina como control

negativo. Luego, se sembraron dos muestras de materia fecal provenientes de animales con signología de la enfermedad. Las muestras fueron decontaminadas mediante la técnica de doble incubación (9) y sembradas a razón de 100 μ L por tubo. El seguimiento para determinar si hubo o no desarrollo de Map se realizó de igual forma que en el primer ensayo.

Con los resultados de estos dos ensayos se decidió continuar la producción de masa bacteriana de Maa en caldo glicerinado para cosechar y extraer micobactina.

7. Extracción y purificación de micobactina nacional

Se calculó el peso húmedo y seco de la cosecha de Maa crecido en caldo glicerinado según el tamaño de botella de Roux utilizada. A partir de la botella grande se cosechó Maa con peso húmedo de 15, 18 gr y un peso seco de 2,3 gr, mientras que partiendo de la botella chica obtuvimos una cosecha de 8,52 gr de peso húmedo y 1,31 gr de peso seco.

Para la posterior extracción de micobactina, cuantificación y evaluación de eficiencia económica, se realizó la cosecha de Maa de un pool de botellas de Roux formado por 11 grandes y 3 chicas (imagen 7).



Imagen 7. Se observan botellas Roux grandes y chicas con caldo glicerinado recién preparado (250 y 200 mL respectivamente).

Se cosechó la masa bacteriana de Maa a partir de las botellas de Roux utilizando filtro de papel N°1 y se inactivó mediante el agregado de etanol 97% en cantidad necesaria. Se colocó el conjunto de la masa bacteriana con alcohol en Erlenmeyer o botella tipo Mariotte y se vertió cloroformo en cantidad equivalente a dos veces el contenido. Se agregó cloruro férrico al 5%, aproximadamente 5 mL para impartirle color a la micobactina y de esa manera poder visualizarla y facilitar la extracción. Se separaron las dos fases y se realizaron los lavados con agua tridestilada, tomando la fase clorofórmica que queda abajo (imágenes 8 y 9) y eliminando la fase acuosa con restos bacterianos y otras impurezas.



Imagen 8.

Imagen de la izquierda: se observa la separación de fases en Erlenmeyer. En la fase superior se encuentra el alcohol, impurezas y restos de cloruro férrico. En la fase que se encuentra abajo está el cloroformo y la micobactina adsorbiendo al cloruro férrico que le imparte color. Entre ambas fases, los somas bacterianos cosechados.

Imagen de la derecha: se observa la separación de las fases igual que en la imagen de la izquierda, pero en botella tipo Mariotte, lo que facilita la recuperación de la fase clorofórmica con menor cantidad de impurezas que con la utilización de Erlenmeyer y pipeta.



Imagen 9. se observa la micobactina local fraccionada en tubos de 50 mL para posteriormente proceder con la concentración mediante roto evaporación.

Posteriormente se llevó la fase clorofórmica a una roto evaporación a 60°C (roto evaporador Senco, China) y recuperamos los residuos (micobactina) del

balón (imagen 10) con 16 mL de etanol. Este protocolo fue descrito por Snow (87) para la recuperación de micobactina.



Imagen 10. En la imagen de la izquierda observamos el roto evaporador utilizado para el trabajo. En la imagen de la derecha se observan residuos color marrón rojizo donde estaría la micobactina.

Cromatografía en capa delgada

Se corroboró la presencia de la micobactina mediante una cromatografía en capa delgada (del inglés *Thin Layer Chromatography*, TLC) utilizando un gel de sílica 60 F254 (20 x 20 cm, 1 mm de espesor) y como control positivo micobactina J® utilizando el color impartido por el cloruro férrico para la detección de la banda. Los solventes utilizados para correr el analito en cuestión fueron éter de petróleo, n-butano y acetato de etilo en proporción 2:3:3 (102) y se realizó en una cuba de vidrio y con campana extractora, dada la toxicidad de estos vapores.

Purificación de la micobactina extraída

Debido a la presencia de impurezas en el extracto, se probó la purificación mediante la utilización de alúmina activada (103) y filtros de papel N° 1 activada. Este método no fue efectivo ya que la micobactina quedó retenida en la alúmina y no pudo ser eluída, evidenciado esto por la coloración marrón rojiza impartida por el cloruro férrico.

Posteriormente, procedimos a la purificación recuperando mediante raspado del gel de sílica la micobactina directamente de la banda en la placa de TLC. Si bien no nos proporciona la posibilidad de purificar grandes cantidades, si nos permite estimar el rendimiento, y en un futuro cuantificar mediante métodos delicados como cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) o espectrometría de masa.

8. Cuantificación de la micobactina nacional producida

Cuantificación de la micobactina nacional

Se evaluaron distintos métodos para la cuantificación de la micobactina obtenida.

1. Por un lado, se utilizó el procesador de imágenes gratuito ImageJ 1.8® para cuantificar mediante densitometría a partir de una foto de la TLC comparativa. En este caso en la TLC se sembraron dos calles, una con micobactina J® y otra con micobactina nacional sin purificar. En ambos casos se sembraron 5 µL, con lo cual, teniendo en cuenta la dilución de la micobactina comercial, nuestro estándar debería tener 10 µg. Se realizaron mediciones con y sin fluorescencia para el contraste (imagen 11).

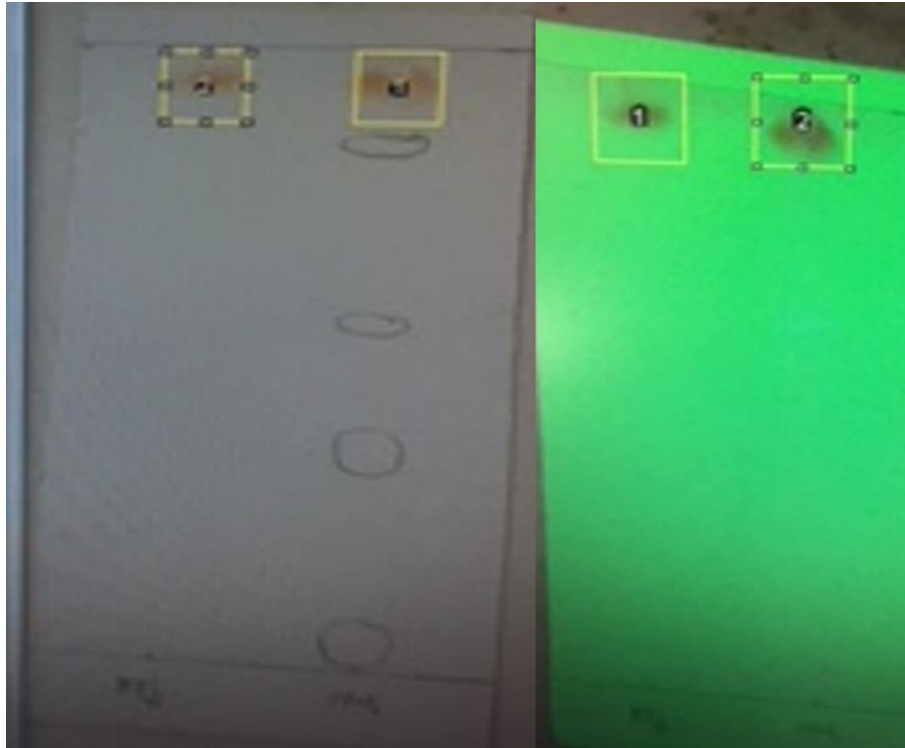


Imagen 11. TLC de MJ y MN comparativa para la cuantificación mediante escaneado en ImageJ® sin contraste (izquierda) y con fluorescencia de contraste (derecha).

2. Se realizó una prueba de eficiencia utilizando medio de cultivo líquido con distintas concentraciones de MN (sin purificar) y, como controles positivos, con la comercial. Para el cálculo de concentraciones de MN se partió de los resultados obtenidos con el procesador ImageJ 1.8®. Como esta prueba nos aporta información sobre la eficiencia, pero también responde a la implementación de la MN, será detallada en ese apartado.
3. Por otro lado, se midió la densidad óptica con espectrofotómetro Multiskan Plus P versión 2.03 a una longitud de onda de 405 nm (103). Se realizaron diluciones seriadas con metanol de una cantidad conocida de micobactina J® (2 mg/ml). Se inició con 50 µl de la solución madre y 400 µl de metanol, obteniendo una concentración inicial de 222 µg/ml (dilución A, tabla 6). Se obtuvo una curva patrón basada en las densidades

ópticas obtenidas a partir de cada dilución y a partir de ella se realizó una regresión lineal.

Se realizó el mismo procedimiento con la MN purificada a partir del raspado de la placa de TLC y sin purificar. Este método se sustenta en que ambas micobactinas estén unidas al cloruro férrico que les imparte color, por lo que, haciendo una relación directa, a mayor densidad óptica, mayor cantidad de micobactina.

Tabla 6. En esta tabla se detallan las concentraciones utilizadas para la curva patrón.

Dilución	Concentración de MJ
A	222 µg/mL
B	111 µg/mL
C	55,5 µg/mL
D	27,75 µg/mL
E	13,87 µg/mL
F	6,93 µg/mL

Luego, se sembraron las diluciones en una placa de 96 pocillos, por duplicado y colocando 100 µL en cada uno. En la misma placa se sembraron diluciones seriadas de la MN, partiendo de una concentración desconocida, pero utilizando para la dilución las mismas cantidades de solución madre (50 µL) y metanol (400 µL) que para el patrón. En la placa se dejaron pocillos en los que se sembró metanol (100 µL también) para tener una medición base como control negativo y se sembraron diluciones de la MN sin purificar, tanto de la séptima experiencia, de la cual sabemos de cuánta masa bacteriana partimos, como de la sexta experiencia, en la cual se recuperó micobactina, pero no se registró la masa bacteriana inicial (tabla 7).

Tabla 7. Esquema de siembra para la lectura de densidades ópticas con espectrofotómetro a 405 nm de longitud de onda.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	DIL A		DIL B		DIL C		DIL D		DIL E		DIL F	
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Referencias

Amarillo: micobactina J®. Verde: Micobactina nacional (de la séptima experiencia) purificada. Fucsia: Micobactina nacional (de la séptima experiencia) sin purificar. Blanco: metanol. Celeste: Micobactina nacional (extraída a partir de Maa de la sexta experiencia) sin purificar.

Se analizaron los resultados de las densidades ópticas utilizando los resultados de una curva de regresión realizada sobre el patrón, donde obtuvimos la ecuación de la recta $y=mx+b$, donde y es la absorbancia a 405 nm, m es la pendiente, x es la concentración y b es la ordenada al origen, y obtuvimos también el valor de r^2 . Así se logró sacar la concentración extrapolada de cada micobactina “incógnita”. A partir de esos resultados pudimos obtener la cantidad de micobactina total obtenida a partir de los 11 botellones en la séptima experiencia sin purificar y la cantidad total obtenida en la sexta experiencia (que fue la primera en utilizarse para comprobar su eficacia y actividad biológica).

9. Implementación de la micobactina nacional en el medio de cultivo líquido

Se preparó medio de cultivo líquido tal como se describe previamente en este trabajo de tesis utilizando, por un lado, micobactina J® en la cantidad establecida y, por otro, MN en cantidad conocida (1 mL) pero concentración desconocida y sin purificar. Dicha micobactina fue producida en la sexta y cuantificada en la octava experiencia utilizando el tercer protocolo (cuantificación basada en la absorbancia y extrapolación a partir de la curva patrón). En la tabla 7 se puede observar en color celeste.

Las muestras utilizadas para la prueba biológica preliminar fueron de materia fecal perteneciente a animales con ELISA positivo previendo una mayor probabilidad de encontrar micobacterias en las heces de estos animales. Se decontaminaron y sembraron de forma pareada en ambos medios de cultivo líquido muestras de 35 animales siguiendo el protocolo como se describió previamente en esta tesis para el medio de cultivo líquido. Los resultados positivos fueron corroborados mediante PCR IS900.

De esta manera, se pudo observar si existe o no crecimiento y si los tiempos de incubación para ese crecimiento son similares o diferentes. Así pues, podremos definir la eficacia de la micobactina producida, aunque no así su eficiencia.

Para el análisis estadístico de la novena experiencia se utilizó el coeficiente de correlación Kappa para comparar los resultados obtenidos en los medios de cultivo líquido con micobactina J® y con micobactina nacional utilizando el procesador estadístico *on line* VassarStats (<http://vassarstats.net/index.html>). Para analizar los tiempos de incubación hasta determinar crecimiento en cada medio de cultivo se realizó análisis de varianza (ANOVA) mediante el procesador

StatGraphics®. En ambos casos se consideró un nivel de confianza del 95% (IC=95%).

10. Prueba de eficiencia de la micobactina nacional

Se preparó medio de cultivo líquido con MN en el cual se reemplazó el uso del ADC ® comercial por la preparación casera utilizando dextrosa anhidro y seroalbúmina bovina, y se retiró el uso del PANTA®. La micobactina nacional se utilizó en el medio de cultivo líquido en 8 concentraciones distintas, con 5 repeticiones para cada una. Para esto se realizaron diluciones seriadas partiendo de una concentración que asumimos por los resultados arrojados por el programa ImageJ sería de 1,5 mg/Litro de medio. Teniendo en cuenta que este tipo de medios de cultivo funciona con hasta un mínimo de 0.8 mg de micobactina J® por Litro de medio (12,14) estaríamos comenzando con una concentración casi al doble de lo necesario (tabla 8). Como control positivo se utilizó medio de cultivo líquido con micobactina J® en la concentración estipulada anteriormente en este trabajo para este medio (1mg/Litro) y 2 repeticiones. La siembra fue de materia fecal de un solo animal, donde la carga bacteriana era tan alta que se pudieron ver los BAAR en el ZN directo de la materia fecal. La alta carga de Map fue corroborada posteriormente mediante qPCR con sistema IS900 (104). La decontaminación se realizó con el mismo protocolo descrito anteriormente, y el inóculo fue el mismo para todos los tubos siendo de 100 µL en cada uno.

Tabla 8. Concentraciones teóricas de la MN en los medios utilizados para la prueba de eficiencia

	1	2	3	4	5	6	7	8
CT	1,5	0,75	0,375	0,1875	0,09375	0,046875	0,02343	0,01171

Referencia. CT: Concentración teórica de la MN expresada en mg/L según la cuantificación con el ImageJ®

Con los resultados obtenidos en esa primera prueba de eficiencia fue necesario repetirla con diluciones mayores para encontrar aquella en la que ya no crezca Map. Así, en ese segundo paso se realizaron 6 diluciones seriadas 1 en 3, con 5 repeticiones cada una. La primera concentración teórica fue la misma que para la primera prueba: 1,5 mg/L (según los resultados obtenidos con el Image J®. Tabla 9), como control positivo se utilizó medio de cultivo líquido con micobactina J® en la concentración estipulada anteriormente en este trabajo para este medio (1mg/Litro) y 2 repeticiones. La siembra fue de materia fecal del mismo animal descripto para la primera prueba de eficiencia.

Tabla 9. Concentraciones teóricas de la MN en los medios utilizados para la prueba de eficiencia

	1	2	3	4	5	6
CT	1,5	0,5	0,166	0,055	0,01851	0,00617

Referencia. CT: Concentración teórica de la MN expresada en mg/L según la cuantificación con el ImageJ®

11. Genotipificación de los aislamientos obtenidos

Los aislamientos obtenidos en este trabajo de tesis fueron sometidos a la técnica de genotipificación de Map MIRU VNTR (*Variable Number Tandem Repeats*) (24–26), usando 8 MIRU VNTR loci (MIRU 292, MIRU X3, VNTR 25, VNTR 47, VNTR 3, VNTR 7, VNTR 10 y VNTR 32) con los *primers* descriptos previamente por Thibault (24). La técnica consiste en la clasificación, según el

número de repeticiones de cada MIRU VNTR, en cada cepa (INMV) (15). Los patrones INMV (1 a 241 (105)) se obtuvieron verificando en una base de datos MAC - INMV (<http://mac-inmv.tours.inra.fr/>).

Durante los años 2017 y 2018, se procesaron 32 aislamientos, utilizando para la genotipificación, tanto el protocolo del mix como el protocolo de ciclado descritos por Imperiale (15) con una desnaturalización inicial de 3' a 95°C, seguido por tres ciclos de 30'' a 95°C, 30'' a 62°C (-0,5°C/ciclo) y 30'' a 72°C, que se continúa por 30 ciclos de 30'' a 95°C, 30'' a 58°C y 30'' a 72°C, y por último una extensión final de 7' a 72°C. Se realizaron ciertas modificaciones en el protocolo tanto del mix como del ciclado para lograr la amplificación de los MIRU VNTR.

Finalmente, se procesaron 13 muestras más el control positivo (cepa de referencia K10) con el protocolo de mix que incluyó 2,5 mM de MgCl₂, 2 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), 1,25 U Taq polimerasa, 2,5 µL de buffer e igual cantidad de betaína. Por cada mix de reacción se colocaron 10 pmol de cada *primer*. Como control positivo se utilizó la cepa de referencia de Map K10. El ciclado consistió en desnaturalización inicial 5' a 94°C, seguido por 40 ciclos de 1' a 94°C, 1' a 59°C y 1' a 72°C, y por último una extensión final de 10' a 72°C. El termociclador utilizado fue el Applied biosystems SimpliAmp thermal cycler de life technologies (Thermofisher®).

Para determinar el peso molecular y estimar el número de repeticiones en tándem presentes en cada locus, se sembraron los productos de la amplificación en gel de agarosa 2% incluyendo marcador de peso molecular de 50bp. Se digitalizó el gel

utilizando el *Gel Doc TM* (Bio-Rad). Los resultados fueron analizados utilizando la base de datos *on line* internacional MAC INMV (http://mac-inmv.tours.inra.fr/index.php?p=fa_ident).

RESULTADOS

1. Prueba preliminar del medio de cultivo líquido

Con el fin de optimizar el medio de cultivo líquido descrito por Whittington (14), se evaluaron distintas concentraciones de agar con el objeto de lograr la homogeneidad de este ingrediente en la columna del tubo evitando la solidificación del medio. Los tubos N° 3 (concentración de agar de 0,25%) y N° 4 (concentración de agar de 0,125%) fueron los que mostraron mejor homogeneidad de los ingredientes sin que se solidifique el medio de cultivo (imagen 12). Tomando en cuenta el aspecto visual de la columna se decidió utilizar una concentración intermedia de 0,185%.

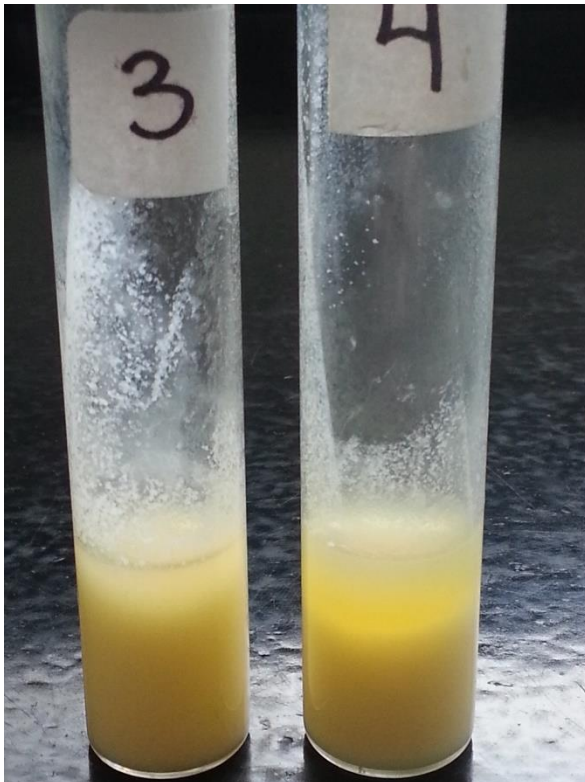


Imagen 12. Se observan los tubos N° 3 y N° 4 de la prueba preliminar para determinar la cantidad de agar que utilizaríamos en el medio de cultivo líquido.

2. Comparación de los medios de cultivo líquido y HEYM

En una siguiente etapa, se evaluó el medio líquido en comparación con el medio HEYM. Para facilidad del lector y del procesamiento de los datos, en esta sección se presentarán primero los resultados de los 146 animales cuyas muestras de materia fecal o tejidos (151 muestras en total) pudieron ser sembradas en forma pareada en ambos medios de cultivo (tabla 10).

Tabla 10. Resultados obtenidos mediante cultivo de materia fecal en HEYM y medio líquido sembrados de forma pareada y resultados del ELISA de los mismos animales.

	HEYM	Líquido	ELISA
Positivo	39*	65*	61*
Negativo	112*	86*	87*
Sin procesar	0*	0*	3*
Total	151*	151*	151*

*Corresponde al número de muestras

La prueba de diferencia entre dos proporciones bayesianas demostró que existen diferencias significativas entre los resultados del medio líquido (detectó 65 muestras positivas) y HEYM (detectó 39 muestras positivas), siendo mejor el primero, con una $p= 0.001233$.

El tiempo de incubación necesario para la detección de los animales positivos en cada medio fue extremadamente distinto en cada uno. En HEYM fue necesario esperar un promedio de 64 días en incubación para visualizar las colonias. En cambio, en el medio de cultivo líquido, se pudieron visualizar los BAAR en el microscopio en un promedio de 19 días, adelantando mucho el diagnóstico. La prueba de Kruskal Wallis determinó que existen diferencias significativas entre los tiempos de ambos, con una $p= 7,14^{-12}$ (figura 5).

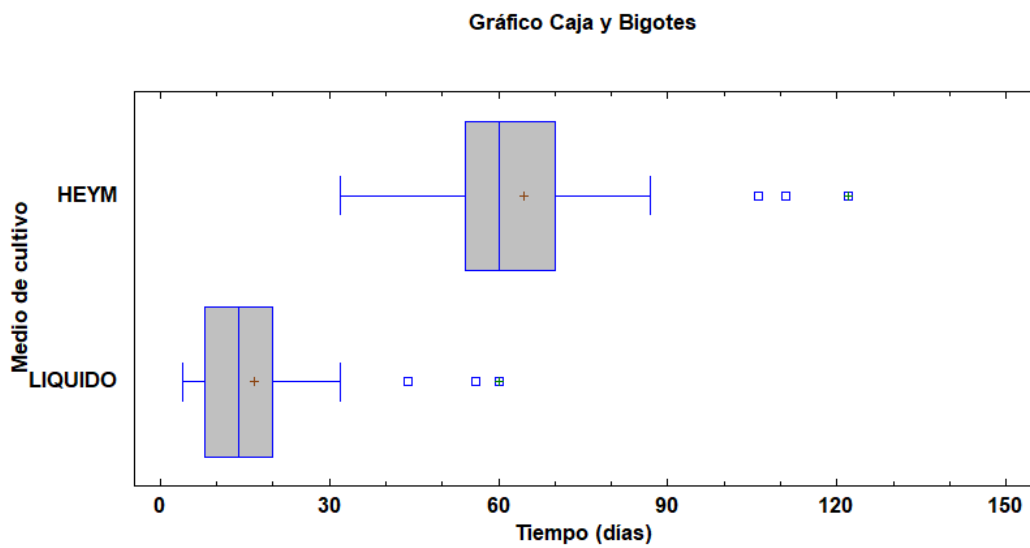


Figura 5. Gráfico de caja y bigotes donde se observan las diferencias en cuanto a los tiempos necesarios para la detección de positivos en cada medio de cultivo.

Según los resultados obtenidos con la prueba de modelos latentes realizada con la interfaz Model 104 (tabla 11), la sensibilidad fue mayor para el medio de cultivo líquido (94%) que para el HEYM (70,2%). Sin embargo, la especificidad fue menor en el primero (84%) que en el segundo (97,7%).

Tabla 11. Resultados de la prueba bayesiana de modelos latentes con la interfaz Model 104 del procesador *on line* MICE Solutions.

Parámetros	Modelos latentes bayesianos (%)
HEYM	
Sensibilidad	70.2 (45.2 - 99.8)
Especificidad	97.7 (90.9 - 100)
Valor predictivo positivo	93.9 (74.5 - 100)
Valor predictivo negativo	86.6 (66.5 - 100)
Medio líquido	
Sensibilidad	94.0 (79.8 - 100)
Especificidad	84.1 (68.4 - 99.9)
Valor predictivo positivo	74.4 (44.0 - 99.9)
Valor predictivo negativo	96.7 (86.0 - 100)
ELISA	
Sensibilidad	57.0 (41.4 - 71.2)
Especificidad	48.1 (40.9 - 58.3)
Valor predictivo positivo	35.6 (18.1 - 55.6)
Valor predictivo negativo	69.3 (50.1 - 84.7)

Dada la menor especificidad arrojada por los modelos latentes bayesianos para el medio de cultivo líquido y su inconsistencia con los resultados obtenidos con la PCR confirmatoria (IS900) es que vale aclarar que el porcentaje de positivos confirmados en el medio líquido fue de 92,3%.

Las curvas de ROC comparadas de ambos medios de cultivo se muestran en la figura 6. El AUC de HEYM fue de 0,8467 mientras que el del medio líquido fue de 0,9344, marcando una mejora sobre el primero.

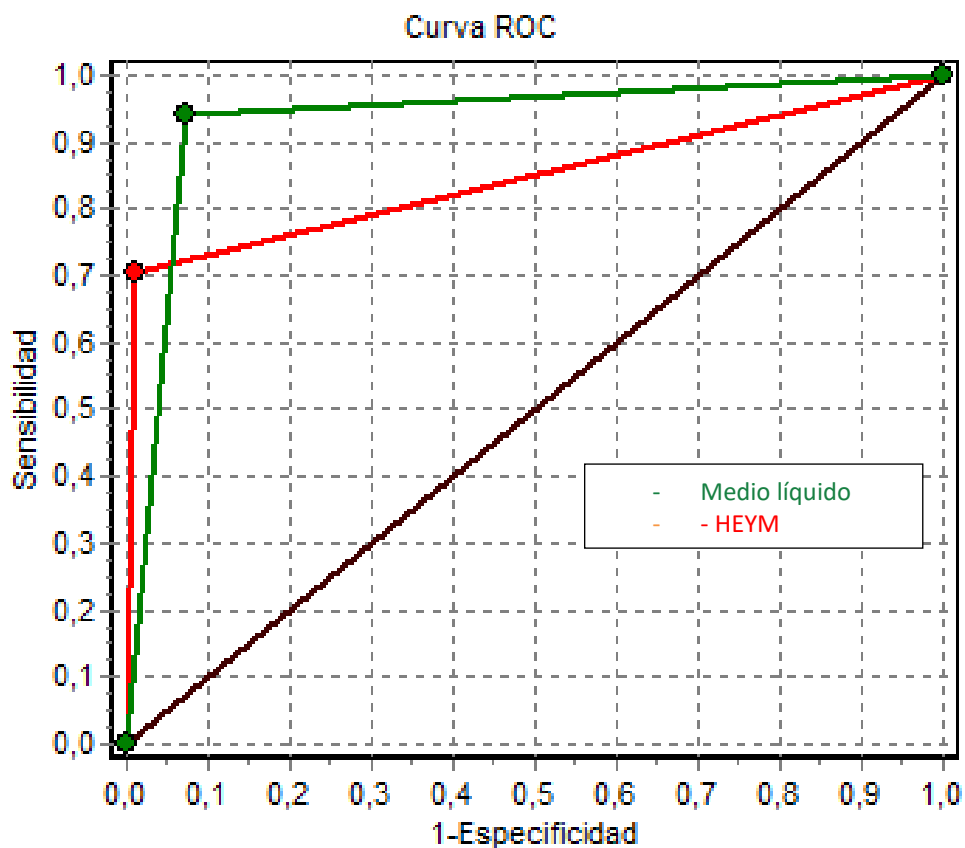


Figura 6. Curvas de ROC comparadas del medio de cultivo HEYM (rojo) y líquido (verde). Se realizó utilizando el procesador Epidat 3.1[®]

3. Valoración del medio de cultivo líquido experimental

Se analizó el medio líquido, esta vez tomando como criterio de positividad verdadera lo que aquí llamaremos *status*, que involucra la confirmación mediante PCR IS900 de aquellos cultivos que hayan resultado positivos.

Un nuevo análisis de modelos latentes fue realizado tomando en cuenta los resultados del medio de cultivo líquido, ELISA y el *status* o *gold standard* (tabla 12).

Tabla 12. Resultados obtenidos de la totalidad de muestras sembradas en el medio de cultivo líquido y su relación con los resultados del ELISA.

	Líquido	ELISA	Gold standard o status ¹
Positivo	116	116	94
Negativo	136	121	158
Sin procesar		15	
Total	252	252	252

¹Dado que se está evaluando una técnica de oro, se implementó un *gold estándar o status*¹ en el que se consideran verdaderos positivos a aquellos animales cuyo cultivo de materia fecal haya sido positivo al cultivo bacteriano y confirmado por PCR IS900.

Este análisis incorpora muestras que por motivos operativos sólo pudieron sembrarse en el medio de cultivo líquido, de manera que podamos aumentar la información aportada por esta tesis. La sensibilidad resultante para el medio de cultivo líquido con estos datos fue del 99,2% con una especificidad del 88,7% (tabla 13).

Tabla 13. Resultados de la prueba bayesiana de modelos latentes con la interfaz Model 104 del procesador *on line* MICE Solutions.

Parámetros	Modelos latentes bayesianos (%)
Medio líquido	
Sensibilidad	99.2 (95.0 - 100)
Especificidad	88.7 (80.6 - 99.8)
Valor predictivo positivo	84.0 (72.6 - 99.7)
Valor predictivo negativo	99.4 (96.5 - 100)
ELISA	
Sensibilidad	66.7 (56.3 - 76.4)
Especificidad	43.9 (40.2 - 51.3)
Valor predictivo positivo	42.7 (34.0 - 52.4)
Valor predictivo negativo	68.4 (55.2 - 78.2)
Status	
Sensibilidad	94.6 (75.9 - 100)
Especificidad	99.6 (97.1 - 100)
Valor predictivo positivo	99.3 (95.1 - 100)
Valor predictivo negativo	96.9 (83.4 - 100)

4. Indicadores cromógenos de crecimiento. Prueba preliminar

En el primer ensayo en el que se agregaron indicadores cromógenos de crecimiento, observamos cambio en los medios con resazurina y con tetrazolium (imagen 13). El medio con tetrazolium (B) viró a violeta, y en la tinción de ZN se observaron BAAR; el medio con resazurina (A) se aclaró y, aunque el viraje fue menor que el del tetrazolium, mediante la coloración con ZN observamos mayor desarrollo y fluorescencia bajo la luz UV.

Imagen 13. Medios de cultivo con indicadores de crecimiento previo a la siembra (izquierda) y luego de 7 días de incubación (derecha)

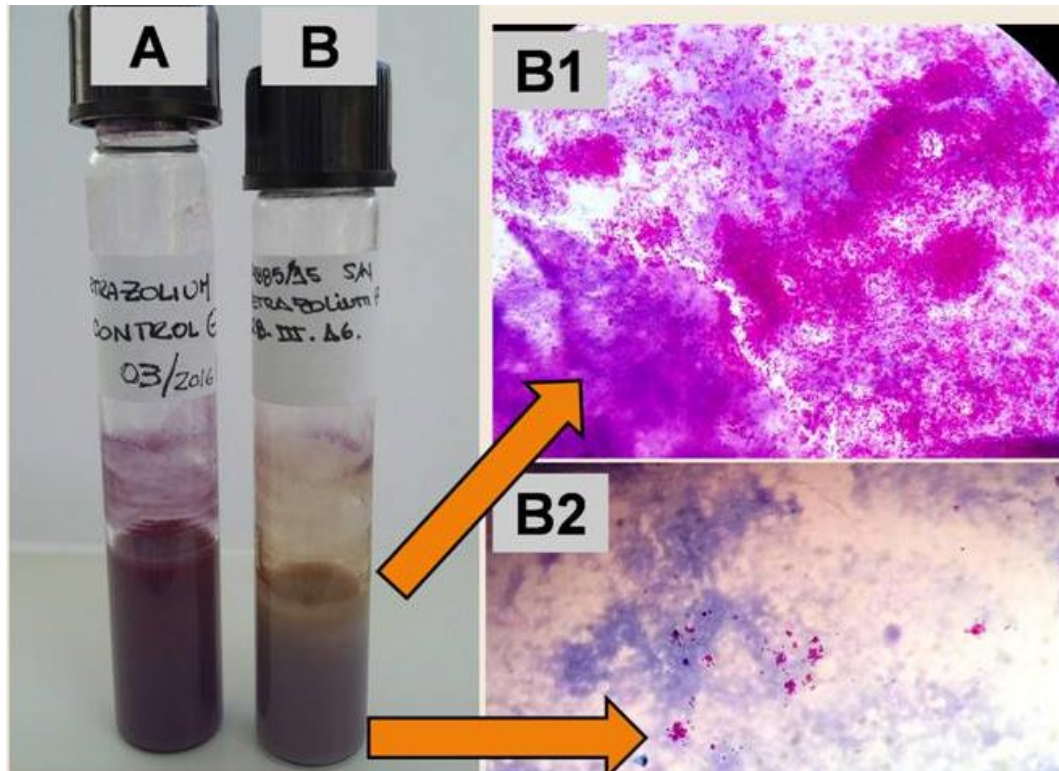


Referencias. A: resazurina; B: tetrazolium; C: verde de malaquita; D: rojo fenol. Nótese el aclaramiento de los tubos A y el claro viraje de los tubos B.

En el segundo ensayo, los 4 tubos con tetrazolium, incluidos los dos controles negativos (sin inóculo), fueron virando a color marrón a las 18h y violeta a las 36h. Pasados dos meses, tanto el tubo con *M. chelonae* como el tubo con Map mostraron un halo color amarillo en el medio de cultivo más superficial. Dados estos resultados, realizamos coloración de ZN en ambos tubos tanto del fondo del tubo como del halo superior y observamos que Map había crecido mayormente en

la superficie (imagen 14), en cambio *M. chelonae* lo hizo homogéneamente distribuido en todo el tubo.

Imagen 14. Observación macroscópica de los tubos con tetrazolium luego de 2 meses de incubación (izquierda) y la coloración de ZN tanto del halo superficial (B1) como del fondo del tubo (B2).



Referencias: tubo A: control negativo, se observa violeta homogéneo; tubo B: sembrado con Map; B1: foto microscópica de la coloración de ZN realizada al halo amarillo de la superficie del tubo B, se observan abundantes BAAR con tendencia a la agrupación; B2: foto microscópica de la coloración de ZN realizada al fondo del tubo B, se observan BAAR en poca cantidad en relación a lo observado en el halo.

5. Elección del medio de cultivo y micobacteria más adecuada para la producción de micobactina nacional

Selección del medio de cultivo y cepa micobacteriana para la producción de micobactina:

El desarrollo de las cepas en los 4 medios de cultivo que se probaron se resume en la tabla 14 y se describen a continuación:

En el M1 (Lowenstein Jensen sólido, en tubo), Mp demostró un buen desarrollo, de manera que a los 7 días ya era notable el crecimiento. En el M2 (Lowenstein Jensen bifásico, en botellas de Roux), mostró mejores resultados, siendo notable el crecimiento a los 3 días posteriores a la siembra y llegando a formar una película continua entre las fases sólida y líquida a los 15 días; además presentó como ventaja la posibilidad de contar con gran volumen de masa bacteriana en un solo tubo (imagen 15).

En el M3 (sólido glicerinado, en tubo) obtuvimos muy buenos resultados en cuanto al crecimiento de Ms, el cual a la semana posterior a la siembra ya se encontraba cubriendo casi toda la superficie del tubo; Maa desarrolló bien en este medio, aunque tardó unos días más que el anterior; por último, Mp no desarrolló en este medio (imagen 15).

En el M4 (bifásico glicerinado, en botellas de Roux), Ms desarrolló de manera rápida, formando a los 7 días una película que cubría tanto la fase sólida como la líquida; Por otro lado, tanto Mp como Maa no mostraron buen desarrollo en este

medio, en el caso de Mp directamente no mostró cambios luego de la siembra (imagen 15).

Tabla 14. Resultados del desarrollo de Mp, Ms y Maa en los medios de cultivo M1, M2, M3 y M4, descriptos en materiales y métodos.

Cepas	Medios de cultivo											
	M1			M2			M3			M4		
	3 *	7*	>10*	3 *	7*	>10*	3 *	7*	>10*	3 *	7*	>10*
Mp	+	++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-
Ms	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S	++	+++	+++	++	+++	+++
Maa	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S	+	++	+++	+	+	++

Referencias: *Tiempo en días. (-) No hubo desarrollo; (+) escaso desarrollo; (++) moderado desarrollo; (+++) abundante desarrollo; (S/S) sin sembrar.

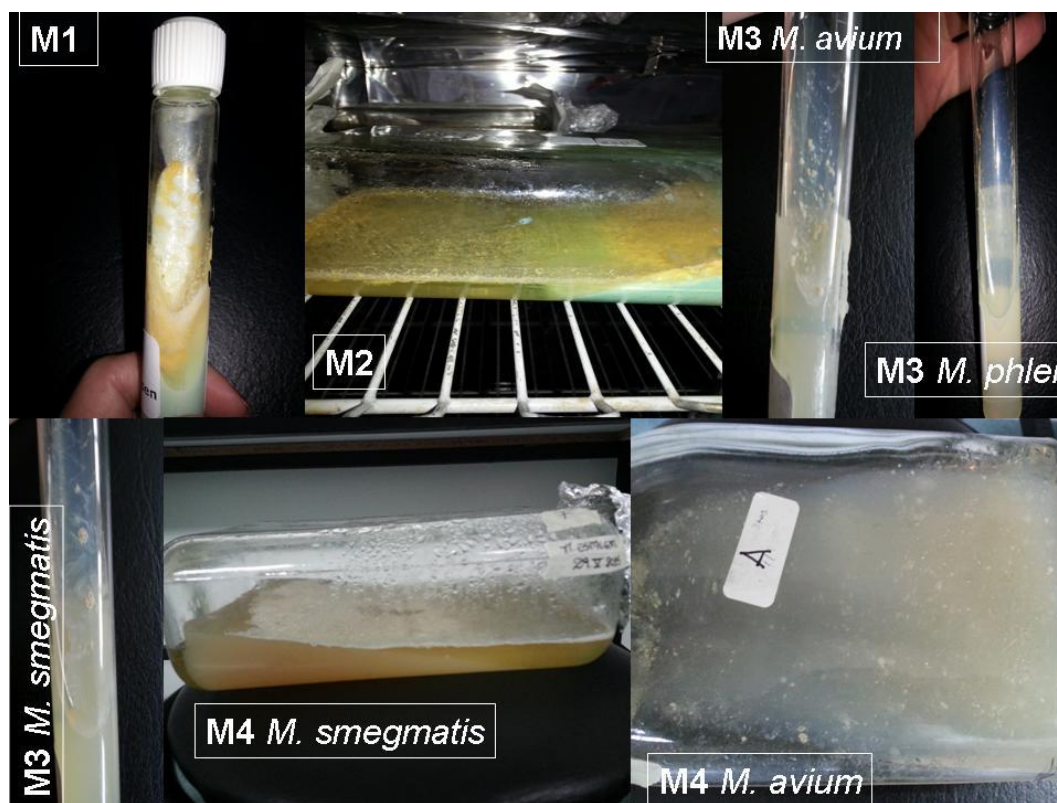


Imagen 15. Se observa el desarrollo de las micobacterias en los distintos medios de cultivo utilizados.

- Debido a la necesidad de producir abundante masa bacteriana, cuya cosecha sea práctica, y teniendo en cuenta que el mejor crecimiento de Maa se dio en el medio sólido de glicerina (M3) y en el bifásico con base glicerinada (M4), se intentó la utilización de un caldo glicerinado para el desarrollo tanto de Maa como de Mp. También, se intentó el crecimiento de Maa y de Mp en el medio de cultivo de Dorset. En ambos medios de cultivo obtuvimos buen crecimiento de ambas micobacterias a los 30 días (imagen 16). Además, en el caso del caldo glicerinado, entre los 20 y 30 días encontramos un *biofilm* de Maa que incluso ascendió por las paredes de las botellas.

La extracción de micobactina pudo ser comprobada mediante TLC con micobactina J® como control. Obtuvimos bandas coincidentes.



Imagen 16. Se observa el crecimiento de Mp en caldo glicerinado (botella de Roux de arriba) y en medio de Dorset (botella de Roux de abajo) a los 35 días de la

6. Prueba biológica preliminar de las micobactinas obtenidas a partir de Maa, Ms y Mp

En el primer ensayo de utilización de la micobactina obtenida a partir de las diferentes cepas, se inoculó Map a partir de un cultivo líquido previamente confirmado positivo, y se observó crecimiento en todos los tubos, incluido el control negativo sin agregado de micobactina, a las dos semanas del repique. (tabla 15). Esto podría deberse a que la micobactina presente en el cultivo original, podría ser suficiente para el desarrollo de Map en el medio líquido.

Tabla 15. Resultados del primer ensayo.

Repique de cultivo positivo en medio líquido con:	Lectura 1er semana	Lectura 2da semana
Micobactina J® (C+)	-	+
Micobactina <i>M. smegmatis</i>	-	+
Micobactina <i>M. phlei</i> CG	-	+
Micobactina <i>M. phlei</i> Dor	-	+
Micobactina <i>M. avium</i> CG	-	+
Micobactina <i>M. avium</i> Dor	-	+
Sin micobactina (C-)	-	+

Referencias: CG: Caldo glicerinado; Dor: Dorset; C+: Control positivo; C-: Control negativo; -: Negativo, ausencia de BAAR; +: Positivo, presencia de BAAR en grupos.

En el segundo ensayo, se sembraron muestras de materia fecal para primo aislamiento de cepas provenientes de animales en estadio clínico de la enfermedad. Los resultados de este ensayo fueron más reveladores, demostrando una ventaja en la utilización de micobactina extraída a partir de Maa, principalmente aquel cultivado en caldo glicerinado (tabla 16). Por otro lado, es importante destacar el crecimiento de Map en el medio líquido a partir de muestras clínicas.

Tabla 16. Resultados del segundo ensayo.

Muestras Tubos con:	1era semana		2da semana		3era semana	
	A	B	A	B	A	B
Micobactina J® (C+)	+/-	-	++	++	+++	+++
Micobactina <i>M. smegmatis</i>	-	-	-	-	-	-
Micobactina <i>M. phlei</i> CG	-	-	-	-	-	-
Micobactina <i>M. phlei</i> Dor	-	-	-	+/-	++	++
Micobactina <i>M. avium</i> CG	-	-	+	++	+++	+++
Micobactina <i>M. avium</i> Dor	-	-	-	-	+	+
Sin micobactina (C-)	-	-	-	-	-	-

Referencias: CG: Caldo glicerinado; Dor: Dorset; C+: Control positivo; C-: Control negativo; A y B: Muestras clínicas de materia fecal.

+/-: Pobre crecimiento e inespecífico; -: Negativo; +: 1 grupo bacilar cada 5 campos de lectura; ++: 1 grupo bacilar en 2 a 5 campos; +++: 1 grupo bacilar por campo.

7. Extracción y purificación de micobactina nacional

Purificación

Debido a que durante la extracción de micobactina, se obtuvieron compuestos contaminantes, intentamos la purificación de la micobactina utilizando alúmina activada. Este método no resultó efectivo, ya que la micobactina quedó retenida en la alúmina, evidenciado esto por la coloración marrón rojiza impartida por el cloruro férrico. Por lo tanto, evaluamos otro método para la purificación, a partir de la TLC.

Para ello, se realizó una TLC y se raspó la banda correspondiente a la micobactina obtenida en el gel de sílica en la TLC (imagen 17). Posteriormente, se eluyó de la sílica utilizando metanol, y ésta fue la que se utilizó para cuantificar y calcular la eficiencia global de producción de micobactina nacional.



Imagen 17. Se observan 3 geles de sílica donde se realizó la siembra para el posterior raspado de MN, colocando en cada uno MJ como control positivo (la primera siembra, a la izquierda de cada gel).

8. Cuantificación de la micobactina nacional producida

Cuantificación

1. Utilizando el procesador de imágenes ImageJ 1.8® obtuvimos dos resultados posibles. Por un lado, la densitometría sin el uso de contraste, demostró que la MN se encontraba un 40% más concentrada que la MJ. Sin embargo, cuando volvimos a hacer la medición utilizando fluorescencia como medio de contraste, la densitometría demostró una mayor cantidad de MN por sobre MJ, en un 60%. Esta variabilidad podría deberse a una diferencia en la sensibilidad, y decidimos considerar que, en

promedio, tenemos alrededor de un 50% más de MN, representando una concentración de 3 mg/mL. Dado que tenemos un *stock* inicial de 16 mL, entonces tendríamos un total de 48 mg de micobactina y/u otros quelantes de hierro. Es importante recordar que estamos trabajando con un material sin purificar, pero como medimos densidad óptica asumimos que lo que medimos responde a material con actividad quelante de hierro.

2. Los resultados de la prueba de eficiencia se describirán más adelante en el apartado número 10.
3. Posteriormente, se cuantificó mediante la medición de la absorbancia a una longitud de onda de 405 nm de la MJ en diluciones seriadas partiendo de una concentración conocida de 222 $\mu\text{g/mL}$ (tabla 17). Se graficaron los promedios de la absorbancia, medida por duplicado, y se realizó la curva de correlación del patrón o standard (figura 7).

Tabla 17. Relación entre la concentración y la absorbancia del patrón o standard (MJ)

Concentración	Absorbancia (OD)
222	173,75
111	78
55,5	41,25
27,75	21
13,87	34,75
6,93	24

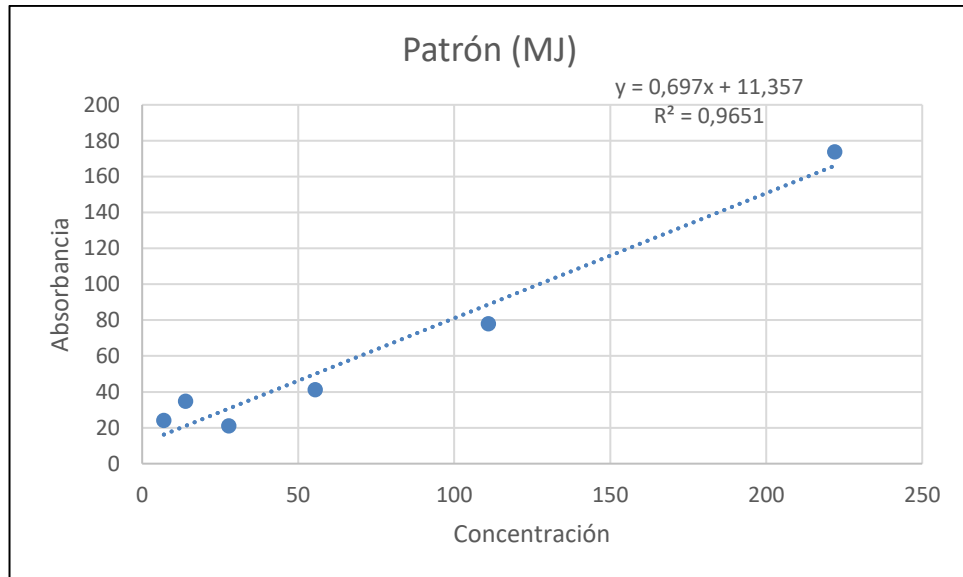


Figura 7. Curva de la relación entre concentración, absorbancia del patrón y la línea de tendencia. Se puede observar la ecuación y el R^2 obtenidos con la correlación lineal.

Gracias a los datos obtenidos sabemos que el coeficiente de determinación (R^2) es de 0,9651 y de ellos se desprende que el coeficiente de correlación lineal muestral (o coeficiente de correlación de Pearson) es de $R=0,9824$, con lo que se demuestra una correlación casi exacta, creciente – positiva (106) entre la OD y la concentración, de manera que podemos utilizar la correlación lineal para calcular la cantidad de micobactina problema a partir de nuestro patrón.

Posteriormente, se calculó la concentración de las micobactinas “incógnita” (Tabla 18), MN purificada y sin purificar, a partir del promedio de las OD resultantes de sus diluciones y los valores de la pendiente y la ordenada al origen de la curva standard. A partir de ese resultado pudimos calcular la cantidad de MN que recuperamos.

Tabla 18. Concentraciones teóricas del patrón y su relación con la absorbancia del patrón y de las MN incógnita.

	Absorbancia a 405 nm (OD)			
Concentración	MJ	MN 1	MN 2	MN 3
222	173,75	5,75	179	102
111	78	2	75,75	53,5
55,5	41,25	0	44	22
27,75	21	-1,75	20	10
13,87	34,75	19,75	30,75	21,5
6,93	24	16,75	21,5	20

Referencias: MN 1: micobactina nacional extraída a partir de 11 botellas de Roux (2,7 litros de caldo glicerinado), detallado en la 7ma experiencia y purificada. MN 2: micobactina nacional extraída a partir de 11 botellas de Roux (2,7 litros de caldo glicerinado), detallado en la 7ma experiencia y sin purificar. MN 3: micobactina nacional extraída a partir de una cantidad desconocida de medio de cultivo, utilizada para la prueba biológica preliminar detallada en la 6ta experiencia y nuevamente en la prueba biológica de la 9na experiencia.

Utilizando los datos obtenidos de la ecuación de la recta de la curva patrón (MJ) calculamos las concentraciones extrapoladas de las micobactinas “incógnita”: MN purificada de la séptima experiencia (verde en la tabla de materiales y métodos), MN sin purificar de la séptima experiencia (fucsia en la tabla de materiales y métodos) y MN sin purificar de la sexta experiencia (celeste en la tabla de materiales y métodos). Los resultados se resumen en la tabla 19.

Tabla 19. Concentraciones extrapoladas al patrón utilizando las OD promedio de las micobactinas nacionales probadas en esta tesis.

MN (7) purificada		MN (7) sin purificar		MN (6) sin purificar	
Concentración µg/mL	OD	Concentración µg/mL	OD	Concentración µg/mL	OD
-8,044476327	5,75	240,5208034	179	130,0473458	102
-13,42467719	2	92,38593974	75,75	60,46341463	53,5
-16,29411765	0	46,83357245	44	15,2697274	22
-18,80487805	-1,75	12,40028694	20	-1,946915352	10
12,04160689	19,75	27,82352941	30,75	14,55236729	21,5
7,737446198	16,75	14,55236729	21,5	12,40028694	20

Referencias: MN (7): micobactina nacional extraída a partir de 11 botellas de Roux (2,7 litros de caldo glicerinado), detallado en la 7ma experiencia. MN (6): micobactina nacional extraída a partir de una cantidad desconocida de medio de cultivo, utilizada para la prueba biológica preliminar detallada en la 6ta experiencia y nuevamente en la prueba biológica de la 9na experiencia.

Los datos obtenidos nos muestran claramente la falta de material quelante de hierro para el caso de la MN purificada. En contraste, ambas MN sin purificar (de la 6ta y 7ma experiencia) muestran una concentración extrapolada similar a la del patrón (240,5 y 130 µg/mL, tabla 19). Recordemos que, en estos últimos casos, la medición se realizó sin purificar el extracto, por lo que la densidad óptica puede estar dada no solo por la micobactina equivalente a la MJ sino también por otros tipos de micobactinas distintas, e incluso otros sideróforos.

Basados en estos resultados de concentración extrapolada, podemos calcular la cantidad total obtenida de la micobactina de la 7ma experiencia, y revisar si el cálculo es coincidente con los resultados del ImageJ 1.8®. Así, para la micobactina sin purificar obtenida a partir de los 11 botellones (2,75L de caldo glicerinado), calculamos que la concentración obtenida fue de 2,164 mg/mL. Como recuperamos 16 mL, la cantidad total de micobactina obtenida fue de 34,624 mg. Este resultado difiere de lo estimado mediante densitometría con el programa ImageJ 1.8®. Dado que ninguno de los dos métodos de cuantificación

es 100% confiable tendremos en cuenta ambos, y para los cálculos de costo - beneficio utilizaremos los resultados obtenidos mediante este último método. Así, de este modo estaríamos subestimando los cálculos.

9. Implementación de la micobactina nacional en el medio de cultivo líquido

Prueba biológica: De las 35 muestras cultivadas, solo 8 mostraron desarrollo de BAAR agrupados en la observación microscópica. De esas 8 muestras, 6 fueron coincidentes en los medios con MJ y con MN, 1 creció únicamente en el medio de cultivo con MJ y la otra creció únicamente en el medio de cultivo con MN. No todas las muestras positivas pudieron confirmarse al realizar PCR IS900. El análisis Kappa se utilizó para ver si son consistentes los resultados de ambos medios de cultivo, y mostró que existe una proporción de concordancia entre 79,4% y 99% con un intervalo de confianza del 95%. Tanto los resultados como el *status* o *gold standard* se resumen en la tabla 20.

Tabla 20. Resumen de los resultados los medios de cultivo con ambas micobactinas y el *status*.

Muestra	M1			M2		
	R	T	RC	R	T	RC
1	+	22	+	+	22	+
2	+	44	-	+	20	+
3	+	20	+	+	20	+
4	+	11	-	+	11	-
5	-	/	/	+	11	-
6	+	20	+	+	20	-
7	+	20	+	-	/	/
8	+	20	-	+	20	+

Referencias: M1: Medio líquido con MJ; M2: Medio líquido con MN; R: Resultado del cultivo; RC: Resultado de la PCR IS900; T: Tiempo de incubación hasta la lectura positiva (días).

Para el análisis de los tiempos de incubación en cada medio se realizó un ANOVA luego de realizar la verificación de la varianza que nos dio una $p= 0,196$. El ANOVA nos arrojó una $p= 0, 4227$ con lo que observamos que no existen diferencias significativas entre los tiempos de incubación requeridos para la determinación de positivos en los medios con cada micobactina.

10. Prueba de eficiencia de la micobactina nacional

En la primera prueba de eficiencia no pudimos determinar un punto de corte debido a que pasados 12 días de incubación se realizó la coloración de ZN y todas las diluciones (en todas sus repeticiones) fueron positivas. En consecuencia, decidimos realizar una segunda prueba de eficiencia donde se diluyó bruscamente (1/4) la MN, partiendo de la misma cantidad que en la primera prueba, esperando encontrar un corte definido del crecimiento de Map en alguna de ellas. Lamentablemente tampoco pudimos encontrar un punto de corte final en esta última prueba. Sin embargo, se observó una caída abrupta en el crecimiento a partir de la 3er dilución (donde, según los resultados del ImageJ®, tendríamos una concentración de 0,166 mg/L de medio). Si bien aún hay desarrollo, se requirió la búsqueda de 10 campos para encontrar un grupo de BAAR, por lo que no es comparable a lo observado en la primer y segunda dilución, donde todos los campos se observaban con BAAR agrupados (imagen 18).

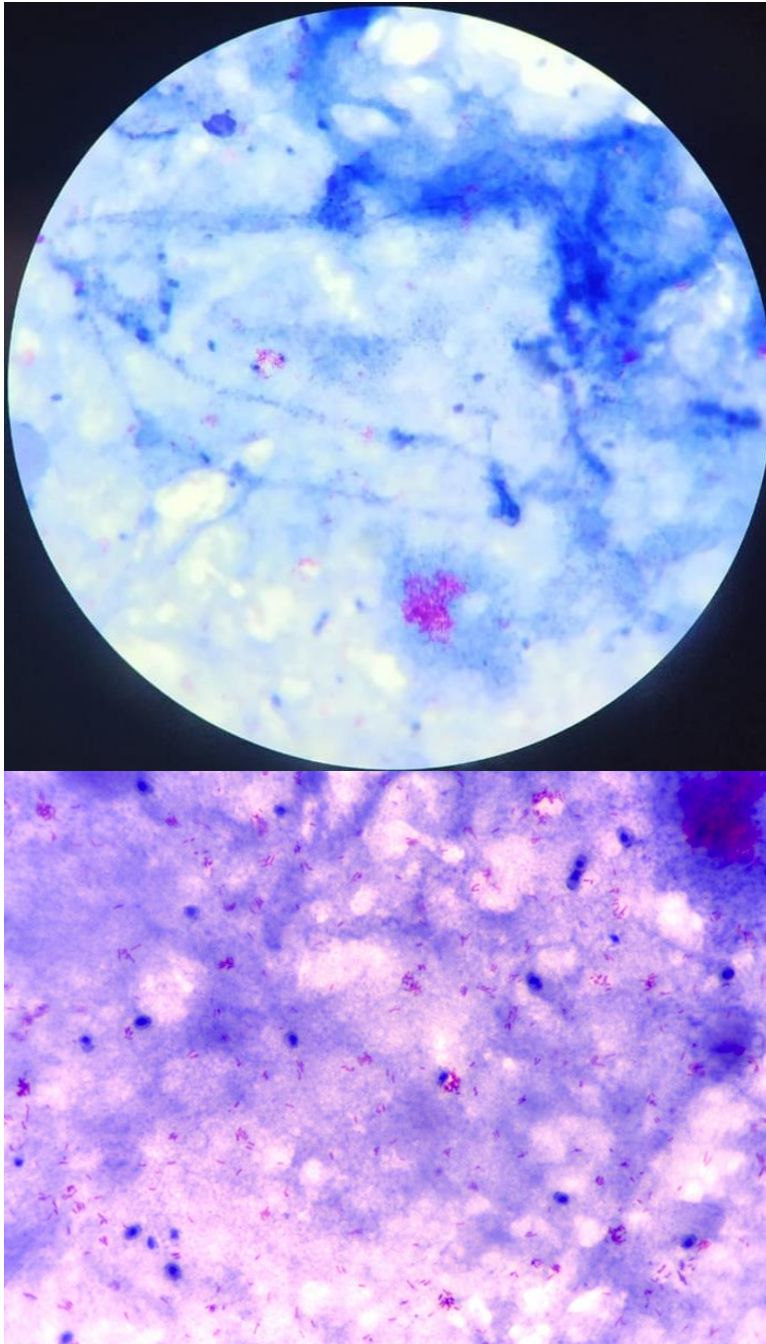


Imagen 18. Se pueden observar los grupos de BAAR de un campo a 100X en la coloración de ZN de las diluciones 2 (imagen de abajo) y 3 (imagen de arriba). Se ve claramente la diferencia en el desarrollo para el mismo tiempo de incubación (10 días) y la misma muestra clínica sembrada. Vale aclarar que en la dilución 3 se sacó la foto del campo con mayor cantidad de BAAR para que pueda ser mejor apreciado el desarrollo.

Con estos resultados podemos decir que el extracto con el que estamos trabajando, al que llamamos MN, demuestra una eficiencia igual a la reportada previamente por otros investigadores para la MJ en medios de cultivo líquidos como el que aquí usamos (14), creciendo con hasta 0,75 mg/L de medio de cultivo.

11. Genotipificación de los aislamientos obtenidos

Con el fin de evaluar la variabilidad de las cepas circulantes en la Provincia de Buenos Aires, se genotipificaron 13 aislamientos por MIRU – VNTR, utilizando 8 loci (292, X3, 25, 47, 3, 7, 10 y 32) que fueron descriptos previamente por Thibault (24) y utilizados exitosamente en nuestro grupo (15). Hasta el momento, 6 de ellos se pudieron amplificar con los 2 MIRU y 6 VNTR. Los resultados se detallan en la tabla 21 donde además se agrega la localidad de donde se tomó la muestra clínica.

Tabla 21. Cantidad de repeticiones de cada locus, INMV que se depende de ese código y la localidad de procedencia de la muestra clínica.

Cepa	MIRU 292	MIRU X3	VNTR 25	VNTR 47	VNTR 3	VNTR 7	VNTR 10	VNTR 32	INMV	Localidad
1	3	2	2	3	2	2	2	8	77	Vieytes
7	3	2		3	2	2 4	2	8	PI	Gral. Belgrano
2	3	2	2	3	2	2	2	8	77	Vieytes
3	3	2	3	3	2	2	2	8	2	Vieytes
4	3	2	3	3	2	2	2	8	2	Vieytes
8		2	3		2	2		8	PI	Azul
5	3	2	3	3	2	2	2	8	2	Vieytes
9	3				2	2			PI	Chascomús
6	4	2	3	3	2	2	2	8	1	Azul
10	3	2		2	2			8	PI	Tandil
11	3	2	1	2	2			8	PI	Azul
12	3	1	3	3				8	PI	Vieytes
K10	3	2	3	3	2	2	2	8	2	Referencia
13	3	2		3	2	2	2	8	PI	Chascomús

Referencias: PI: perfil incompleto.

Se obtuvieron 3 patrones diferentes: 2 cepas provenientes de la localidad de Vieytes corresponden al patrón INMV 77; 3 cepas también de Vieytes, corresponden al patrón INMV 2 al igual que la cepa de referencia K10 y una cepa de la localidad de Azul presentó un patrón INMV 1. Es interesante destacar que

en trabajos previos realizados y publicados por parte de nuestro grupo de trabajo, donde se trabajó con muestras de distintas zonas de la Provincia de Buenos Aires, no habíamos encontrado muestras que tuvieran un perfil INMV 77 (15). Sin embargo, no se encontraron diferencias importantes en el comportamiento de estas cepas respecto del tiempo de incubación necesario para su desarrollo en el medio de cultivo líquido, siendo posible su visualización mediante coloración de ZN a los 10 y 14 días. En el medio de cultivo sólido se observaron colonias bacterianas a los 58 y 62 días de incubación (tabla 22).

Tabla 22. Relación entre el genotipo y el tiempo de incubación requerido para su desarrollo en los medios de cultivo HEYM y líquido.

Cepa	INMV	Tiempo hasta el desarrollo en HEYM (días)	Tiempo hasta el desarrollo en medio líquido (días)
1	77	62	11
2	77	54	14
3	2	74	20
4	2	68	56
5	2	54	14
6	1	67	8

DISCUSIÓN

La paratuberculosis bovina es una enfermedad de distribución mundial, que preocupa tanto a países desarrollados como a países en desarrollo por igual, no sólo por las pérdidas económicas que genera en los sistemas productivos bovinos y ovinos, sino también por la potencialidad zoonótica de Map (34,107). Es por eso que se ha incrementado la investigación sobre este agente en los últimos años. Si bien esta enfermedad causa pérdidas económicas en todo el mundo, es lógico pensar que estas pérdidas son más importantes en los países que basan su economía en la producción agropecuaria, incluida en ella la producción bovina, ya sea de cría, de tambo o ambas.

En países desarrollados, el diagnóstico de la paratuberculosis, se realiza valiéndose de todas las técnicas diagnósticas disponibles, debido al alto desarrollo tecnológico y el presupuesto destinado para tal fin. Allí cuentan, por ejemplo, con kits comerciales para la realización de ELISA (77), medios de cultivo líquidos comerciales, principalmente el BACTEC 12B® y MGIT™, y técnicas de diagnóstico molecular de última generación tales como qPCR, genotipificación mediante RFLP - IS900, PCR- REA, microarray, PFGE, secuenciación de ADN, entre otras. Lamentablemente, estas técnicas son costosas, y en nuestro país muchas veces no se cuenta con el equipamiento y/o los recursos necesarios para realizarlas, principalmente en los laboratorios de baja complejidad.

Se han mostrado muy buenos resultados con la utilización de planes de control de la enfermedad basados en la eliminación de animales positivos al cultivo bacteriológico, con los cuales se reducen significativamente los casos clínicos, y

en un tiempo relativamente corto (4,31,66). Sin embargo, su utilización queda limitada a laboratorios de investigación, debido a su alto costo y el prolongado tiempo necesario para obtener un resultado positivo en los medios más accesibles. Sumado a lo anterior, la sensibilidad del medio de cultivo varía entre un 30 y un 70% según las condiciones (76).

Argentina es uno de los países más importantes en producción bovina en el mundo, ocupando el 6to lugar según la proyección 2015/2016 realizada por la USDA (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos). Según datos del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación, a marzo de 2019, se alcanzaron un total de existencias de 53.945.808, de las cuales 19.128.662 cabezas se encuentran en la Provincia de Buenos Aires. La cadena de carne bovina es una de las más importantes del sector pecuario en Argentina. El número de establecimientos dedicados a la producción del ganado bovino, el stock ganadero y los puestos de trabajo generados en cada uno de los eslabones, la posicionan como la actividad pecuaria más explotada en el sistema productivo nacional. Si bien determinadas áreas del territorio nacional concentran la producción de bovinos de carne, todas las provincias del país contienen bovinos en producción. La Región Pampeana encabeza la lista de producción con más de 5 millones de kg de carne en pié, siendo a su vez la Provincia de Buenos Aires la principal al aportar la mitad de esa producción. El NEA con 9,4% de la producción de carne es la segunda Región. El consumo de carne bovina en Argentina disminuyó fuertemente en el 2010, pasando de 68,9 (2008) a 57,2 kg/hab/año (Argentina Innovadora 2020, IPCVA). En 2012/2013 el consumo volvió a subir ubicándose en 59-60 kg/hab/año, para estabilizarse en ese promedio en la actualidad. La

participación de Argentina en el mercado externo, ha disminuido en los últimos años. En el 2017, un 11% de la producción de carne fue exportada principalmente a China, Unión Europea, Israel y Rusia; y de los países de la región a Brasil y Chile. La producción de leche y derivados constituye otro relevante sector dentro de la producción ganadera nacional. Aunque el número de bovinos dedicados a la producción láctea es singularmente menor a la producción cárnica, esta cadena es una de las principales actividades productivas en las provincias centrales, principalmente la cuenca lechera que abarca las provincias de Buenos Aires, Santa Fé, Córdoba, Entre Ríos y parte de La Pampa. Además del consumo interno, la producción de leche y sus derivados es comercializada a Brasil, Venezuela y Chile (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación Argentina a julio 2019).

Para que los animales desarrollen su máximo potencial productivo, deben tener un óptimo estado sanitario. Para ello es necesario tomar medidas sanitarias tendientes a prevenir y controlar las principales enfermedades que afectan la rentabilidad de las explotaciones y son objeto de restricciones sanitarias para el mercado internacional de estos productos.

La PTB es una enfermedad crónica y de difícil manejo que causa grandes pérdidas económicas. Se ha calculado que, en un rodeo con la enfermedad, cuando la prevalencia es igual o mayor al 10%, el costo promedio de las pérdidas alcanzaría los 200 U\$S/vaca (5).

En Argentina, la PTB en el animal vivo, se diagnostica principalmente con pruebas indirectas, como el ELISA, debido a la dificultad y al tiempo que llevan

las pruebas diagnósticas directas, como el cultivo bacteriológico, que es la técnica diagnóstica de oro (108). El cultivo bacteriológico se realiza en medio HEYM, el cual no sólo es costoso, sino que además necesita un mínimo de 2 meses para observar colonias y así dar un resultado positivo cuando la muestra utilizada es materia fecal (8,9). El prolongado tiempo requerido para la obtención del resultado con el cultivo bacteriológico determina que, en la práctica privada, ni el veterinario ni el productor quieran esperar ese resultado para tomar una decisión sobre qué hacer con el animal. Tampoco se disponen a enviar muestras de materia fecal y pagar por ese estudio, con lo que normalmente se realiza el manejo del rodeo basándose en los resultados de pruebas indirectas, principalmente ELISA o AGID.

Se ha demostrado en varios estudios que los medios de cultivo líquido favorecen el acceso a los nutrientes y es por ello que las bacterias logran desarrollarse más y más rápido. En este sentido, el trabajo publicado por Whittington (14) fue revelador, presentando un medio de cultivo líquido que mejora la sensibilidad de la técnica diagnóstica de oro y disminuye los costos. De esta forma, facilita el uso del medio de cultivo, no solo para la implementación en planes de control sanitario de la enfermedad, sino en futuras investigaciones al respecto y como *gold standard* en el desarrollo de nuevas técnicas diagnósticas y producción de futuras vacunas preventivas de la enfermedad.

Si bien en nuestro laboratorio no pudimos implementar la receta tal como fue desarrollada por Whittington, en este trabajo de tesis se demuestra que, con algunas modificaciones iniciales, como el agregado de agar y la utilización de tubos de vidrio reutilizables, pudimos desarrollar un medio de cultivo líquido que

cumple con los mismos objetivos de acelerar los tiempos de desarrollo de la bacteria y disminuir los costos de producción. Además, en el trabajo descrito por Whittington, el medio líquido es comparado con un medio líquido comercial (BACTEC 12B®) que en nuestro país no es el más utilizado, debido al alto costo y a los problemas de importación. Es por eso que en este trabajo se utilizó el medio HEYM para comparar los resultados del medio de cultivo líquido experimental, de manera que los resultados sean representativos para la realidad de la mayoría de los laboratorios de nuestro país.

En este trabajo se confirmó el crecimiento de Map en el medio de cultivo líquido con coloración de ZN en intervalos de 7 días, a diferencia de otras investigaciones donde no se consideró positiva una muestra sin una PCR IS900 positiva (109). Así, este método es económico en relación con el alto costo que requiere la realización de PCR IS900. Además, la sensibilidad de la PCR IS900 se ve influenciada por la presencia de inhibidores como los que se encuentran en la yema de huevo (110). Una desventaja sobre la confirmación mediante coloración de ZN es lo laborioso del método, principalmente cuando se maneja un volumen importante de muestras, y la necesidad de al menos una PCR IS900 para confirmar. Sin embargo, los resultados de la prueba de modelos latentes bayesianos, sumado a la PCR IS900 nos indican que no hay diferencia en cuanto a la especificidad de los medios de cultivo líquido y HEYM, pero si en cuanto a la sensibilidad, siendo mayor para el primero. A diferencia de otros trabajos donde se utilizó la prueba de modelos latentes bayesianos para investigación sobre el cultivo bacteriológico para el diagnóstico de PTB (111), aquí utilizamos una prior no informativa para ELISA y cultivo bacteriológico. Esta decisión no fue tomada

solamente porque las muestras utilizadas fueron de animales en su mayoría en la etapa clínica de la enfermedad y naturalmente infectados, sino también porque una prior no informativa nos revela un resultado más objetivo para la valoración de las tres técnicas diagnósticas en el estudio. La genotipificación de los aislamientos obtenidos con este medio de cultivo, aunque fueron pocas hasta el momento, demostraron que en este medio se favorece el desarrollo de más de una cepa de Map, ya que obtuvimos 3 INMV distintos de los aislamientos.

En lo referente al tiempo hasta la detección del positivo (TTD- *time to detection*), estudios previos demuestran que puede adelantarse incluso hasta 3 o 6 semanas el diagnóstico con la utilización de cultivos líquidos (12,13), y eso es nuevamente corroborado en este trabajo de tesis (112). Además, a diferencia de otros trabajos, aquí se utilizaron muestras de animales naturalmente infectados, lo cual generalmente trae variaciones en el tiempo de incubación necesario debido a la variabilidad genética de Map (113) y a la presión infectiva (carga) bacteriana (114). El TTD promedio para el medio de cultivo líquido fue de 19 días, con un intervalo de 6 y 56 días. En contraste, para el HEYM el TTD promedio fue de 64 días, con un intervalo de 32 y 122 días. El TTD obtenido con el medio de cultivo líquido en este trabajo es incluso menor que los obtenidos en investigaciones similares (5 semanas) (12,14).

La interpretación del medio de cultivo líquido aquí presentado es uno de los puntos sujetos a discusión, ya que la coloración de ZN nos revela BAAR, pero no nos permite confirmar de qué especie de micobacteria se trata sin una técnica molecular acompañante. Sin embargo, el tipo de muestra y la signología clínica del animal, sumado a las características morfológicas de Map, y su tendencia a

agruparse formando grumos, facilita el diagnóstico, principalmente para un operador entrenado. Además, el método utilizado para la decontaminación con HPC elimina la mayoría de las micobacterias no patógenas con un mínimo efecto sobre Map (8,70). Pese a todo esto, es real que, ante la necesidad de procesar numerosas muestras, esta forma de lectura resulta laboriosa y poco práctica. Es por esto que se intentó incorporar a la receta un marcador de crecimiento que cambie de color ante un cambio en el medio de cultivo que indique que hay metabolismo. Los resultados aquí presentados aún son preliminares, pero revelaron que tanto la resazurina como el tetrazolium podrán ser usados posteriormente para facilitar la interpretación de resultados.

Para fomentar la utilización del medio de cultivo líquido como herramienta diagnóstica en la mayor cantidad de laboratorios posibles del país, consideramos necesario no sólo que sea económicamente accesible, sino que también todos sus componentes estén a disposición para que cualquiera de ellos pueda acceder. Así pues, se buscó eliminar todos los suplementos y componentes utilizados en medios de cultivo comerciales que debieran ser importados como: Middlebrook ADC®, PANTA® y micobactina J®. El medio de cultivo líquido aquí utilizado tiene la particularidad de llevar una cantidad de agar mínima (0,185%) que otorga la homogeneidad del principal componente nutricional, la yema de huevo (86), sin que se pierda la fluidez que le permite a las bacterias tener accesibilidad a los nutrientes. A su vez, poco a poco pudimos ir reemplazando los ingredientes comerciales, los cuales encarecen estos medios de cultivo. Así, se reemplazó el suplemento Middlebrook ADC® por Albúmina y Dextrosa (AD), eliminando la catalasa de la receta sin que esto afecte el desarrollo de Map. También, se dejó de

utilizar la mezcla antibiótica PANTA® y se reemplazó por la utilización de ácido nalidíxico y nistatina para prevenir contaminación bacteriana y fúngica. Con este reemplazo se obtuvieron resultados similares a los obtenidos con la utilización del mix antibiótico comercial en cuanto al desarrollo de contaminantes. Sumado a lo anterior, se reemplazó la utilización de micobactina J® por micobactina de producción nacional.

En este trabajo desarrollamos un método para la producción y purificación de micobactina a partir de distintas micobacterias crecidas en diferentes medios de cultivo. Seleccionamos la producción y extracción de micobactina a partir de Maa crecida en un caldo glicerinado. Si bien este medio contiene una leve cantidad de hierro en su composición (87), y no es el medio en el que Maa produce la mayor cantidad de micobactina, la gran masa obtenida y la rapidez con la que crece en este medio, compensa la menor producción de micobactina. Por otro lado, la micobactina extraída a partir de Maa fue la que mejor resultado mostró en las pruebas de eficacia de desarrollo de Map, y no debería sorprendernos ya que esta micobacteria es filogenéticamente la más cercana a Map de las tres que se probaron aquí (115). En este sentido, es necesario remarcar que existen otras especies de micobacterias productoras de micobactina, tales como *M. scrofulaceum* y *M. intracellulare*. En todas las especies micobacterianas mencionadas anteriormente, es usual encontrar en una cromatografía que produjeron más de una micobactina diferente cada una, incluso hasta más de 5 tipos. Estas micobactinas producidas se pueden diferenciar en su estructura química según los grupos que componen sus cadenas laterales (R 1-5), la posición y cantidad en la que se encuentran (88).

La producción de micobactina a partir de Maa consiste en la extracción con etanol a partir de la masa bacteriana crecida en condiciones limitantes de hierro. Si bien en este trabajo no utilizamos la micobactina pura sino un extracto sin purificar que demuestra tener más de un componente con la misma actividad biológica, es un método rápido y sencillo, fácil de implementar en laboratorios de baja complejidad. La micobactina obtenida como resultado de este trabajo de tesis, mostró ser eficaz y eficiente sin ser purificada, probablemente por estar compuesta por más de un tipo de micobactina y/o sideróforo con actividad biológica, aunque esto último no pudimos demostrarlo en el tiempo de trabajo de esta tesis y se prevé estudiarlo posteriormente.

Según los resultados de la cuantificación realizada a partir de los extractos sin purificar y el extracto purificado mediante la TLC (donde recuperamos únicamente la banda coincidente con la MJ), resulta evidente que la micobactina equivalente a MJ no es la única con actividad quelante de hierro. Es por eso que tenemos una OD extremadamente mayor en el extracto sin purificar que en el extracto purificado. Si analizamos sobre la MJ, en realidad no sabemos exactamente por qué moléculas está compuesta, ya que es un producto comercial. Sí podemos saber que la MN es altamente eficaz y eficiente, y está compuesta por varias moléculas distintas a la MJ. Es evidente con nuestros resultados que la MJ no es la única con la que se favorece el desarrollo de Map. En este trabajo se concluye que la eficiencia del extracto MN es igual a la reportada previamente para la MJ en el medio líquido, demostrado por un desarrollo seguro con hasta 0,75 mg de MN/L de medio de cultivo.

La sustitución de todos los componentes importados por ingredientes nacionales resulta en una disminución en el costo económico del medio de cultivo líquido, el cual alcanza y hasta supera los \$7000 (USD 129,69/107 Kg de carne pv) por litro de medio preparado (anexo). Lo anterior se desprende de que el litro de medio de cultivo líquido tiene un costo de preparación de \$10363 (USD 178/147 Kg de carne pv) y rinde para el procesamiento de 200 muestras dado que se utilizan 5 ml por tubo y así resulta en un costo por muestra de \$52. En contraste, el HEYM tiene un costo de preparación por litro de \$17588 y se utilizan 10 ml por botella de cultivo celular, dando un rendimiento de 100 cultivos posibles por litro de medio preparado. Por lo tanto, para el HEYM, el costo final por muestra procesada es de \$176. Así, no sólo se ahorran más de \$7000 por litro de medio preparado, sino que, como el medio líquido rinde el doble, se logra ahorrar hasta \$15000 (USD 268.6/213 Kg de carne pv) cada 200 muestras procesadas en este medio de cultivo.

Por otro lado, en este trabajo se pudo tipificar genéticamente un pequeño número de los aislamientos de Map obtenidos. De ellos, cuatro resultaron en un código para INMV 2, uno para INMV 1 y dos para INMV 77. Si bien son pocas muestras, es interesante remarcar que los INMV 1 y 2 son comunes tanto en la PBA, Argentina (15,116,117), como en Sudamérica (118), algunos países de Europa (82,119) y Canadá (120,121). A diferencia de los anteriores, en Corea se ha reportado que el genotipo más común es el INMV 68 (122). Sin embargo, el INMV 77 no es común, inclusive pese a que el código se cargó en el año 2008 a la base de datos, aún no se ha publicado y en la bibliografía no hemos encontrado reportes de este genotipo más allá de lo descrito en la base de datos. Según la

MAC- INMV Data base, hasta el momento, de este genotipo se encontraron 3 sobre un total de 2529 cepas.

CONCLUSIONES

- El medio de cultivo líquido aquí presentado favorece el desarrollo de Map disminuyendo los costos de producción y permitiendo un mayor aprovechamiento de los recursos accesibles en laboratorios de baja complejidad.
- El medio de cultivo líquido tiene una mayor sensibilidad sin ir en detrimento de la especificidad en relación con el medio HEYM.
- Las AUC de ambos medios demuestran una ventaja en la utilización del medio de cultivo líquido como herramienta diagnóstica (AUC = 0,93) por sobre el HEYM (AUC = 0,84).
- El medio de cultivo líquido reduce significativamente los tiempos de incubación necesarios para el diagnóstico respecto del HEYM según los resultados de la prueba de Kruskal Wallis ($p= 7,14^{-12}$).
- El medio de cultivo líquido tiene un mayor rendimiento debido a la utilización de 5 ml de medio por muestra para cultivo. Esto resulta en un rendimiento de 200 muestras procesadas por litro de medio de cultivo en contraste con las 100 muestras procesadas por litro de medio con HEYM.
- A partir de Maa desarrollado en un caldo glicerinado, y en un tiempo relativamente corto (2 meses), se logró extraer micobactina con alta actividad biológica como quelante de hierro (MN).
- La MN sin purificar tiene actividad biológica equiparable a la micobactina comercial, permitiendo su reemplazo.
- El costo de producción de la MN es de aproximadamente \$35/mg producido, y tiene una eficiencia equiparable a la MJ, sin mostrar

variación utilizando hasta 0,75 mg/L de medio de cultivo. Esto resulta en un costo por litro de medio producido de 25\$.

- El reemplazo de los ingredientes importados en el medio líquido, incluyendo la MJ, genera una disminución de los costos de hasta \$15000 por cada 200 muestras procesadas en comparación con el HEYM.

Las ventajas del medio de cultivo líquido en cuanto a sensibilidad y especificidad, sumado a la importante disminución en el tiempo necesario para el diagnóstico y en los costos de producción (sobre todo si se utiliza el extracto MN como reemplazo de la MJ) hacen de éste una herramienta diagnóstica de elección por sobre el HEYM, principalmente en laboratorios de baja complejidad y recursos.

De esta manera, hemos logrado desarrollar un medio de cultivo líquido reemplazando los ingredientes importados, lo que no solo disminuye de forma importante los costos de producción y procesamiento de muestras, sino que devuelven algo que personalmente considero invaluable: la independencia nacional para utilizar esta técnica diagnóstica, poniendo nuestro grano de arena para reforzar la soberanía nacional.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ott SL, Wells SJ, Wagner BA. Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. *Prev Vet Med.* 1999;40(3-4):179-92.
2. Toft N, Nielsen SS. Summary receiver operating characteristics (SROC) and hierarchical SROC models for analysis of diagnostic test evaluations of antibody ELISAs for paratuberculosis. *Prev Vet Med.* 2009;92(3):249-55.
3. Soto JP, Kruze J, Leiva S. Aislamiento de *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* de fecas en rebaños lecheros infectados mediante el Método de Cornell modificado. *Arch Med Vet [Internet].* 2002 [cited 2017 Jul 27];34(2):275-82. Available from:
http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X2002000200013&lng=en&nrm=iso&tlng=en
4. Garcia AB, Shalloo L. Invited review: The economic impact and control of paratuberculosis in cattle. *J Dairy Sci [Internet].* 2015;98(8):5019-39. Available from:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002203021500404X>
5. Morsella C, Paolicchi F. Aplicación de métodos de diagnóstico y control de Paratuberculosis en Argentina. In: XXI Congreso panamericano de Ciencias Veterinarias. Guadalajara, Mexico; 2008. p. 37-43.
6. Whitlock RH, Buergelt C. Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *Vet Clin North Am Food Anim*

- Pract. 1996;12(2):345–56.
7. Fecteau ME. Paratuberculosis in Cattle. *Vet Clin North Am - Food Anim Pract* [Internet]. 2018;34(1):209–22. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2017.10.011>
 8. Whipple DL, Callihan DR, Jarnagin JL. Cultivation of *Mycobacterium* paratuberculosis from bovine fecal specimens and a suggested standardized procedure. *J Vet Diagn Invest*. 1991;3(4):368–73.
 9. Stabel JR. An improved method for cultivation of *Mycobacterium* paratuberculosis from bovine fecal samples and comparison to three other methods. *J Vet Diagn Invest*. 1997;9(4):375–80.
 10. Francis J. Johnes bacillus and mycobactins. *Aust Vet J*. 1971;47(6):256.
 11. Thoen CO MC. Recent developments in diagnosis of paratuberculosis (Johnes's disease). *Am J Vet Res*. 1979;174(8):838–40.
 12. Pozzato N, Gwozdz J, Gastaldelli M, Capello K, Ben CD, Stefani E. Evaluation of a rapid and inexpensive liquid culture system for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in bovine faeces. *J Microbiol Methods* [Internet]. 2011;84(3):413–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2011.01.019>
 13. Whittington RJ. Factors affecting isolation and identification of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis from fecal and tissue samples in a liquid culture system. *J Clin Microbiol*. 2009;47(3):614–22.

14. Whittington RJ, Whittington AM, Waldron A, Begg DJ, De Silva K, Purdie AC, et al. Development and validation of a liquid medium (M7H9C) for routine culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* to replace modified bactec 12B medium. *J Clin Microbiol*. 2013;51(12):3993–4000.
15. Imperiale BR, Moyano RD, Di Giulio AB, Romero MA, Alvarado Pinedo MF, Santangelo MP, et al. Genetic diversity of *Mycobacterium avium* complex strains isolated in Argentina by MIRU-VNTR. *Epidemiol Infect* [Internet]. 2017;(February):1–10. Available from: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0950268817000139/type/journal_article
16. Rindi L, Garzelli C. *Infection*, Genetics and Evolution Genetic diversity and phylogeny of *Mycobacterium avium*. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2014;21:375–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2013.12.007>
17. Travería GE, Alvarado Pinedo MF. Patogenicidad microbiana en Medicina Veterinaria. In: Edulp E de la UN de LP, editor. *Patogenicidad microbiana en Medicina Veterinaria*. La Plata; 2018. p. 198–210.
18. Collins DM, Gabric DM, Lisle GWDE. Identification of Two Groups of *Mycobacterium paratuberculosis* Strains by Restriction Endonuclease Analysis and DNA Hybridization. 1990;28(7):1591–6.
19. De Lisle G, Collins D, Huchzermeyer H. Characterization of ovine strains of *Mycobacterium paratuberculosis* by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. *Onderstepoort J Vet Res*. 1992;59(2):163–5.

20. de Juan L, Mateos A, Dominguez L, Sharp JM, Stevenson K. Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis isolates from goats detected by pulsed-field gel electrophoresis. *Vet Microbiol.* 2005;106:249–57.
21. Stevenson K, Hughes VM, Juan L De, Inglis NF, Wright F, Sharp JM. Molecular Characterization of Pigmented and Nonpigmented Isolates of *Mycobacterium avium* subsp . paratuberculosis. 2002;40(5):1798–804.
22. Whittington RJ, Marsh IB, Whitlock RH. Typing of IS 1311 polymorphisms confirms that bison (*Bison bison*) with paratuberculosis in Montana are infected with a strain of *Mycobacterium avium* subsp . paratuberculosis distinct from that occurring in cattle and other domesticated livestock. *Mol Cell Probes.* 2001;15:139–45.
23. Bryant JM, Thibault VC, Smith DG, McLuckie J, Heron I, Sevilla IA, et al. Phylogenomic exploration of the relationships between strains of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *BMC Genomics* [Internet]. 2016;17(1):79. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26813574>
24. Thibault VC, Grayon M, Boschioli ML, Hubbans C, Overduin P, Stevenson K, et al. New variable-number tandem-repeat markers for typing *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis and *M. avium* strains: Comparison with IS900 and IS1245 restriction fragment length polymorphism typing. *J Clin Microbiol.* 2007;45(8):2404–10.
25. Romano MI, Amadio A, Bigi F, Klepp L, Etchechoury I, Noto Llana M, et

- al. Further analysis of VNTR and MIRU in the genome of *Mycobacterium avium* complex, and application to molecular epidemiology of isolates from South America. *Vet Microbiol.* 2005;110(3–4):221–37.
26. Overduin P, Schouls L, Roholl P, Zanden A Van Der, Mahmmod N, Herrewegh A, et al. Use of Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis for Typing *Mycobacterium avium* subsp . *paratuberculosis*. 2004;42(11):5022–8.
27. Thibault VC, Grayon M, Boschioli ML, Willery E, Allix-Béguet C, Stevenson K, et al. Combined multilocus short-sequence-repeat and mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem-repeat typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates. *J Clin Microbiol.* 2008;46(12):4091–4.
28. Li L, Bannantine JP, Zhang Q, Amonsin A, May BJ, Alt D, et al. The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Proceeding Natl Acad Sci United States Am.* 2005;102(35):12344–9.
29. Manning EJ, Collins MT. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis. *Rev Sci Tech [Internet].* 2001;20(1):133–50. Available from: <http://europemc.org/abstract/med/11288509>
30. Clarke CJ. The Pathology and Pathogenesis of Paratuberculosis in Ruminants and Other Species. *J Comp Pathol.* 1997;116(1906):217–61.

31. Nielsen S. Developments in diagnosis and control of bovine paratuberculosis. CAB Rev Perspect Agric Vet Sci Nutr Nat Resour [Internet]. 2014;9(012). Available from: <http://www.cabi.org/cabreviews/review/20143160038>
32. Stabel JR, Bradner L, Robbe-Austerman S, Beitz DC, Ayele WY, Bartos M, et al. Clinical disease and stage of lactation influence shedding of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis into milk and colostrum of naturally infected dairy cows. J Dairy Sci [Internet]. 2014;97(10):6296–304. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25064655>
33. McFadden JJ, Butcher PD, Chiodini R, Hermon-Taylor J. Crohn's disease-isolated mycobacteria are identical to *Mycobacterium paratuberculosis*, as determined by DNA probes that distinguish between mycobacterial species. J Clin Microbiol. 1987;25(5):796–801.
34. Chiodini, R.J., Chamberlin, W.M., Sarosiek, J., McCallum RW. Crohn's disease and the mycobacterioses: A quarter century later. Causation or simple association? Crit Rev Microbiol. 2012;38(1):52–93.
35. D'Amore M, Lisi S, Sisto M, Cucci L, Dow CT. Molecular identification of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in an Italian patient with Hashimoto's thyroiditis and Melkersson-Rosenthal syndrome. J Med Microbiol. 2010;59(1):137–9.
36. Speranza Masala, Davide Cossu, Adolfo Pacifico PM and LAS. Sardinian Type 1 diabetes patients, Transthyretin and *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infection [Internet]. Vol. 4, Gut pathogens. Gut

Pathogens; 2012. Available from: Gut Pathogens

37. Naser SA, Thanigachalam S, Dow CT, Collins MT. Exploring the role of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in the pathogenesis of type 1 diabetes mellitus: a pilot study. *Gut Pathog* [Internet]. 2013;5(1):14. Available from:
<http://gutpathogens.biomedcentral.com/articles/10.1186/1757-4749-5-14>
38. Shariati SH, Alaei A, Keshavarz R, Mosavar N, Rabbani A, Niegowska M, et al. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. Paratuberculosis in Iranian patients with type 1 diabetes mellitus by PCR and ELISA. *J Infect Dev Ctries*. 2016;10(8):6–11.
39. Chamberlin WM, Naser SA. Integrating theories of the etiology of Crohn ' s Disease On the etiology of Crohn ' s Disease : Questioning the Hypotheses. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res*. 2006;12(2):27–33.
40. Shanahan F. Crohn ' s disease. *Lancet*. 2002;359(9300):62–9.
41. Naser SA, Ghobrial G, Romero C, Valentine JF. Culture of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis from the blood of patients with Crohn's disease. *Lancet*. 2004;364(9439):1039–44.
42. Naser SA. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp paratuberculosis From Breast Milk of Crohn ' s Disease Patients. *Am J Gastroenterol*. 2000;95(4):1094–5.
43. Bull TJ, Mcminn EJ, Sidi-boumedine K, Skull A, Durkin D, Neild P, et al. Detection and Verification of *Mycobacterium avium* subsp .

- paratuberculosis in Fresh Ileocolonic Mucosal Biopsy Specimens from Individuals with and without Crohn ' s Disease. 2003;41(7):2915–23.
44. Schwartz D, Shafran I, Romero C, Piromalli C, Biggersta J, Naser N, et al. Use of short-term culture for identification of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in tissue from Crohn's disease patients. Clin Microbiol Infect. 2000;6(6):303–7.
45. Sechi LA, Ph D, Scanu AM, Molicotti P, Ph D, Cannas S, et al. Detection and Isolation of Mycobacterium avium Subspecies paratuberculosis from Intestinal Mucosal Biopsies of Patients with and without Crohn's Disease in Sardinia. Am J Gastroenterol. 2005;100(7):1529–36.
46. Juste A, Elguezal N, Sevilla I, Garcı F, Casado R, Ochotorena I, et al. Association between Mycobacterium avium subsp . paratuberculosis DNA in blood and cellular and humoral immune response in inflammatory bowel disease patients and controls. 2009;
47. Millar D, Ford JON, Sanderson J, Withey S, Tizard M, Doran TIM, et al. IS 900 PCR To Detect Mycobacterium paratuberculosis in Retail Supplies of Whole Pasteurized Cows ' Milk in England and Wales. 1996;62(9):3446–52.
48. Cirone K, Morsella C, Romano M, Paolicchi F. Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis: presencia en los alimentos y su relación con la enfermedad de Crohn. Rev Argent Microbiol. 2007;39(1):57–68.
49. Cirone K, Huberman Y, Morsella C, Méndez L, Jorge M, Paolicchi F.

Growth of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, *Escherichia coli*, and *Salmonella Enteritidis* during Preparation and Storage of Yogurt. *ISRN Microbiol.* 2013;2013:1–7.

50. Bosshard C, Stephan R, Tasara T. Application of an F57 Sequence-Based Real-Time PCR Assay for *Mycobacterium paratuberculosis* Detection in Bulk Tank Raw Milk and Slaughtered Healthy Dairy Cows. *2006;69(7):1662–7.*
51. Kuenstner JT, Naser S, Chamberlin W, Borody T, Graham DY, McNees A, et al. The Consensus from the *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) Conference 2017. *Front Public Heal* [Internet]. 2017;5(September):1–5. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpubh.2017.00208/full>
52. Galiero A, Fratini F, Mataragka A, Turchi B, Nuvoloni R, Ikonomopoulos J, et al. Detection of *mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cheeses from small ruminants in Tuscany. *Int J Food Microbiol* [Internet]. 2016;217:195–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.10.029>
53. Office International des Epizootics (OIE), Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). Manual de Procedimiento Técnico Diagnóstico de Paratuberculosis. In: Manual de procedimiento técnico Diagnóstico de paratuberculosis. 2000. p. 1–17.
54. Spath EJA, Becker BE. Análisis epidemiológico de 8 años de diagnósticos de enfermedades de los bovinos. *INTA - Boletín Técnico* N° 160; 2012. p.

- 1–56.
55. Paolicchi FA, Spath EJA, Santangelo MP, Traveria G, Alonso B, Mundo S. Paratuberculosis in Argentina: Current status of disease control and application of diagnostic tools. In: 6th paraTB Forum of International Colloquium of Paratuberculosis (ICP). 2018. p. 52–7.
 56. Bannantine JP, Bermudez LE. No Holes Barred : Invasion of the Intestinal Mucosa by *Mycobacterium avium* subsp . paratuberculosis. *Infect Immun.* 2013;81(11):3960–5.
 57. Secott TE, Lin TL, Wu CC. *Mycobacterium avium* subsp . paratuberculosis Fibronectin Attachment Protein Facilitates M-Cell Targeting and Invasion through a Fibronectin Bridge with Host Integrins. *Infect Immun.* 2004;72(7):3724–32.
 58. Momotani E, Whipple DL, Thiermann AB, Cheville NF. Role of M Cells and Macrophages in the Entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into Domes of Ileal Peyer ’ s Patches in Calves. *Vet Pathol.* 1988;137:131–7.
 59. Hostetter J, Steadham E, Haynes J, Bailey T, Cheville N. Phagosomal maturation and intracellular survival of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in J774 cells. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2003;26:269–83.
 60. Weiss D, Souza C. Review: Modulation of Mononuclear Phagocyte Function by *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Vet Pathol.* 2008;45(6):829–41.

61. Gumber S, Whittington RJ. Comparison of BACTEC 460 and MGIT 960 systems for the culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* S strain and observations on the effect of inclusion of ampicillin in culture media to reduce contamination. *Vet Microbiol.* 2007;119(1):42–52.
62. Thirunavukkarasu S, Silva K De, Whittington RJ, Plain KM. Veterinary Immunology and Immunopathology In vivo and in vitro expression pattern of Toll-like receptors in *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection. *Vet Immunol Immunopathol* [Internet]. 2013;156(1–2):20–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2013.08.008>
63. Kabara E, Coussens PM. Infection of primary bovine macrophages with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* suppresses host cell apoptosis. *Front Microbiol.* 2012;3(215):1–10.
64. Periasamy S, Tripathi BN, Singh N. Mechanisms of *Mycobacterium avium* subsp . *paratuberculosis* induced apoptosis and necrosis in bovine macrophages. *Vet Microbiol* [Internet]. 2013;165(3–4):392–401. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.03.030>
65. Benedictus A, Mitchell RM, Linde-Widmann M, Sweeney R, Fyock T, Schukken YH, et al. Transmission parameters of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections in a dairy herd going through a control program. *Prev Vet Med.* 2008;83(3–4):215–27.
66. Geraghty T, Graham DA, Mullowney P, More SJ. A review of bovine Johne’s disease control activities in 6 endemically infected countries. *Prev Vet Med* [Internet]. 2014;116(1–2):1–11. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.06.003>

67. Mundo S, Ubacyt BA. Paratuberculosis Bovina. Infovet, Sitio Argentino de Producción Animal. 2008;13(102):11–4.
68. Kudahl AB, Nielsen SS, Østergaard S. Economy , Efficacy , and Feasibility of a Risk-Based Control Program Against Paratuberculosis. *J Dairy Sci* [Internet]. 2008;91(12):4599–609. Available from:
<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2008-1257>
69. Weber MF. peer reviewed Risk management of paratuberculosis in dairy herds. 2006;59(10):555–61.
70. MT. C. Diagnosis of paratuberculosis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1996;12(2):357–71.
71. Nielsen SS, Toft N. Age-Specific Characteristics of ELISA and Fecal Culture for Purpose-Specific Testing for Paratuberculosis. *J Dairy Sci* [Internet]. 2006;89(2):569–79. Available from:
[http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72120-8](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72120-8)
72. Yokomizo Y, Yugi H, Merkal RS. A method for avoiding false - positive reactions in an enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculosis. *Nihon Juigaku Zasshi Japanese J Vet Sci.* 1985;47(1):111–9.
73. OIE WO for AH. Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres (mamíferos, aves y abejas) Volumen I. 2004.

74. Mon L, Viale M, Baschetti G, Pinedo FA, Gioffre A, Traver G, et al. Search for *Mycobacterium avium* Subspecies paratuberculosis Antigens for the Diagnosis of Paratuberculosis. *J Vet Med Int.* 2012;1–9.
75. Russell D. Herrold. Egg yolk agar medium for the growth of tubercle bacilli. *Tubercle.* 1931;236–41.
76. OIE WO for AH. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 2.1.15. Paratuberculosis. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* [Internet]. 2014. p. 1–16. Available from: <http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>
77. Whitlock RH, Wells SJ, Sweeney RW, Van Tiem J. ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): Sensitivity and specificity of each method. *Vet Microbiol.* 2000;77(3–4):387–98.
78. Nielsen SS, Toft N. Ante mortem diagnosis of paratuberculosis : A review of accuracies of ELISA , interferon- g assay and faecal culture techniques. *Vet Microbiol.* 2008;129:217–35.
79. Cousins D, Evans R, Francis B. Use of BACTEC radiometric culture method and polymerase chain reaction for the rapid screening of faeces and tissues for *Mycobacterium paratuberculosis*. *Aust Vet J.* 1995;72(12):458–62.
80. Damato JJ, Collins MT. Growth of *Mycobacterium paratuberculosis* in radiometric, middlebrook and egg-based media. *Vet Microbiol.*

- 1990;22(1):31–42.
81. Whittington RJ, Marsh I, Turner MJ, McAllister S, Choy E, Eamens GJ, et al. Rapid detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in clinical samples from ruminants and in spiked environmental samples by modified BACTEC 12B radiometric culture and direct confirmation by IS900 PCR. *J Clin Microbiol.* 1998;36(3):701–7.
 82. Stevenson K, Alvarez J, Bakker D, Biet F, De Juan L, Denham S, et al. Occurrence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* across host species and European countries with evidence for transmission between wildlife and domestic ruminants. *BMC Microbiol.* 2009;9:1–13.
 83. Green EP, Tizard MLV, Moss MT, Thompson J, Winterbourne DJ, Mcfadden JJ, et al. Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Nucleic Acids Res.* 1989;17(22):9063–73.
 84. Möbius P, Luyven G, Hotzel H, Köhler H. High genetic diversity among *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains from German cattle herds shown by combination of IS900 restriction fragment length polymorphism analysis and mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem. *J Clin Microbiol.* 2008;46(3):972–81.
 85. Twort F. A method for isolating and growing the lepra bacillus of man. *R Soc Proc.* 1910;156–8.
 86. Twort F, Ingram G. A Method for Isolating and Cultivating the

- Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis*, Johne, and some Experiments on the Preparation of a Diagnostic Vaccine for Pseudo-tuberculous Enteritis of Bovines. Proc R Soc London [Internet]. 1912;84(575):517–42. Available from: <http://www.jstor.org/stable/80638>
87. Snow GA, Zinecard D, Water S, Acid H, Water S, Acid H, et al. Mycobactins: iron-chelating growth factors from mycobacteria. *Bacteriol Rev* [Internet]. 1970;34(2):99–125. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4918634><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC408312><http://jac.oxfordjournals.org/content/50/2/177.abstract><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=408312&tool=pmcentrez&>
88. Barclay R, Ewing DF, Ratledge C. Isolation, identification, and structural analysis of the mycobactins of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium scrofulaceum*, and *Mycobacterium paratuberculosis*. *J Bacteriol*. 1985;164(2):896–903.
89. Merkal RS, McCullough WG. A new mycobactin, mycobactin J, from *Mycobacterium paratuberculosis*. *Curr Microbiol*. 1982;7(6):333–5.
90. McCullough WG, Merkal RS. Structure of mycobactin J. *Curr Microbiol*. 1982;7(6):337–41.
91. Francis J, Macturk H, Madinaveitia J, Snow G. Mycobactin, a growth factor for *Mycobacterium johnei*. 1. Isolation from *Mycobacterium phlei*. *Biochem J* [Internet]. 1953;55(4):596. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1269366/>

92. Morrison NE, Johns NE, Wood HU, Leprosy M. Circumvention of the Mycobactin Requirement of *Mycobacterium paratuberculosis*. *J Bacteriol.* 1965;89(3):762–7.
93. Wang J, Moolji J, Dufort A, Staffa A, Domenech P, Reed MB, et al. Iron Acquisition in. 2016;198(5):857–66.
94. Chiodini RJ, Coffin J, Condon C, Kunimoto D, McFadden JJ. Abolish *Mycobacterium paratuberculosis* strain 18 [2]. *J Clin Microbiol.* 1993;31(7):1956–8.
95. Collins DM, Stephens DM de LG. Comparison of polymerase chain reaction tests and faecal culture for detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine faeces. *Vet Microbiol.* 1993;36(3–4):289–99.
96. Bull TJ, Hermon-taylor J, Pavlik I, El-zaatari F, Tizard M. Characterization of IS 900 loci in *Mycobacterium avium* subsp . *paratuberculosis* and development of multiplex PCR typing. *Res Microbiol.* 2000;146:2185–97.
97. Travería GE. Análisis antigénico de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* y diagnóstico de la *paratuberculosis* bovina mediante enzimo inmuno ensayo (ELISA). 2003.
98. Costanzo G, Pinedo FA, Mon ML, Viale M, Gil A, Illia MC, et al. Accuracy assessment and screening of a dairy herd with *paratuberculosis* by three different ELISAs. *Vet Microbiol.* 2012;156(1–2):183–8.
99. Collins J, Huynh M. Estimation of diagnostic test accuracy without full verification: A review of latent class methods. *Stat Med.*

- 2014;33(24):4141–69.
100. Abhilash M, Jyothi P, Priyanka B, Nagasuma C. Complete Genome Sequences of a *Mycobacterium smegmatis* Laboratory Strain (MC2 155) and Isoniazid - Resistant (4XR1/R2) Mutant Strains. *genomeA*. 2015;3(1):4–5.
 101. Hall RM, Ratledge C. A simple method for the production of mycobactin, the lipid-soluble siderophore, from mycobacteria. *FEMS Microbiol Lett*. 1982;15(2):133–6.
 102. Barclay R, Ratledge C. Iron-binding compounds of *Mycobacterium avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, and mycobactin-dependent *M. paratuberculosis* and *M. avium*. *J Bacteriol*. 1983;153(3):1138–46.
 103. Merkal RS, Mc Culloch WG, Takayama K. Mycobactins, the state of art. *Bull Inst Pasteur*. 1981;79:251–9.
 104. Herthnek D, Bölske G. New PCR systems to confirm real-time PCR detection of *Mycobacterium avium* subsp . *paratuberculosis*. *BMC Microbiol*. 2006;8(1):1–8.
 105. Scherrer S, Stephan R, Zumthor JP, Kipar A. Morphological and Molecular Characterization of a New *Mycobacterium avium* Subsp . *paratuberculosis* S-Type Strain Genotype in Goats. 2019;6(July).
 106. Hazra A, Gogtay N. Biostatistics Series Module 6: Correlation and Linear Regression. *Indian J Dermatol* [Internet]. 2016;61(6):593–601. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5122272/>

107. Kuenstner JT, Naser S, Chamberlin W, Borody T, Graham DY, McNees A, et al. The Consensus from the Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis (MAP) Conference 2017. *Front Public Heal.* 2017;
108. Wells SJ, Whitlock RH, Lindeman CJ, Fyock T. Evaluation of bacteriologic culture of pooled fecal samples for detection of Mycobacterium paratuberculosis. *Am J Vet Res.* 2002;63(8):1207–11.
109. Rangel S, Arango-sabogal JC, Labrecque O, Paré J, Fairbrother J, Buczinski S, et al. Evaluation of a PCR assay on overgrown individual fecal samples cultured for Mycobacterium avium subsp . paratuberculosis. *J Vet Diagnostic Investig.* 2017;29(6):912–5.
110. Sweeney RW, Whitlock RH, McAdams SC. Comparison of three DNA preparation methods for real-time polymerase chain reaction confirmation of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis growth in an automated broth culture system. *J Vet Diagnostic Investig.* 2006;18(6):587–90.
111. Arango-Sabogal JC, Fecteau G, Paré J, Roy JP, Labrecque O, Côté G, et al. Estimating diagnostic accuracy of fecal culture in liquid media for the detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infections in Québec dairy cows: A latent class model. *Prev Vet Med [Internet].* 2018;160(August):26–34. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.09.025>
112. Romero M, Alvarado Pinedo MF, Moyano RD, Peralta L, Sosa P, Santangelo M, et al. Medio de cultivo líquido para el diagnóstico de paratuberculosis bovina . Aplicación y análisis comparativo con el medio

- de Herrold : resultados preliminares. *Analecta Vet.* 2018;38(1):50–5.
113. Shin SJ, Jun HH, Manning EJB, Collins MT. Rapid and reliable method for quantification of *Mycobacterium paratuberculosis* by use of the BACTEC MGIT 960 system. *J Clin Microbiol.* 2007;45(6):1941–8.
114. Sevilla IA, Garrido JM, Molina E, Geijo M V., Elguezabal N, Vázquez P, et al. Development and evaluation of a novel multicopy-element-targeting triplex PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in feces. *Appl Environ Microbiol.* 2014;80(12):3757–68.
115. Biet F, Boschirolib ML, Thorelb MF, Guilloteau LA. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). *Vet Res.* 2005;36:411–36.
116. Vasini Rosell B, Gioffré A, Cirone K, Morsella C, Mendez L, Moravkova M, et al. Comparison between two molecular genotyping methods to evaluate genetic diversity for *mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in Argentina. In: 14th international colloquium on paratuberculosis. Riviera Maya, México; 2018. p. 74.
117. Vasini Rosell B, Cirone K, Morsella C, Mendez L, Gioffré A, Paolicchi F. MLVA genotyping of *mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates in Argentina. In: 14th international colloquium on paratuberculosis. Riviera Maya, México; 2018. p. 75.
118. Fernández-silva JA, Abdulmawjood A, Akineden Ö, Bülte M. Genotypes of *Mycobacterium avium* subsp . *paratuberculosis* from South American

countries determined by two methods based on genomic repetitive sequences. *Trop Anim Health Prod.* 2012;44(6):1123–6.

119. De Kruijf AM, Lesniak ON, Yearsley D. Low genetic diversity of bovine *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis isolates originating from the Republic of Ireland detected by MIRU-VNTR genotyping. *Vet Microbiol [Internet]*. 2017;203:280–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.03.029>
120. Ahlstrom C, Barkema HW, Stevenson K, Zadoks RN, Biek R, Kao R, et al. Limitations of variable number of tandem repeat typing identified through whole genome sequencing of *Mycobacterium avium* subsp . paratuberculosis on a national and herd level. *BMC Genomics.* 2015;16:1–9.
121. Bauman CA, Jones-bitton A, Ahlstrom C, Mutharia L, Buck J De, Jansen J, et al. Identification of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis strains isolated from dairy goats and dairy sheep in Ontario , Canada. *Can J Vet Res.* 2017;1:304–7.
122. Hong-Tae Park, Park H-E, Park W Bin, Kim S, Hur TY, Jung Y-H, et al. Genetic diversity of bovine *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis discriminated by IS1311 PCR-REA, MIRU-VNTR, and MLSSR genotyping. *J Vet Sci.* 2018;19(5):627–34.

ANEXO

Costos para la preparación de un litro de medio de cultivo HEYM y líquido.

Droga	Cant.	Laboratorio	HEYM	USD	₺	Líqu.	USD	₺
Peptona de carne	500 gr	Britania	9g	3,16	184,4			
Piruvato de sodio	100 gr	Britania	4,1g	1,73	100,3			
Agar	500 gr	Britania	15,3g	10	581,7	1,8g	0,59	34,34
Extracto de carne	500 gr	Britania	2,7g	1,31	75,98			
Glicerol	1 lt	Biopack	34ml	0,37	21,46			
Cloruro de sodio	1000 gr	Biopack	4,5g	0,04	2,32	0,22g	0,001	0,1
Verde de malaquita	100 gr	Anedra	0,1g	0,03	1,97			
Vancomicina	500 mg	farmacia	100mg	4,12	239			
Yema de huevo* Middlebrook 7H9			120ml		60	170ml		85
Broth	500 gr	Difco				3,1g	7,3	423,4
Bacto Casitone	454 gr	Oxoid				0,680g	0,32	18,56
Ácido nalidixico	5 gr	Sigma Aldrich	100mg	3,01	174,6	200mg	6,02	349,1
Nistatina	5 gr	Sigma Aldrich	800mg	158	9186	800mg	158	9186
Dextrosa	1 kg	Cicarelli Sigma				534mg	0,01	0,64
Albúmina bovina	1 kg	Aldrich				1,34g	4,02	233,2
MJ	2 mg	Allied Inc.	2mg	120	6960			
MN						1mg	0,57	33
COSTO FINAL POR LITRO					17588			10363

Referencias: Cant: cantidad; USD: precio en dólares; ₺: precio en pesos argentinos (calculado a 58₺/USD, agosto 2019); Líq: medio de cultivo líquido; MJ: micobactina J®; MN: micobactina/extracto nacional descrito en esta tesis. *Las yemas de huevo fueron obtenidas a partir de huevos comerciales para asegurar la ausencia de antibióticos que sesguen los resultados.