



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados**

**PARATUBERCULOSIS BOVINA: ESTRATEGIAS PARA EL  
DIAGNÓSTICO EN REBAÑOS LECHEROS DE LA CUENCA SUR  
DEL URUGUAY**

DMTV Alejandra Suanes Martínez

TESIS DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

**URUGUAY  
2011**

**ESTA HOJA VA EN BLANCO**



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados**

**PARATUBERCULOSIS BOVINA: ESTRATEGIAS PARA EL  
DIAGNÓSTICO EN RODEOS LECHEROS DE LA CUENCA SUR  
DEL URUGUAY**

DMTV Alejandra Suanes Martinez

---

**Dr. Andrés D. Gil Rodríguez MSc PhD**  
Director de Tesis

---

**Dr. Álvaro Nuñez Alesandre Msc**  
Co-director

**2011**

**INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE**

**DEFENSA DE TESIS**

**Dr. Fernando Paolicchi MSc  
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Balcarce, Argentina  
Facultad de Ciencias Agrarias-Universidad de Mar del Plata,  
Argentina**

**Dr. José Piaggio MSc  
Facultad de Veterinaria  
Universidad de la República  
Montevideo, Uruguay**

**Dr. Javier Sanchez PhD  
Atlantic Veterinary College  
University of Prince Edward Island  
Prince Edward Island, Canada**

**AÑO  
2011**

ACTA DE DEFENSA DE TESIS

**Informe del Tribunal**



Índice	
Resumen.....	2
Summary.....	3
<b>Capitulo 1. Revisión Bibliografía</b>	
La enfermedad .....	4
Historia .....	4
Agente .....	5
Antecedentes en el Uruguay .....	6
Transmisión.....	7
Fases de la enfermedad .....	9
Diagnóstico .....	11
Seroprevalencia .....	16
Control.....	18
Enfermedad de Crhon.....	20
Bibliografía.....	21
Capitulo 2. Objetivo general y específicos.....	33
<b>Capitulo 3. Muestreo Ambiental</b>	
Introducción.....	35
Materiales & Métodos .....	36
Resultados .....	40
Discusión.....	43
Bibliografía.....	44
<b>Capitulo 4. Muestreo por Pools de materia fecal</b>	
Introducción.....	48
Materiales y Métodos .....	50
Resultados .....	53
Discusión.....	57
Bibliografía.....	59
<b>Capitulo 5. Evaluación de un Test Serológico (ELISA)</b>	
Introducción.....	64
Materiales y Métodos .....	66
Resultados .....	67
Discusión.....	70
Bibliografía.....	72
Conclusiones.....	76
Anexo I.....	79



## Resumen

La Paratuberculosis, (PT) también conocida como Enfermedad de Johne es una enfermedad entérica crónica y progresiva de los rumiantes y animales silvestres, producida por una bacteria: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map). La PT se caracteriza clínicamente en bovinos por diarrea crónica, debilidad, pérdida de peso, hipoproteinemia y muerte. Así mismo se la ha asociado a una enfermedad en humanos denominada enfermedad de Crohn, siendo el Map aislado de biopsias de intestino de pacientes con esta enfermedad. Se estudiaron 3 herramientas de diagnóstico para detectar rebaños infectados por Map. Se muestrearon 9 establecimientos lecheros. Se extrajeron muestras ambientales en 8 áreas diferentes en promedio. Así mismo se extrajeron muestras de sangre y de materia fecal individual de 45 bovinos mayores de 2 años en producción. Con las muestras de materia fecal se realizaron pools de 3, 6 y 9 muestras individuales por pool. Tanto las muestras de materia fecal individual, como las muestras de pools y ambientales fueron procesadas por el método de centrifugación y cultivadas en el medio de cultivo Herrold con micobactina. Se obtuvieron 6 muestras de cultivo de materia fecal individual positivas de 408 sembradas. Así mismo se obtuvieron 2, 2, y 3 muestras de pools positivos de los pools de 3, 6 y 9 respectivamente. La sensibilidad de rodeo del método de pools fue de 11% (1/9), 22% (2/9) y 22% (2/9) para los pools de 3, 6 y 9 respectivamente. El cultivo individual tuvo una sensibilidad de rebaño de 44 %. El método de muestro ambiental detectó 2 de los establecimientos positivos de los 9 muestreados, las áreas con mayor porcentaje de positivos fue el estercolero de tambo y la sala previo al ordeño. Las muestras de sangre fueron procesadas por la técnica de ELISA indirecto, se obtuvieron 14 muestras seropositivas de 451 analizadas, la sensibilidad y especificidad de la técnica con respecto al cultivo individual fue de 16,67% y 97,01% respectivamente. La sensibilidad de rebaño fue de 77, 78%. De los 9 establecimientos muestreados las 3 técnicas coincidieron en clasificar como positivos 2 de los 9. Si bien el número de muestras fue pequeño y por tanto los resultados no se pueden proyectar a la población general este trabajo espera contribuir con el conocimiento de la Paratuberculosis en el Uruguay y generar nuevas hipótesis para futuros trabajos.

## Summary

Paratuberculosis, or Johne's Disease, is a chronic intestinal disease caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, (*Map*), and characterized in cattle by chronic diarrhea, weakness, lost of weight, hipoproteinemia and death. In some reports is also associated with humans enteritis, Crohn's disease, being even the *Map* isolated of intestine biopsies of patients. This trial studied 3 diagnostic tools to detect infected herds by *Map*. Nine dairy farms were sampled. Environmental samples were collected, 8 different areas on average. Also blood samples were taken and feces of 45 individual cattle over 2 years in production. The fecal samples were pools of 3, 6 and 9 individual samples per pool. Both individual fecal samples, such as pools and environmental samples were processed by the centrifugation method and cultured in Herrold with mycobactin. There were 6 samples of fecal culture positive out of 408 individual. Also 2, 2, and 3 samples positive pools of pools of 3, 6 and 9 respectively. The herd sensitivity of the pooled method was 11% (1 / 9), 22% (2 / 9) and 22% (2 / 9) for pools of 3, 6 and 9 respectively. Herd Sensitivity of individual culture was 44%. The environmental sampling method detected 2 of the 9 sampled areas with the highest percentage of positives was the manure and pre-milking area. Blood samples were processed by indirect ELISA, we obtained 14 positive samples out of 451 tested, and the sensitivity and specificity of the test respect to individual culture was 16.67% and 97.01% respectively. The Herd sensitivity of the ELISA was 77, 78%. Of the 9 herds sampled the 3 methods agreed to classify as positive 2 of 9 herds. While the number of samples was small and therefore the results can not be projected to the general population this study hopes to contribute to the knowledge of Paratuberculosis in Uruguay and generate new hypotheses for future work.

## Capítulo 1. Revisión Bibliográfica

### La enfermedad

La Paratuberculosis, (PT) también conocida como Enfermedad de Johne es una enfermedad entérica crónica y progresiva de los rumiantes y animales silvestres, producida por una bacteria: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map). El Map se caracteriza por ser gram positiva, facultativa, ácido alcohol resistente, mycobactina dependiente.

La PT se caracteriza clínicamente en bovinos por diarrea crónica, debilidad, pérdida de peso, hipoproteinemia y muerte. Esta enfermedad se encuentra en la Lista de Enfermedades del Código Internacional de Salud Animal de la OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal).

Uno de los aspectos relevantes de la enfermedad es el estatus subclínico, estado que ha dejado en vilo a muchos investigadores en el presente y en el pasado.

### Agente

El complejo *Mycobacterium avium* (MAC) está constituido principalmente por un grupo de micobacterias medioambientales relacionadas entre sí y en el cual se incluyen *Mycobacterium avium* subespecie *avium*, *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (Map), *Mycobacterium avium* subespecie *hominissuis*, *Mycobacterium avium* subespecie *silvaticum* y *Mycobacterium intracellulare* (Inderlied et al., 1993). Algunos autores incluyen otras especies como *Mycobacterium scrofulaceum* (Inderlied et al., 1993), aunque actualmente esta especie ha sido descartada como miembro de MAC por carecer de relación con *M. avium* o *M. intracellulare*.

Los miembros de este complejo MAC presentan características tanto genéticas como fenotípicas particulares, las cuales les permiten el crecimiento en biotipos naturales sin perder por ello su potencial patógeno. Entre estas características se destacan el amplio rango de temperaturas dentro del cual son capaces de crecer (desde 20° C hasta 37° C) y la capacidad de adaptación a nuevos sustratos con amplios rangos de pH (desde 4 a 7,5 pH), (Portaels y Pattyn, 1982). A su vez, todos los miembros de MAC son ácido-alcohol resistentes, presentan un crecimiento lento y producen un pigmento amarillo en ausencia de luz (Inderlied et al., 1993).

Además, los miembros de MAC han sido aislados fuera de sus hospedadores en el medio ambiente y en una amplia variedad de biotopos, entre los que se incluyen: el suelo, tanques de almacenaje de agua, agua de desecho, agua municipal, aerosoles, protozoos, etc. (Biet et al., 2005).

El Map se caracteriza por ser bacilos rectos o ligeramente curvados de 1-10 µm de largo y 0,2-0,6 µm de ancho, inmóviles y considerados Gram positivos a pesar de la escasa penetración de colorante por medio de esta técnica. Esto es debido a la presencia de ácidos micólicos en la compleja envoltura celular de que están provistos, gracias a la cual poseen su característica resistencia

Las micobacterias son microorganismos aerobios o microaerófilos, quimioorganotrofos, y su temperatura óptima de crecimiento se sitúa entre 30 y 45° C (Wayne et al., 1986, Levy-Frebault et al., 1992). Producen exoquelina y micobactina, dos sideróforos necesarios para metabolizar el hierro.

Los medios de cultivo sólidos en los que son aisladas son a base de huevo (Herrold, Löwenstein-Jensen, Stonebrink) o con base sintética (Middlebrook 7H10 o 7H11), también pueden crecer en medios líquidos como Middlebrook 7H9. Los medios de cultivo mas usados son suplementados con micobactina aunque también podría usarse hemina, ácido oleico u otras sustancias (Goodfellow et al., 1998). A pesar del desarrollo de medios específicos para el crecimiento de este microorganismo, continua siendo una bacteria de crecimiento fastidioso debido a su lento crecimiento y a su tendencia a formar grumos o a crecer mal en suspensión (Juste et al., 2000).

Desde el punto de vista molecular su estructura de ADN contiene secuencias de inserción (IS), elementos que han resultado muy útiles en la identificación y diferenciación de especies. Los IS son pequeñas secuencias de ADN transponible que pueden encontrarse varias veces repetidas a lo largo del genoma (Sevilla, 2007; Mayer 2005). Las de mayor interés son IS6110 (Thierry et al., 1990), IS1081 (Collins et al., 1991), IS1245 (Guerrero et al., 1995), IS1547 (Fang et al., 1999), IS1311 (Guerrero et al., 1994), IS900 (Green et al., 1989), IS901 (Kunze et al., 1991), IS902 (Moss et al., 1992a) y ISMav2 (Strommenger et al., 2001).

### **Antecedentes en el Uruguay**

Los antecedentes en Uruguay indican que fue diagnosticada por primera vez en el año 1944 por Cassamagnaghi A. (1947), quien estudio casos clínicos de animales con diarrea crónica y emaciación. Estudios posteriores de Errico y col. (1983) aislaron el agente en rebaños lecheros, de animales con sospecha clínica de la enfermedad y desde entonces, se han reportado casos fundamentalmente en rebaños lecheros. Estudios que realizaron en un período de cinco años a partir de muestras patológicas con lesiones granulomatosas se destaca que el 21% eran del grupo *M.avium*.(Errico y col, 2003)

Errico y col., en 1990 realizaron un ensayo sobre el control de la enfermedad en establecimientos lecheros, donde recomiendan medidas a fin de controlar la enfermedad basada en un correcto diagnóstico, medidas de manejo e higiene.

Aunque desde 1944 se describen casos clínicos de la enfermedad, se desconocía cuál era la situación de los rebaños lecheros del país en cuanto a la seroprevalencia del *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, elemento imprescindible para planificar estrategias de control. Estudios de Piaggio y Núñez, (2002 y 2003) determinaron la seroprevalencia en rebaños lecheros de la cuenca lechera más importante de Uruguay.

Núñez (2006), realizó un estudio que analizó diferentes factores de riesgo y prácticas de manejo asociados a la infección con *Map*. La estimación de la seroprevalencia proyectada a la población bajo estudio fue de 5,6% ± 1,3 y un 70,2% ± 8,1 de los establecimientos resultaron con al menos un animal seropositivo. Mediante un modelo multivariable de regresión logística se encontró que el número de vacas en ordeño y la variable correspondiente a si en el área de parto encierran o tratan animales enfermos presentaba una

tendencia a estar asociada a la seroprevalencia. La distancia de la fuente del agua de bebida al estercolero también presentó una asociación positiva con la seroprevalencia. Mientras que la seroprevalencia es similar a la encontrada en la mayoría de los estudios realizados en el mundo, se destaca el alto número de establecimientos con al menos 1 animal seropositivo.

### **Transmisión**

Algunos autores reportan dosis infectantes de  $10^6 - 10^8$  unidades formadoras de colonias (ufc) de Map por gramo de materia fecal y agregan que unos pocos miligramos de materia fecal ingeridos por un animal joven son infecciosos. (Jørgensen et al., 1982; Whittington et al., 2000; Behr and Collins 2010). Chiodini et al. (1996) encontraron que 50 a 1000 ufc son infecciosas para un animal joven.

La infección por Map es generalmente a través de la ingestión oral de alimentación contaminada por materia fecal o leche cruda contaminada.

La transmisión puede ser de dos tipos: vertical y/o horizontal (Esquema I).

### **Transmisión prenatal**

Investigaciones han reportado que aproximadamente el 25% de los terneros nacidos de vacas con signos clínicos se infectan en el útero (Seitz et al., 1989; Sweeney et al., 1992; Behr and Collins 2010).

Aly et al. (2005) reportan que terneros nacidos de animales infectados tiene 6.6 veces más probabilidad de nacer infectados, comparado con terneros nacidos de vacas seronegativas (Behr and Collins 2010)

El semen de toros usados en cabañas es de bajo riesgo, sobre todo si los animales son testeados como negativos por lo menos 2 veces al año (Anon., 2004; Behr and Collins 2010).

### **Transmisión postnatal**

La mayoría de los autores coinciden en que la vía feco-oral es el principal modo de transmisión (Clarke, 1997).

Map es eliminado con las heces dando como resultado la contaminación del medio ambiente, donde pueden sobrevivir durante mucho tiempo. Se han reportado supervivencias en el ambiente de hasta 252 días en estado de latencia (Jørgensen, 1977). Por lo tanto el medio ambiente es una importante fuente de infección para los animales susceptibles (Sweeney, 1996).

Tavornpanich et al. (2004) reportaron que las vacas en las etapas posteriores de la lactancia eran más propensas a eliminar el microorganismo en las heces comparado con animales en el período seco, aunque aún no se ha dilucidado el mecanismo biológico de este fenómeno.

Map también puede ser excretada en el calostro y leche (Taylor et al., 1981; Sweeney et al., 1992a; Streeter et al., 1995), los cuales se utilizan a menudo para la alimentación de

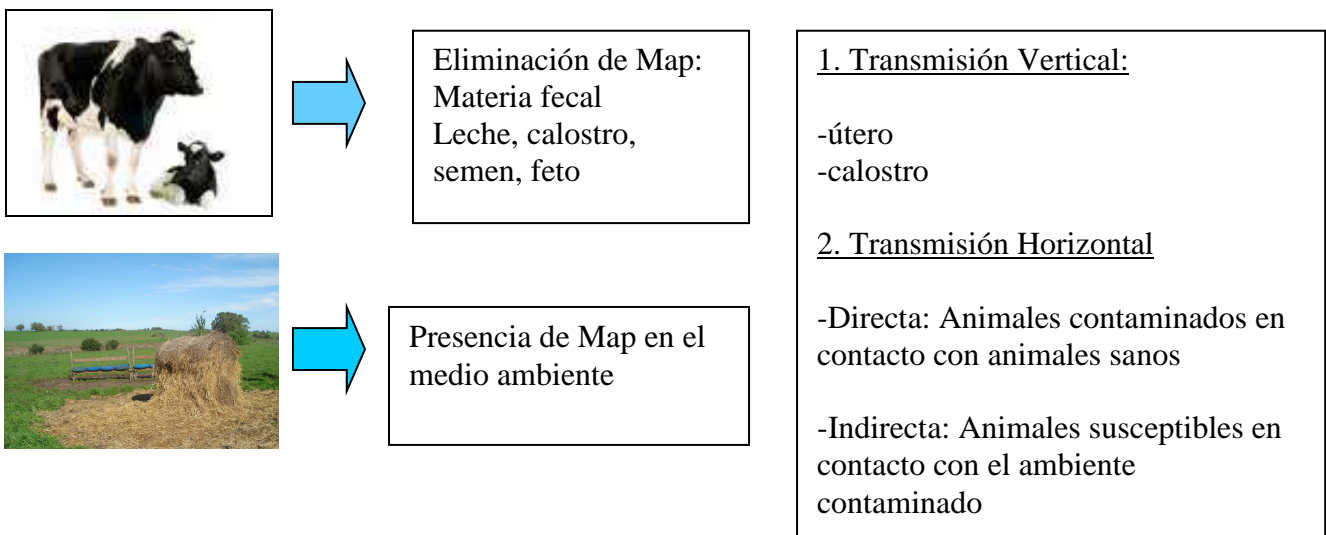
los terneros en forma de pool. La naturaleza intracelular del Map, sobre todo en los macrófagos, explica esta transmisión. Se ha reportado que vacas infectadas eliminan 50 ufc/50ml de leche, además se ha detectado la presencia de ADN del microorganismo en leche.

Se ha identificado Map viables en leche pasteurizada, lo que llevó a que se realizaran diferentes estudios relacionando a la viabilidad y la pasteurización láctea. Dichos resultados reportaron que la técnica usual de pasteurización de 72° C durante 15 segundos presenta una población residual de Map que permanece viable (Grant et al., 1999; Stabel et al., 2000; Behr and Collins 2010).

Esquema I. Representación de la fuente de infección y trasmisión de Map

Fuentes de Infección:

Formas de Transmisión:



**Fases de la enfermedad**

Hay 4 fases o etapas descritas para la enfermedad de Johne o paratuberculosis en ganado bovino:

**1-Fase I o Silenciosa:**

Se caracteriza por ser una etapa “silenciosa”, no detectables. Normalmente esta etapa se produce en todos los terneros, vaquillonas, y categorías jóvenes en general con menos de dos años de edad y los animales adultos expuestos a dosis continuas de Map. Los animales infectados, en esta etapa, rara vez se detectan con los pruebas de laboratorio actualmente disponibles, incluyendo el cultivo de heces, PCR (del inglés *Polymerase Chain Reaction*) o las pruebas serológicas (ELISA, siglas del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). Si estos animales son muestreados frecuentemente Map podría detectarse en bajas concentraciones en las heces de animales infectados (Waters et al., 2003; Behr and Collins 2010).

En el examen de necropsia, los microorganismos no son visibles en los tejidos, pero puede ser detectado a partir de cultivos de muestras intestinales seriadas, dicho hallazgo demostraría la difusión temprana de la enfermedad (Sweeney et al., 2006; Stabel et al., 2008).

Esta etapa progresa lentamente durante muchos meses o años a la fase II o III en rebaños con alta prevalencia. Esto sugiere que el progreso de la enfermedad es dosis dependiente del Map, además de depender de la edad de la infección (Collins et al., 2010; Behr and Collins 2010).

### **2-Fase II Portadores Inaparentes.**

Esta fase se caracteriza por ser subclínica y por lo general se produce en animales mayores de 2 años. Los animales en esta etapa parecen sanos, pero están eliminando un número suficiente de Map en la materia fecal para ser detectado en los cultivos de materia fecal. Las pruebas serológicas (ELISA) detectan algunos animales, pero no todos. Los animales seropositivos deben ser confirmados por cultivo fecal (Behr and Collins 2010)

Estos animales constituyen una grave amenaza a menudo oculta, siendo la fuente de infección de otros animales susceptibles a través de la contaminación del medio ambiente.

### **3-Fase III o Clínica.**

La enfermedad clínica de Johne, ocurre en cualquier animal con infección avanzada, el inicio se asocia a menudo con un período de estrés, por ejemplo: parto. El ganado, en esta etapa, elimina Map en heces de forma intermitente. Los animales pierden peso sin alterar el apetito, además se evidencia una caída en la producción de leche. Algunos animales parecen recuperarse, pero a menudo vuelven a recaer en el período de estrés siguiente. La mayoría de estos animales están eliminando miles de millones de organismos. Estos animales son positivos en pruebas de cultivo de materia fecal y la mayoría son positivos en las pruebas serológicas (ELISA). Los signos clínicos suelen durar varias semanas o meses antes de que los animales sean eliminados del rebaño (Behr and Collins 2010) .

### **4-Fase IV o Clínica Avanzada**

Los animales en el estadio IV de la enfermedad son débiles, caquéticos y por lo general tienen diarrea crónica y profusa. En esta fase es característico el edema intermandibular o en botella. Los animales pueden progresar rápidamente de la etapa II a la etapa IV, a veces en unas pocas semanas, pero una progresión más gradual es más típica. Una vez que la diarrea y la hipoproteinemia son profusas, la condición del animal empeora rápidamente.

Como en la mayoría de las enfermedades de curso crónico, en la paratuberculosis existe lo que se denomina "iceberg" - En un rebaño infectado típico, por cada animal en la fase III (que presenten signos clínicos), muchos otros animales están presentes en etapas tempranas de la enfermedad, ejemplo 10-15 terneros o vaquillonas en fase I. (Behr and Collins 2010)

. El caso clínico representa sólo la "punta del iceberg" de la infección de la enfermedad de Johne. Sin embargo, sólo el 30-40 % de todos los animales infectados pueden

ser detectados incluso con técnicas de cultivo bacteriológico de materia fecal que es la técnica de referencia (Collins y col, 2010).

## **Diagnóstico**

Las pruebas de diagnóstico se realizan generalmente para tomar decisiones respecto a una población o a un individuo. Estas decisiones pueden ser, dependiendo del resultado, la confirmación con otra prueba más específica, la eliminación del animal, la terapia del mismo, o la aplicación de un programa de control. Los resultados de las pruebas también se pueden usar para establecer un pronóstico. Generalmente en las infecciones crónicas ocasionadas por Map, el pronóstico es reservado a grave, ya que la terapia no es una opción. Sin embargo medidas de control pueden establecerse para evitar la propagación del Map en el rebaño. Por lo tanto, el conocimiento del comportamiento de una prueba diagnóstica es esencial para la toma de decisiones.

## **Pruebas Diagnósticas**

### **Detección directa de Map**

*Diagnóstico macroscópico.* Existen signos característicos de la enfermedad como el engrosamiento de la mucosa intestinal, edema en intestino y ganglios mesentéricos. Sin embargo, es preciso realizar un análisis histológico de los distintos segmentos intestinales y de los ganglios mesentéricos, así como el cultivo de los mismos y posterior aislamiento del agente etiológico para realizar un diagnóstico certero de la enfermedad.

*Tinción directa.* Este método se basa en el empleo de la tinción de Ziehl-Neelsen sobre un frotis obtenido a partir de la mucosa intestinal o de las heces. Se basa en la visualización de agregados de bacilos ácido alcohol resistente en grupos de tres o cuatro. Es una técnica de muy baja sensibilidad en la etapa subclínica de la enfermedad, adquiriendo más relevancia en estados clínicos avanzados. El éxito de esta técnica depende del número de bacterias presentes en la muestra y de la experiencia del bacteriólogo. Sin embargo, la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes no es específico de Map, con lo que este ensayo no es concluyente.

*Cultivo Bacteriológico.* En esta categoría se encuentran el cultivo tradicional en medios de cultivos sólidos, cultivo con método radiométrico y no radiométrico

El cultivo tradicional es el método más empleado en la actualidad en la gran mayoría de los países y se considera la prueba de referencia ante mortem. La principal desventaja que presenta este método es el crecimiento lento característico de Map, además de la presencia de formas no cultivables de Map (Gunnarsson y Fodstad, 1979; Whittington y col. 2000). Este método, de acuerdo al “Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres” de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) es el que presenta 100% especificidad, no dando lugar a falsos positivos (OIE, 2008). El cultivo a partir de heces en medio sólido es capaz de detectar entre el 30 y el 40% del ganado infectado, ya que únicamente detecta animales que excretan más de 100 unidades formadoras de colonias por gramo de heces (Whitlock y col. 2000; Committee on Diagnosis and Control of Johne's Disease, 2003). No obstante, éste método únicamente identifica a los animales en un estadio



clínico de la enfermedad avanzado siendo detectados tan sólo unos pocos animales en los estadios iniciales (Whitlock y col. 2000).

El método radiométrico está basado en la detección del isótopo de  $\text{CO}_2^{14}$ , el cual es liberado a partir del ácido palmítico (que contiene  $\text{C}_{14}$ ) como consecuencia del metabolismo bacteriano. Este método detecta con mayor rapidez la presencia de crecimiento de Map en comparación con el cultivo tradicional en medio sólido, habiéndose descrito aislamientos positivos en nueve días tras la inoculación del medio de cultivo (Damato y Collins, 1990). Pero tiene la desventaja de ser un método muy costoso.

Los métodos de cultivo no radiométricos se fundamenta en el empleo de medio de cultivo en el que se incorpora un sistema de detección que reacciona cuando se produce una alteración en la concentración de oxígeno, dióxido de carbono o presión en cada tubo de cultivo (Committee on Diagnosis and Control of Johne's Disease, 2003). En un ensayo donde se compara este método con el tradicional los investigadores reportaron que este método de cultivo radiométrico era capaz de detectar Map más rápido que el método convencional y por lo tanto era una buena alternativa al cultivo convencional.

### **Extracción directa de ADN y Detección por técnicas moleculares.**

La extracción de ADN, la cual puede realizarse directamente desde el tejido o muestra biológica presenta ventajas como la de la obtención de resultados rápidos en comparación con la técnica de cultivo (Garrido y col. 2000; Sevilla, 2007). El principal inconveniente de esta técnica es la presencia de inhibidores de PCR, sobretodo en el caso de la extracción de muestras procedentes de heces (Vary y col. 1990; Garrido y col. 2000).

En la actualidad los métodos de extracción directa de ADN descritos no están estandarizados y por lo tanto este tipo de ensayo se considera complementario a los ensayos de diagnóstico estandarizados descritos, ya que aumenta la sensibilidad en cuanto a la detección de animales positivos.

El primer PCR desarrollado fue basado en la IS900, realizándose primers para esa secuencia, pero algunos autores usando esos primers amplificaron productos de PCR de Micobacterias ambientales relacionados con la IS900, por lo que existe la posibilidad de obtener resultados falsos positivos. (Moreira A.R., y col, 1999, Gasteiner J, y col. 2000; Giese S.B. y Ahrens P. 2000; Garrido J.M., y col 2000, Harris N.B. y Barletta R.G.2001; Strommenger B. y col 2001; Shin S.J. y col. 2003). Existen variantes del PCR como ser el Multiplex PCR (MPIL), que requiere cantidades mínimas de DNA, el Nested PCR y el PCR en tiempo real.

La sensibilidad y especificidad del PCR en tiempo real aplicado sobre muestras de materia fecal comparado al cultivo fue de 0.60 y 0.97 respectivamente. (Alinovi et al., 2009). Recientemente, el USDA (United State Department of Agriculture) aprobó la licencia de un kit de PCR en tiempo real (Johne Tetracore de VetAlert™'s). Este kit está aprobado para detección de Map en ganado a través de la detección directa de Map en muestras fecales ([www.tetracore.com](http://www.tetracore.com)).

### **Detección de la respuesta inmune del hospedador**

#### **Respuesta Inmune**

El *Map*, es un patógeno intracelular, muy cercano al *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. leprae*, y especialmente el *M. avium*, se caracteriza al igual que los otros por infectar macrófagos donde sobreviven y evaden la respuesta inmune. La respuesta inmune a la infección con *Map* se caracteriza por una fuerte respuesta mediada por células en forma temprana durante estadios subclínicos de la infección, y fuertes respuestas humorales durante las fases clínicas tardías de la enfermedad. Animales mayores de 10 meses aparecen como más resistentes a la infección y aunque el mecanismo exacto no se conoce, involucra la maduración del sistema inmune incluyendo el balance entre varias subpoblaciones de células T así como su distribución en los tejidos.

El huésped normalmente se infecta con el *Map* siendo terneros, vía ingestión de material fecal, leche o calostro, siendo posible también la transmisión transplacentaria. Una vez ingresado al organismo, el *Map* penetra la superficie de la mucosa gastrointestinal donde es fagocitado por macrófagos. Se cree que las células M sirven como puerta de entrada para el *Map* al sistema linfático. A las células M les faltan microvellosidades, enzimas digestivas y mucosidad de la superficie proporcionando al microorganismo una condición apta para adherirse. Los microorganismos vivos cruzan la célula M por transcitosis y penetran por el lado baso lateral de la célula siendo fagocitados por macrófagos o células dendríticas. Luego, los microorganismos pueden permanecer intactos dentro de la célula fagocíticas o pueden procesarse y ser presentados al linfocito T. (Chiodini, R.J.y Davis W.1993; Stabel, J.R. 2000; Coussens P. 2001; Coussens P. 2004; Sigurðardottir .et al., 2004)

La respuesta inmune mediada por células es modulada por varios subconjuntos de linfocitos T, siendo esenciales para proporcionar protección y prevenir la progresión de la enfermedad. La secreción de citoquinas por las poblaciones de células T activa a los macrófagos para destruir al *Map* fagocitado así como a otras células T a fin de contener la infección. Cuando el macrófago infectado se activa, producirá interleukina-1 (IL-1), un mensajero celular que activa las células T. Como consecuencia los linfocitos T activados producen IL-2 que resulta en la expansión clonal específica de células citolíticas CD8+ y T helper CD4+. Mientras se activan las células T, los macrófagos presentan al antígeno asociado con moléculas MHC de clase II a las células CD4+. Antígenos asociados con moléculas de MHC de clase I son presentados a las células CD8+. La población de linfocitos T helper puede ser dividida en dos subpoblaciones, T helper CD4+ tipo 1 que produce IL-2, TNF- $\beta$  e IFN- $\gamma$ , citoquinas que dirigen la función inmune mediada por células. En contraste la subpoblación T helper tipo2 de linfocitos es responsable de la inducción de la función inmune humoral vía citoquinas IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. (Chiodini, R.J.1996; Stabel, J.R. 2000).

### **Pruebas serológicas**

Estos ensayos se basan en la detección de la inmunidad humoral y son empleados principalmente en el caso de rumiantes domésticos.

*Test de fijación del complemento (FC)*. Esta prueba ha sido empleada como estándar para el diagnóstico de la enfermedad de Johne en ganado vacuno. Este ensayo está especialmente indicado en animales con sospecha de infección clínica, sin embargo su aplicación como herramienta de control poblacional de la enfermedad de Johne es limitada. En la actualidad, este ensayo es demandado por algunos países en los que se importa ganado vacuno (OIE, 2008). Esta prueba diagnóstica se caracteriza por su capacidad para detectar

animales altamente infectados, sin embargo es una técnica que presenta una baja sensibilidad y tiene tendencia a producir falsos positivos (Whitlock y col.2000).

*Inmunodifusión en gel de agararosa (IDGA)*. Esta prueba está principalmente indicada para la confirmación de la enfermedad de Johne en ganado caprino, ovino y vacuno con presencia de signos clínicos (Sherman y col. 1984). El empleo de esta técnica en pequeños rumiantes en Nueva Zelanda y Australia ha demostrado una mayor sensibilidad y especificidad que el ELISA (Gwozdz y col. 2000; Hope y col. 2000; Sergeant y col. 2003; OIE, 2008).

*Ensayo inmunoenzimático (ELISA)*. Esta técnica se caracteriza por presentar una mayor sensibilidad en comparación con las técnicas de FC y IDGA en cuanto a la detección de animales subclínicamente infectados que actúan como portadores de la enfermedad (OIE, 2008). Esta técnica es capaz de detectar entre un 30-40% del ganado vacuno identificado como positivo por el cultivo de heces en medio sólido (Whitlock y col. 2000). Sin embargo, esta sensibilidad depende de la edad del animal, aunque hay estudios en los que se ha calculado que la sensibilidad global total estimada para los diferentes grupos de edad es del 15% (Whitlock y col. 2000; Jubb y col. 2004). Entre las principales ventajas de esta técnica destacan la automatización, la repetibilidad, el elevado número de muestras que es capaz de analizar y la objetividad de los resultados (Sergeant y col. 2003; OIE, 2008). En la actualidad es una de las pruebas que más se emplea para la determinación del nivel de infección en rebaños (Nielsen y col. 2001). Además, la descripción de nuevos antígenos y anticuerpos más sensibles y específicos están permitiendo el desarrollo de nuevos test de ELISA con mayores valores de sensibilidad y especificidad (Griffin y col. 2005; Eda y col. 2006; Speer y col. 2006).

### **Ensayo de la respuesta inmune mediada por células**

La inmunidad mediada por células precede a la producción de anticuerpos detectables y por lo general, los animales que se encuentran subclínicamente infectados con Map normalmente no reaccionan a las pruebas serológicas, pero si producen una reacción positiva a los ensayos que miden la inmunidad mediada por células (OIE, 2008).

*Prueba del gamma interferón ( $\gamma$ -IFN)*. Este ensayo está basado en la medición de la producción de  $\gamma$ -IFN por los linfocitos, los cuales son sensibilizados con antígenos específicos [tuberculina derivada de la proteína estándar aviar purificada (PPD aviar), (PPD bovina o jonnina)] durante un período de incubación de entre 18 y 36 horas (Wood y col. 1990). A continuación, la detección cuantitativa del  $\gamma$ -IFN producido se realiza a través de un ELISA de tipo sándwich, el cual emplea dos anticuerpos monoclonales dirigidos al  $\gamma$ -IFN. En la literatura se ha descrito que la especificidad de este ensayo varía entre el 67 y el 94% (Kalis y col. 2003) en función de los criterios de interpretación del mismo, ya que este ensayo fue inicialmente desarrollado para el diagnóstico de la tuberculosis bovina (OIE, 2008).

*Prueba de Hipersensibilidad retardada*. Esta prueba de hipersensibilidad retardada también mide la inmunidad mediada por células que se produce tras la inoculación intradérmica de un antígeno y la posterior medición de la induración del punto de inoculación a las 72 h. Inicialmente, los antígenos empleado fueron la PPD aviar y johnina hasta que un estudio demostró que la sensibilización de algunos animales con otras especies de micobacterias miembros de MAC hacía que ambos antígenos no presentaran una elevada

especificidad para el diagnóstico de la paratuberculosis (Inderlied y col. 1993). La interpretación de esta prueba es difícil por la falta de estandarización en lo que respecta a la lectura de la prueba. En un estudio se vio que el antígeno johnina presentaba una especificidad del 88,8% en ganado vacuno si el punto de corte de la induración dérmica era superior a 2 mm, del 91,3% si la induración era superior a 3 mm y del 93,5% si era mayor a 4 mm (Kalis y col. 2003).

### **Pruebas diagnosticas a nivel individual y poblacional**

Las pruebas diagnosticas pueden ser utilizadas tanto para el diagnostico individual de los animales infectados, denominadas a nivel individual o para la detección de rebaños infectados o libres de la infección por Map, a estas ultimas se les denomina pruebas a nivel del rebaño.

Las pruebas de diagnóstico de Map individuales ante-mortem incluyen pruebas de detección directa del agente y pruebas de detección indirecta a partir de la respuesta inmune, la cual puede ser inmunidad mediada por células o humoral (Nielsen et al., 2001; Saxmose Nielsen S; 2009).

Las pruebas a nivel de establecimientos puede ser usado para clasificar los rebaños como "infectado" o "no infectados", como de "bajo riesgo" o de "alto riesgo". Estas clasificaciones se pueden utilizar para reducir el riesgo de transmisión entre poblaciones animales. El resultado de la prueba a nivel de rebaños se puede utilizar como un indicador de si un esquema de programa de control debería de establecerse o esta funcionando correctamente o para realizar una evaluación de la prevalencia en rebaños infectados. Las pruebas a nivel de rebaños incluyen cultivos de materia fecal individuales, pool de de materia fecal, muestreo ambiental y pruebas serológicas a un porcentaje del rebaños (USDA, Uniform Program Standards for the Voluntary Bovine Johne's Disease Control Program, 2010) (Saxmose Nielsen S; 2009)

### **Seroprevalencia**

La paratuberculosis es una enfermedad de creciente prevalencia en especies ganaderas y está ampliamente distribuida por todo el mundo (Chiodini et al., 1984, Kennedy et al., 2001). Sin embargo, la prevalencia real de esta enfermedad puede estar enmascarada por las dificultades que plantea su diagnóstico. Las técnicas utilizadas en la detección de animales infectados en general no son especialmente sensibles, a lo que hay que añadir el largo período de latencia desde la infección hasta la aparición de síntomas, y la variabilidad del curso de la enfermedad entre animales.

La prevalencia de PT a nivel de rebaños en los países con una importante industria láctea se calculó en aproximadamente 10% (Sockett, 1996). Más recientemente, en, Bélgica (Boelaert et al., 2000), los Países Bajos (Muskens et al., 2000), Dinamarca (Nielsen et al., 2000), Canadá (VanLeeuwen et al., 2001) y EE.UU. (Wells y Wagner, 2000), la prevalencia a nivel de rebaños se ha estimado a 30-50% (Behr and Collins 2010)

En los últimos años varios autores han validado muestreos ambientales y de pooles de materia fecal para detectar establecimientos infectados por Map. (Lombard et al., 2006; Wells et al.2003)

Otra alternativa para estudiar la presencia del agente en un establecimiento son las pruebas a nivel rebaños a partir de muestras del tanque de leche, aunque sólo una relativamente pequeña proporción de vacas que excretan Map en las heces lo hacen también en la leche (Sweeney et al., 1992; Streeter et al., 1995.; Jayarao et al., 2004, Behr and Collins 2010).

En bovinos de carne la prevalencia a nivel de rebaños fue reportada por varios autores, siendo de 8 a 54% con al menos un animal positivo (Thorne y Hardin, 1997; Dargatz et al., 2001; Waldner et al., 2002; Hill et al., 2003; Roussel et al., 2005; Scott et al., 2007; Behr and Collins 2010).

Estudios epidemiológicos que se han realizado para estimar la prevalencia de la infección de Map en el estado de Río Grande do Sul (Gómez et al., 2005), revelaron la presencia de infección en casi todos los establecimientos testeados. En Argentina, Paolicchi et al., (2002) presentaron resultados de seroprevalencia real en diferentes regiones del país, siendo la Provincia de Buenos Aires la que presentó resultados más altos, 26,5% en ganado de carne y 56% en ganado lechero; mientras que en el resto de Provincias testeadas la seroprevalencia oscilo entre 0% y 7%.

Nielsen et al., (2009) realizaron una revisión de los estudios de prevalencia en Europa concluyendo que la prevalencia de ganado bovino parece ser 20% y fue de 3-5% en varios países. La prevalencia de establecimientos fue superior al 50% y ningún país reporto prevalencia de 0 % o cercanas a este valor. Estudios en algunos países de la Unión Europea presentaron resultados de seroprevalencia baja, como Austria donde un estudio transversal encuentra un 2% de animales seropositivos, resaltando la mayor seroprevalencia en bovinos entre 5 y 7 años de edad (Gasteiner J. et al., 1999).

La prevalencia en los Estados Unidos varía entre 20% - 40% en rebaños con más de 300 cabezas. Collins et al., 1994, reportaron en el estado de Wisconsin los resultados de un muestreo transversal de 158 rebaños y 4990 animales testeados donde encontraron una seroprevalencia aparente de 7,2%, con un 50% de rebaños con al menos 1 animal positivo. Johnson-Ifearulundu Y.J y Kaneene J.B (1999), encontraron en el estado de Michigan un 6,9% de bovinos serológicamente positivos, con un 66% de establecimientos con más de 1 animal positivo. Otro estudio, esta vez realizado en el estado de Colorado, por Hirst et al., (2004), presentan un 4,12% de vacas adultas seropositivas de las 10280 testadas, con un 2,65% de prevalencia dentro de los rebaños. Los resultados de seroprevalencia señalados anteriormente contrastan con el encontrado en 1990 por Braun K. et al., que reportan en el estado de Florida un 17,1% de seropositividad. Estudios del NAHMS, (1997) muestran una seroprevalencia ajustada para Map en rebaños lecheros de más de 30 animales en producción de 3,4%, con un 21% de establecimientos seropositivos. Thorne J. y Hardin L. (1997), reportan un 8% de seroprevalencia aparente en ganado lechero, que ajustado por sensibilidad y especificidad de la prueba dio 16% con un 47% de establecimientos positivos en el estado de Missouri.

## **Control**

Los programas de control de la enfermedad de Johne se basan en el conocimiento de las vías de infección de Map, en la persistencia del microorganismo en el medioambiente y

en el desarrollo de métodos para la reducción de la exposición de Map en el hábitat animal. Los requerimientos mínimos para el control de la enfermedad incluyen la identificación de los puntos críticos de transmisión de la enfermedad, el desarrollo de herramientas de muestreo y diagnóstico para la identificación de animales excretores, la mejora de la trazabilidad e identificación de animales de manera individual, la presencia de fuentes con animales de reemplazo libres de la enfermedad, etc. (Kennedy y Benedictus, 2001).

Existen diferentes programas de control en diferentes países y la mayoría son planes voluntarios de control. Un ejemplo es el “The Voluntary Johne’s Disease Herd Status Program” en EEUU, el mismo fue establecido por primera vez en el año 1998, para detectar rebaños de bajo riesgo para Map. Los objetivos incluyen un mínimo de normas a aplicar para la certificación de los rebaños en bajo riesgo (Carter, 2007)

Otro ejemplo de programa de control es en Australia en el cual la prevalencia de Map es muy diferente en las diferentes regiones, es rara en el Oeste del país pero endémica en el Sur y en algunos estados como en Victoria, New South Wales y Tasmania. Hasta el año 1996 los estados presentaban programas de control por cada región pero la procuración hizo que a partir de ese año se lograra un plan integrado de control nacional (Saxmose Nielsen, 2009)

En los Países Bajos existe un programa de control iniciado en 1998 el cual tuvo los siguientes objetivos: a) reducir la exposición del consumidor a Map, b) minimizar las pérdidas económicas, y c) la erradicación del Map de los establecimientos ganaderos. Sin embargo Weber et al., (2008a) reportaron que en 2005 solamente 473 establecimientos tenían el estatus de libre de la enfermedad. En el año 2006 se agrega al programa el monitoreo de los establecimientos a partir del ELISA para leche, al cual se le elevó el punto de corte del indicado por el comerciante, para disminuir los animales falsos positivos (Weber et al., 2008). Los animales positivos al ELISA son confirmados por cultivo fecal. (Saxmose Nielsen, 2009)

## **Enfermedad de Crhon**

La enfermedad de Crohn es una afección de los humanos, que se caracteriza por un proceso inflamatorio crónico intestinal, que afecta más comúnmente íleon y colon. Esta enfermedad afecta seriamente la calidad de vida del paciente y fue descrita con claridad en 1932 por Crohn, Ginsburg y Oppenheimer, habiendo sido anteriormente encontrada en pacientes en Escocia. Estos casos fueron llamados granuloma no específico.

En la década de los 80, la enfermedad fue reconocida afectando otras porciones del tracto digestivo, como ser boca, esófago, estómago y otros tejidos como la piel, músculo y hueso.

Durante el transcurso de la enfermedad se ha observado que los órganos comúnmente afectados son el íleon terminal y el ciego, el íleon o el colon, que en la gran mayoría de los casos viene acompañado de procesos de perforación, formación de abscesos, fístulas, constricción y obstrucción intestinal, entre otros.

La causa de la enfermedad es desconocida, sin embargo hay diversas hipótesis como la de una respuesta autoinmune aberrante del hospedador a antígenos indefinidos o contra

agentes infecciosos incluyendo a *Map*, *E. coli*, una infección vírica crónica, etc (Chiodini R.J, 1989). Aunque también se han considerado otras posibles etiologías y orígenes como una isquemia crónica y micro-infartación, la presencia de una respuesta anómala a un componente dietético, una respuesta inflamatoria alterada a la microflora intestinal normal, la predisposición genética a la enfermedad (debido a la presencia de SNPs en el gen NOD2), etc. (Committee on Diagnosis and Control of Johne's Disease, 2003).

Hasta la fecha hay numerosos trabajos que apoyan y otros que ponen en entredicho la hipótesis de *M. a. paratuberculosis* como agente causal de la enfermedad de Crohn.

Uno de los antecedentes que refuerzan la idea de *Map* como una posible zoonosis es que *Map* ha sido detectado hasta el momento en leche, queso, carne y agua destinados al consumo humano y por lo tanto estos pueden suponer una posible ruta de exposición de *Map* para el hombre (Corti y Stephan, 2002; Donaghy y col. 2004; Pickup y col. 2005; Clark y col. 2006; Pickup y col. 2006; Abubakar y col. 2007; Jaravata y col. 2007; Alonso-Hearn y col. 2009; Behr and Collins, 2010 ). En Argentina, se utilizaron 70 muestras de leche pasteurizada comercial sometida a distintos tratamientos térmicos, aislando *Map* viables del 2.86% las que fueron confirmadas por PCR y RFLP del patrón "A", el más prevalente de los aislamientos desde animales en Argentina y similar al denominado C17 europeo (Paolicchi et al., 2008)

Así mismo Chamberlin y col. (2001), señalan que los avances tecnológicos en el diagnóstico, con el desarrollo de técnicas moleculares, han permitido la identificación o el aislamiento del *Map* en mayor proporción de tejidos con enfermedad de Crohn que en controles. Entre el 35 y 40% de los pacientes con enfermedad de Crohn presentan *Map*, detectados por aislamiento o por hibridación in situ. Sechi y col en 2005, detectan por PCR y cultivo que la mayoría de los pacientes con Crohn, en la isla de Sardinia, están infectados con *Map*. Nacer y col en 2004, detectan *Map* viable en sangre periférica de una proporción importante de pacientes con enfermedad de Crohn.

Los genes asociados con la enfermedad de Crohn sugieren que una respuesta inmune inadecuada a un patógeno intracelular puede ser el principal desencadenante de la enfermedad. *Map* es un patógeno intracelular y parece plausible que esté desencadenando la enfermedad (Ferweda y col. 2007; Parkes y col. 2007).

Por otro lado algunos autores encuentran argumentos que contradicen la hipótesis de la posible zoonosis. Kanazawa y col en 1999 realizan un estudio en 13 pacientes con enfermedad de Crohn. Utilizando la técnica de PCR anidado para la IS900, no detectan *Map*, por lo que sugieren que el *Map* no participa en la patogénesis de la enfermedad de Crohn. Ellingson J. y col. 2003 por la técnica de PCR no detectan la secuencia de inserción IS900 en pacientes con enfermedad de Crohn, y concluyen que en esos tejidos y por medio de esa técnica no es posible asociar al *Map* con la enfermedad de Crohn.

En un estudio se vio que la población rural más expuesta a *Map* en comparación con otros sectores poblacionales no presentó mayores tasas de la enfermedad de Crohn que el resto (Jones y col. 2006). Además Suecia tiene las tasas de prevalencia de la enfermedad de Crohn más altas a pesar de presentar una prevalencia baja de la enfermedad de Johne (Ekbohm y col. 1991; Sternberg y Viske, 2003 ).

Estudios en Uruguay realizados por Iade y col. 2005 describen las características clínicas y evolutivas de pacientes con enfermedad de Crohn, destacando que se presenta fundamentalmente en adolescentes y adultos jóvenes, con un predominio de lesiones en yeyuno, ileon, pero con un mayor compromiso del colon que lo esperado.

### **Bibliografía**

1. Abubakar, I., Myhill, D.J., Hart, A.R., Lake, I.R., Harvey, I., Rhodes, J.M. y col. (2007). A case-control study of drinking water and dairy products in Crohn's Disease, further investigation of the possible role of *Mycobacterium avium paratuberculosis*. *Am J Epidemiol* 165: 776-783.
2. Alonso-Hearn, M., Molina, E., Geijo, M., Vazquez, P., Sevilla, I., Garrido, J.M., y Juste, R.A. (2009). Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from muscle tissue of naturally infected cattle. *Foodborne Pathog Dis* 6: 513-518.
3. Aly, S.S. and Thurmond, M.C. (2005). Evaluation of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* infection of dairy cows attributable to infection status of the dam. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 227, 450-454.
4. Anon. (2004). The risk of transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* via bovine semen. *EFSA J*: 110, 1-59.
5. Boelaert, F., Walravens, K., Biront, P., Vermeersch, J.P., Berkvens, D. and Godfroid, J. (2000). Prevalence of paratuberculosis (Johne's disease) in the Belgian cattle population. *Veterinary Microbiology* 77, 269-281.
6. Behr M y Collins D. (2010). *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control*. CAB International
7. Bosshard, C., Stephan, R. and Tasara, T. (2006) Application of an F57 sequence-based real-time PCR assay for *Mycobacterium paratuberculosis* detection in bulk tank raw milk and slaughtered healthy dairy cows. *Journal of Food Protection* 69, 1662-1667.
8. Böttcher J, Gangl A. (2005). Value of bulk-milk serology for control of Johne's disease. *Proceedings of the 8th International Colloquium on Paratuberculosis*, Aug. 14-18, Copenhagen, Denmark, p. 477-484.
9. Böttcher, J., Gangl, A., (2004). *Mycobacterium avium* ssp. *Paratuberculosis* combined serological testing and classification of individual animals and herds. *J. Vet. Med. B*. 51, 443-448.
10. Brock, T.D. (1999). *Robert Koch: a Life in Medicine and Bacteriology*. ASM Press, Herndon, Virginia, USA.
11. Buergelt CD, Hall C, McEntee K, Duncan JR. (1978). Pathological evaluation of paratuberculosis in naturally infected cattle. *Vet Pathol*. 15: 196-207.



12. Buergelt CD, Williams JE. (2004). Nested PCR on blood and milk for the detection of *Mycobacterium avium subsp paratuberculosis* DNA in clinical and subclinical bovine paratuberculosis. *Aust Vet J.* 82: 497–503
13. Bulaga LL. (1998). U.S. Voluntary Johne's Disease Program for cattle. Proceedings of the 102nd Annual meeting of the United States Animal Health Association, Minneapolis, Minnesota, USA, October 3–9, 1998, p. 420–433.
14. Bulaga, L.L. (1999). US Voluntary Johne's Disease Herd Status Program for Cattle. In: Manning EJB, Collins MT (Eds.), Proceedings of the 6th International Colloquium on Paratuberculosis. Madison, Wisconsin. p 39-47.
15. Carter MA. (2007). An overview of the Voluntary Bovine Johne's Disease Control Program in the United States of America. *Bulletin of IDF.* 410: 14–19.
16. Chamberlin W., Graham D., Hulten K, El-Zimaity M., Schwartz M., Naser S., Shafran I., El-Zaatari A. (2001). Review article: *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* as one cause of Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*; 15: 337-346
17. Chiodini RJ, Van Kruiningen HJ y Merkal RS. (1984). Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): The current status and future prospects. *Cornell Vet.*, 74:218-62.
18. Chiodini, R.J. (1989). Crohn's disease and mycobacterioses: a review and comparison of two disease entities. *Clin Microbiol. Rev.* 2: 90-117.
19. Chiodini, R.J., Davis W.C. (1993). The cellular immunology of bovine paratuberculosis: immunity may be regulated by CD4+ helper and CD8+ immunoregulatory T lymphocytes which down-regulate gamma/delta+ T-cell cytotoxicity. *Microb. Pathog.* 14:355–347.
20. Clark, D.L., Anderson, J.L., Koziczowski, J.J., y Ellingson, J.L. (2006). Detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis genetic components in retail cheese curds purchased in Wisconsin and Minnesota by PCR. *Mol Cell Probes* 20: 197-202.
21. Clarke, C.J. (1997). The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *Journal of Comparative Pathology* 116, 217–261.
22. Cocito C., Gilot P., Coene M., De Kesel M, Poupart P., Vannuffel P. (1994). Paratuberculosis. *Cli. Microbiol. Rev.* 7: 328-345.
23. Committee on Diagnosis and Control of Johne's Disease, and Board on Agriculture and Natural Resources. *Diagnosis and control of Johne's disease* (2003) Washington, D.C, The National Academies Press.
24. Corti, S. and Stephan, R. (2002). Detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis specific IS900 insertion sequences in bulk tank milk samples obtained from different regions throughout Switzerland. *BMC Microbiology* 2, 15.

25. Coussens P. (2001). *Mycobacterium paratuberculosis* and the bovine immune system. *Anim. Health Res. Rev.* 2: 141-161.
26. Coussens P. (2004). Model for Immune Response to *Mycobacterium avium* ssp. *Paratuberculosis* in cattle. *Infect. Immun.* 72 (6): 3089-3096.
27. Damato, J.J., y Collins, M.T. (1990). Growth of *Mycobacterium paratuberculosis* in radiometric, Middlebrook and egg-based media. *Vet Microbiol* 22: 31-42.
28. Dargatz, D.A., Byrum, B.A., Hennager, S.G., Barber, L.K., Koprak, C.A., Wagner, B.A. and Wells, S.J. (2001). Prevalence of antibodies against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* among beef cow-calf herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 219, 497-501.
29. Collins D M., *Paratuberculosis Organism, Disease, Control.* (2010). Edited by Marcel A. Behr McGill University, Montreal, Canada
30. Donaghy, J.A., Totton, N.L., y Rowe, M.T. (2004). Persistence of *Mycobacterium paratuberculosis* during manufacture and ripening of cheddar cheese. *Appl Environ Microbiol* 70: 4899-4905.
31. Dussol C. (2004). Relations between within-herd-prevalence and bulk tank milk responses in an ELISA for detection of antibodies to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Ecole Nationale Veterinaire de Nantes, France.
32. Eamens GJ, Whittington RJ, Marsh IB, Turner MJ, Saunders V, Kemsley PD, Rayward D. (2000). Comparative sensitivity of various faecal culture methods and ELISA in dairy cattle herds with endemic Johne's disease. *Vet Microbiol.* 77: 357-367.
33. Eamens GJ, Whittington RJ, Turner MJ, Austin SL, Fell SA, Marsh IB. (2007). Evaluation of radiometric faecal culture and direct PCR on pooled faeces for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cattle. *Vet Microbiol.* 125: 22-35.
34. Eda, S., Bannantine, J.P., Waters, W.R., Mori, Y., Whitlock, R.H., Scott, M.C., y Speer, C.A. (2006). A highly sensitive and subspecies-specific surface antigen enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Johne's disease. *Clin Vaccine Immunol* 13: 837-844.
35. Ekblom, A., Helmick, C., Zack, M., y Adami, H.O. (1991). The epidemiology of inflammatory bowel disease: a large, population-based study in Sweden. *Gastroenterology* 100: 350-358.
36. Ellingson J., Cheville J., MD, Brees D., Miller J., Cheville N. (2003). Absence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* Components from Crohn's Disease Intestinal Biopsy Tissues. *Clin. Med. & Res.* 1, (3): 217-226.
37. Errico F, Bermudez J. (1983). Aislamiento de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en bovinos en el Uruguay. *Veterinaria* 19 (83): 13-16.

38. Errico F., Rossi J., Silva M., Sallanes H. Ensayo de control de la paratuberculosis (enfermedad de Johne) en un establecimiento lechero.(1990). *Veterinaria* 26 (110):10-14.
39. Ferweda, G., Kuliberg, D.J., y deJong, D.J. (2007). *Mycobacterium paratuberculosis* is recognized by Toll-like receptors and NOD2. *J.Leukoc Biol* 82: 1011-1018.
40. Garrido J.M., Cortabarraria N., Oguiza J.A., Aduriz G., Juste R.A. (2000). Use of a PCR method on fecal samples for diagnosis of sheep paratuberculosis. *Vet Microbiol.* 77 : 379-386.
41. Gasteiner J, Awad-Másalmeh M, Baumgartner W. (2000). *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* infection in cattle in Austria, diagnosis with culture, PCR, ELISA. *Vet.Microbiol.* 77 339-349.
42. Giese SB, Ahrens P. (2000). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk from clinically affected cows by PCR and culture. *Vet Microbiol.* 77: 291–297.
43. Gilardoni MV y Mundo SL. *Paratuberculosis Bovina*. (2008). *Infovet*, 13(102).
44. Gomes MJP, Asanome W, Ribeiro VR. (2005). Prevalence of infection caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) in dairy herds in Rio Grande do Sul -South Brazil. *Proceedings of the 8th International Colloquium on Paratuberculosis*, p.53.
45. Grant I.R., Ball H.J., Rowe M.T. (1999). Effect of higher pasteurization temperatures, and longer holding times at 72°C, on the inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* milk. *Letters in Applied Microbiol.* 28, 461-465.
46. Griffin, J.F., Spittle, E., Rodgers, C.R., Liggett, S., Cooper, M., Bakker, D., y Bannantine, J.P. (2005). Immunoglobulin G1 enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Johne's Disease in red deer (*Cervus elaphus*). *Clin Diagn Lab Immunol* 12: 1401-1409.
47. Gunnarsson, E., y Fodstad, F.H. (1979). Cultural and biochemical characteristics of *Mycobacterium paratuberculosis* isolated from goats in Norway. *Acta Vet Scand* 20: 122-134.
48. Gwozdz, J.M., Thompson, K.G., Manktelow, B.W., Murray, A., y West, D.M. (2000) Vaccination against paratuberculosis of lambs already infected experimentally with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Aust Vet J* 78: 560-566.
49. Haghkhah, M., Ansari-Lari, M., Novin-Baheran, A.M. and Bahramy, A. (2008). Herd-level prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* by bulk-tank milk PCR in Fars province (southern Iran) dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine* 86, 8–13.

50. Harris N.B., Barletta R.G. (2001). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. *Clin Microbiol Rev.* 14(3):489-512
51. Herthnek D, Nielsen SS, Lindberg A, Bölske G. (2008). A robust method for bacterial lysis and DNA purification to be used with real-time PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *J Microbiol Methods.* 75: 335-340.
52. Hill, B.B., West, M. and Brock, K.V. (2003). An estimated prevalence of Johne's disease in a subpopulation of Alabama beef cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 15, 21–25.
53. Hope, A.F., Kluver, P.F., Jones, S.L., y Condrón, R.J. (2000). Sensitivity and specificity of two serological tests for the detection of ovine *paratuberculosis*. *Aust Vet J* 78: 850-856.
54. Iade B., Bianchi C., Espíndola F. (2005). Características clínicas de presentación y evolutivas de una cohorte de 48 pacientes con enfermedad de Crohn en Uruguay. *Rev Med Uruguay;* 21: 303-307.
55. Inderlied, C.B., Kemper, C.A., y Bermudez, L.E. (1993). The *Mycobacterium avium* complex. *Clin Microbiol Rev* 6: 266-310.
56. Jaravata, C.V., Smith, W.L., Rensen, G.J., Ruzante, J., y Cullor, J.S. (2007). Survey of ground beef for the detection of *Mycobacterium avium paratuberculosis*. *Foodborne Pathog Dis* 4: 103-106.
57. Jayarao, B.M., Pillai, S.R., Wolfgang, D.R., Griswold, D.R., Rossiter, C.A., Tewari, D., Burns, C.M. and Hutchingson, L.J. (2004). Evaluation of IS900-PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in cattle using quarter milk and bulk tank milk samples. *Foodborne Pathogens and Disease* 1, 17–26.
58. Jones, P.H., Farver, T.B., Beaman, B., Cetinkaya, B., y Morgan, K.L. (2006). Crohn's disease in people exposed to clinical cases of bovine *paratuberculosis*. *Epidemiol Infect* 134: 49-56.
59. Jørgensen JB, (1977). Survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in slurry. *Nord Vet Med.* 29: 267–270.
60. Jørgensen, J.B. (1965). On the occurrence of *Mycobacterium johnei* in the mesenteric lymph nodes of abattoir cattle. *Nordisk Veterinær Medicin* 17, 97–102.
61. Jørgensen, J.B. (1982). An improved medium for culture of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine faeces. *Acta Veterinaria Scandinavica* 23, 325–335.
62. Jubb, T.F., Sergeant, E.S., Callinan, A.P., y Galvin, J. (2004). Estimate of the sensitivity of an ELISA used to detect Johne's disease in Victorian dairy cattle herds. *Aust Vet J* 82: 569-573.

63. Kalis CH, Hesselink JW, Barkema HW, Collins MT. (2000). Culture of strategically pooled bovine fecal samples as a method to screen herds for paratuberculosis. *J Vet Diagn Invest.* 12: 547–551.
64. Kalis, C.H., Collins, M.T., Hesselink, J.W., y Barkema, H.W. (2003). Specificity of two tests for the early diagnosis of bovine paratuberculosis based on cell-mediated immunity: the Johnin skin test and the gamma interferon assay. *Vet Microbiol* 97: 73-86.
65. Kanazawa K.,Haga Y.,Funakoshi O.,Nakajima H., Munakata A. (1999). Absence of *Mycobacterium paratuberculosis* DNA in intestinal tissues from Crohn's disease by nested polymerase chain reaction. *J Gastroenterol* 34:200-206.
66. Kennedy DJ y Benedictus G. (2001). Control of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection in agricultural species. *Rev. Off.Int.Epizoot.*, 20(1):151-79.
67. Kennedy DJ. (2007). Development in the approach to managing paratuberculosis in Australia. *Bulletin of IDF.* 410: 8–13.
68. Kobayashi S, Tsutsui T, Yamamoto T, Nishiguchi A. (2007). Current surveillance and control program on paratuberculosis in Japan. *Bulletin of IDF.* 410: 30–33.
69. Lombard JE, Wagner BA, Smith RL, McCluskey BJ, Harris BN, Payeur JB, Garry FB, Salman MD. (2006). Evaluation of environmental sampling and culture to determine *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis distribution and herd infection status on US dairy operations. *J Dairy Sci.* 89: 4163–4171.
70. Lombard, J.E., Byrem, T.M., Wagner, B.A., McCluskey, B.J. (2006). Comparison of milk and serum enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infection in dairy cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 18, 448-458.
71. Martin PA. (2008). Current value of historical and ongoing surveillance for disease freedom: surveillance for bovine Johne's disease in Western Australia. *Prev Vet Med.* 84: 291– 309.
72. Moreira A.R., Paolicchi F., Morsella C., Zumarraga M., Cataldi A., Bigi F., Alito A., Overdium P., van Soolingen D., Romano M.I. (1999). Distribution of IS900 restriction fragment length polymorphism types among animal *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis isolates from Argentina and Europe. *Vet Microbiol* 70, 251-259.
73. Murray, J.F. (1989). The white plague: down and out, or up and coming? *The American Review of Respiratory Disease* 140, 1788–1795.
74. Murray, J.F. (2004). *Mycobacterium tuberculosis* and the cause of consumption: from discovery to fact. *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine* 169, 1086–1088.

75. Muskens, J., Barkema, H.W., Russchen, E.W., van Maanen, C., Schukken, Y.H. and Bakker, D. (2000). Prevalence and regional distribution of paratuberculosis in dairy herds in the Netherlands. *Veterinary Microbiology* 77, 253–261.
76. Nielsen SS, Toft N. (2008). Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: A review of accuracies of ELISA, interferon- $\gamma$  assay and faecal culture techniques. *Vet Microbiol.* 129: 217– 235.
77. Nielsen SS, Toft N. (2008). Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: A review of accuracies of ELISA, interferon- $\gamma$  assay and faecal culture techniques. *Vet Microbiol.* 129: 217–235.
78. Nielsen SS, Toft N. (2009). A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. *Prev Vet Med.* 88: 1–19.
79. Nielsen, S.S., Houe, H., Thamsborg, S.M., y Bitsch, V. (2001). Comparison of two enzyme-linked immunosorbent assays for serologic diagnosis of paratuberculosis (Johne's disease) in cattle using different subspecies strains of *Mycobacterium avium*. *J Vet Diagn Invest* 13: 164-166.
80. Nielsen, S.S., Thamsborg, S.M., House, H. and Bitsch, V. (2000). Bulk-tank milk ELISA antibodies for estimating the prevalence of paratuberculosis in Danish dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine* 44, 1–7.
81. Núñez A. (2006). Paratuberculosis bovina en Ganado Lechero en la Cuenca Sur del país. Tesis de Maestría en Salud Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad de la República.
82. Núñez A., Piaggio J., Zaffaroni R., Cernichiaro., N Suanes A., de Freitas J., Huertas S., Gil A. (2003). Seroprevalence study of bovine paratuberculosis in dairy herds in Uruguay. In Saltijeral J. (ed), *Proceedings of the XI International Congress in Animal Hygiene*. ISAH 2003, 23-27 de febrero 2003. Ciudad de México. p 493-495.
83. OIE. (2008). *Manual de test diagnósticos y vacunas para animales terrestres*, 6<sup>a</sup> Edición. Organización Internacional de Epizootías (OIE). 1-2.
84. Paolicchi, F.A., Cirone, K., Morsella, C., Gioffré, A., Cataldi, A. and Romano, M. (2005) Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) from commercial pasteurized milk. In: Manning, E.J.B. and Nielsen, S.S. (eds) *Proceedings of the 8th International Colloquium on Paratuberculosis*. International Association for Paratuberculosis, Madison, Wisconsin, p. 342.
85. Paolicchi F., Zumarraga M., Gioffre A., Zamorano P., Morsella C., Vernal A., Cataldi A., Alito A., Romano M. (2003). Application of Different Methods for the Diagnosis of Paratuberculosis in a Dairy Cattle Herd in Argentina. *J. Vet. Med. B* 50, 20–26
86. Parkes, M., Barrett, J.C., Prescott, N.J., Tremelling, M., Anderson, C.A., Fisher, S.A. y col. (2007). Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat Genet* 39: 830-832.

87. Pérez V, Gongález J, Geijo MV, Reyes LE, Garrido M, Corpa JM, García-Pariente C, García Marin JF (2005). Pathological forms and peripheral immune response in natural bovine paratuberculosis. Proceedings of the 7th International Colloquium on Paratuberculosis, Bilbao, Spain, p. 103–109.
88. Piaggio J., Núñez A., Gil A., Johne's disease serological prevalence in Uruguayan dairy cows. (2002). In; Juste R., Geijo M., Garrido J. (ed.) Proceedings of the 7° International Colloquium of Paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis, Bilbao, España. P. 455-456.
89. Pickup, R.W., Rhodes, G., Arnott, S., Sidi-Boumedine, K., Bull, T.J., Weightman, A. (2005). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the catchment area and water of the River Taff in South Wales, United Kingdom, and its potential relationship to clustering of Crohn's disease cases in the city of Cardiff. *Appl Environ Microbiol* 71: 2130-2139.
90. Pickup, R.W., Rhodes, G., Bull, T.J., Arnott, S., Sidi-Boumedine, K., Hurley, M., y Hermon-Taylor, J. (2006). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in lake catchments, in river water abstracted for domestic use, and in effluent from domestic sewage treatment works: diverse opportunities for environmental cycling and human exposure. *Appl Environ Microbiol* 72: 4067-4077.
91. Raizman EA, Wells SJ, Godden SM, Bey RF, Oakes MJ, Bentley DC, Olsen KE. (2004). The distribution of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in the environment surrounding Minnesota dairy farms. *J Dairy Sci.* 87: 2959–2966.
92. Roussel, A.J., Libal, M.C., Whitlock, R.L., Hairgrove, T.B., Barling, K.S. and Thompson, J.A. (2005). Prevalence of and risk factors for paratuberculosis in purebred beef cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 226, 773–778.
93. Saville, W.J., Naugle, A.L. (2002). Sensitivity of test strategies used in the Voluntary Johne's Disease Herd Status Program for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* infection in dairy cattle herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 220, 1053-7.
94. Saxmose Nielsen Søren (2009). Paratuberculosis in Dairy Cattle: Epidemiological studies used for design of a control programme in Denmark. Thesis Doctoral. University of Copenhagen
95. Scott, H.M., Sorenson, O., Wu, J.T., Chow, E.Y. and Manninen, K. (2007). Seroprevalence of agroecological risk factors for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and *Neospora caninum* infection among adult beef cattle in cow-calf herds in Alberta, Canada. *Canadian Veterinary Journal* 48, 397–406.
96. Sechi L.A., Scanu A.M., Molicotti P., Cannas S., Mura M., Dettori G., Fadda G., Zanetti S.(2005). 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.*;100(7):1529-36.

97. Seitz, S.E., Heider, L.E, Heuston, W.D, Bech-Nielsen, S., Rings, D.M.and Splanger, L. (1989). Bovine fetal infection with Mycobacterium paratuberculosis. Journal of the American Veterinary Medical Association 194, 1423–1426.
98. Sergeant, E.S., Marshall, D.J., Eamens, G.J., Kearns, C., y Whittington, R.J. (2003). Evaluation of an absorbed ELISA and an agar-gel immuno-diffusion test for ovine paratuberculosis in sheep in Australia. *Prev Vet Med* 61: 235-248.
99. Sevilla Agirregomoskorta Iker (2007). Caracterización Molecular, Detección y Resistencia de Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis. Tesis Doctoral.Universidad del Pais Vasco.
100. Sherman, D.M., Markham, R.J., y Bates, F. (1984). Agar gel immunodiffusion test for diagnosis of clinical paratuberculosis in cattle. *J Am Vet Med Assoc* 185: 179-182.
101. Shin S.J., Chang Y.F., Huang C., Zhu J., Huang L.,Yoo H.S.,Shin K., Stehman S., Shin Sang J., Torres A.(2004). Development of a polymerase chain reaction test to confirm Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in culture. *J Vet Diagn. Invest* 16: 116-120.
102. Sigurðardóttir O., Valheim M., Press C. (2004). Establishment of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection in the intestine of ruminants.*Advanced Drug Delivery Reviews* 56: 819– 834.
103. Slana, I., Pralik, P., Kralova, A. and Pavlik, I. (2008). On-farm spread of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in raw milk studied by IS900 and F57 competitive real time quantitative PCR and culture examination. *International Journal of Food Microbiology* 128, 250–257.
104. Sockett DC, Conrad TA, Thomas CB, Collins MT. (1992). Evaluation of four serological tests for bovine paratuberculosis. *J Clin Microbiol.* 30: 1134–1139.
105. Sockett, D.C. (1996). Johne's disease eradication and control: regulatory implications. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice* 12, 431–440.
106. Speer, C.A., Scott, M.C., Bannantine, J.P., Waters, W.R., Mori, Y., Whitlock, R.H., y Eda, S. (2006). A novel enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infections (Johne's Disease) in cattle. *Clin Vaccine Immunol* 13: 535-540.
107. Stabel, J. R.(2000). Johne's Disease and milk: Do consumers Lane S.J., Marshall P.S.,Upton R.J.,Ratledge C.,Ewing M. (1995).Novel Extracellular Mycobactins, the Carboxymycobactins from Mycobacterium avium. *Tetrahedron Letters*, 36, (23), 4129-4132.
108. Stabel, J.R., Palmer, M.V., Harris, B., Plattner, B., Hostetter, J. and Robbe-Austerman, S. (2008). Pathogenesis of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis



- in neonatal calves after oral or intraperitoneal experimental infection. *Veterinary Microbiology* 136, 306–313.
109. Sternberg, S., y Viske, D. (2003). Control strategies for paratuberculosis in Sweden. *Acta Vet Scand* 44: 247-249.
110. Streeter, R.N., Hoffsis, G.F., Bech-Nielsen, S., Shulaw, W.P. and Rings, D.M. (1995). Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows. *American Journal of Veterinary Research* 56, 1322–1324.
111. Strommenger B., Stevenson K., Gerlach G. (2001). Isolation and diagnostic potential of ISMav2, a novel insertion sequence-like element from *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *FEMS Microbiology Letters*, 196 (1), 31-37.
112. Sweeney RW. (1996). Transmission of paratuberculosis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 12: 305–312.
113. Sweeney, R.W., Uzonna, J., Whitlock, R.H., Habecker, P.L., Chilton, P. and Scott, P. (2006). Tissue predilection sites and effect of dose on *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* organism recovery in a short-term bovine experimental oral infection model. *Research in Veterinary Science* 80, 253–259.
114. Sweeney, R.W., Whitlock, R.H. and Rosenberger, A.E. (1992). *Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. *Journal of Clinical Microbiology* 30, 166–171.
115. Sweeney, R.W., Whitlock, R.H. and Rosenberger, A.E. (1992a). *Mycobacterium paratuberculosis* isolated from fetuses of infected cows not manifesting signs of the disease. *American Journal of Veterinary Research* 53, 477–480.
116. Tavorpanich, S., Gardner, I.A., Carpenter, T.E., Johnson, W.O. (2004). Cost and effectiveness of various sampling methods for detection of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in dairy herds. *Proc of the 85th CRWAD annual meeting*, 14-16
117. Thorne, J.G. and Hardin, L.E. (1997). Estimated prevalence of paratuberculosis in Missouri, USA cattle. *Preventive Veterinary Medicine* 31, 51–57.
118. USDA; Uniform Program Standards for the Voluntary Bovine Johne's Disease Control Program Available at: [www.aphis.usda.gov/vs/naahps/johnes/](http://www.aphis.usda.gov/vs/naahps/johnes/). Set, 2010.
119. van Weering H, van Schaik G, van der Meulen A, Waal M, Franken P, van Maanen K. (2007). Diagnostic performance of the Pourquier ELISA for detection of antibodies against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in individual milk and bulk milk samples of dairy herds. *Vet Microbiol.* 125: 49–58.

120. Van Weering, H.J., Mars, M.H., Muskens, J., Middeltesch, H., van Schaik, G., (2005). The effect of biosecurity measures for paratuberculosis on the seroprevalence in Dutch
121. VanLeeuwen, J.A., Keefe, G.P., Tremblay, R., Power, C. and Wichtel, J.J. (2001). Seroprevalence of infection with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, bovine leukemia virus, and bovine viral diarrhea virus in maritime Canada dairy cattle. *Canadian Veterinary Journal* 42, 193–198.
122. Vary, P.H., Andersen, P.R., Green, E., Hermon-Taylor, J., y McFadden, J.J. (1990). Use of highly specific DNA probes and the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in Johne's disease. *J Clin Microbiol* 28: 933-937.
123. Waldner, C.L., Cunningham, G.L., Janzen, E.D. and Campbell, J.R. (2002). Survey of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis serological status in beef herds on community pastures in Saskatchewan. *Canadian Veterinary Journal* 43, 542–546.
124. Weber MF (2008). Milk quality assurance for paratuberculosis in the national Dutch Dairy herd. *The Paratuberculosis Newsletter*, Sept. 2008, p. 6.
125. Weber MF, Nielen M, Velthuis AG, van Roermund HJ, (2008a). Milk quality assurance for paratuberculosis: simulation of within-herd infection dynamics and economics. *Vet Res.* 39: 12.
126. Wells SJ, Godden SM, Lindeman CJ, Collins JE. (2003). Evaluation of bacteriologic culture of individual and pooled fecal samples for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in dairy cattle herds. *J Am Vet Med Assoc.* 223: 1022–1025.
127. Wells SJ, Whitlock RH, Wagner BA, Collins J, Garry F, Hirst H, Lawrence J, Saville WJ, Naugle AL. (2002). Sensitivity of test strategies used in the Voluntary Johne's Disease Herd Status Program for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* infection in dairy cattle herds. *J Am Vet Med Assoc.* 220: 10
128. Whitlock RH, Rosenberger AE, Siebert M, Sweeney R (1992). Environmental contamination on dairy farms with cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Proc 17th World Buiatrics Congress, St Paul, Minnesota, USA, vol. 1, p. 84–88.* 53–1057
129. Whitlock, R.H., Wells, S.J., Sweeney, R.W., y van Tiem, J. (2000). ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. *Vet Microbiol* 77: 387-398.
130. Whittington, R.J., Fell, S., Walker, D., McAllister, S., Marsh, I., Sergeant, E., Taragel, C.A., Marshall, D.J. and Links, I.J. (2000). Use of pooled fecal culture for sensitive and economic detection of *Mycobacterium avium* subsp. Paratuberculosis infection in flocks of sheep *Journal of Clinical Microbiology* 38, 2550–2556.
131. Whittington, R.J., Hope, A.F., Marshall, D.J., Taragel, C.A., y Marsh, I. (2000). Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis: IS900

restriction fragment length polymorphism and IS1311 polymorphism analyses of isolates from animals and a human in Australia. *J Clin Microbiol* 38: 3240-3248.

132. Windsor, P.A. and Whittington, R.J. (2010). Evidence for age susceptibility of cattle to Johne's disease. *The Veterinary Journal*. 184(1):37-44.

### **Objetivo general**

Evaluación de herramientas y /o estrategias diagnósticas para detectar rebaños lecheros infectados por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Enfermedad de Johne).

### **Objetivos específicos.**

1. Definir un protocolo de muestreo ambiental como herramienta para la detección de Map en rebaños lecheros.
2. Definir un protocolo de muestreo de pools de materia fecal para la detección de infección por Map en rebaños lecheros.
3. Comparación entre la prueba de ELISA indirecto, cultivo bacteriano de muestras individuales.
4. Definir la sensibilidad a nivel de rebaño para las 3 estrategias: ambiental, pool de materia fecal y ELISA indirecto

**Capítulo 3**

---

*Muestreo ambiental para la detección de Paratuberculosis bovina en establecimientos de la cuenca lechera sur de Uruguay*

## **Muestreo ambiental para la detección de *Paratuberculosis bovina* en establecimientos de la cuenca lechera sur de Uruguay**

### **Introducción**

La paratuberculosis o enfermedad de Johne (JD) es una enfermedad intestinal crónica y progresiva de los rumiantes y animales salvajes causado por una bacteria, *Mycobacterium avium subsp paratuberculosis* (Map)

Una de las rutas usuales de infección es fecal-oral, siendo los terneros las categorías más susceptibles a la infección por la exposición al estiércol infectado por animales adultos (Larsen et al, 1975; Sweeney, 1996).

La enfermedad recién se manifiesta en animales adultos y da como resultado pérdidas económicas causadas por el refugo prematuro, la reducción de la producción láctea y ganancia de peso en animales de producción.

Varios investigadores han reportado la supervivencia de Map en diferentes condiciones in vitro, que incluyen agua, orina, estiércol y temperaturas bajo cero (Lovel et al, 1944.; Larsen et al, 1956; Jørgensen, 1977). Estos hallazgos sugirieron que Map sobrevive bien en condiciones adversas.

Como un patógeno intracelular obligado, el Map no se replica fuera del huésped (Harrys y col, 2001), pero puede sobrevivir por más de un año en el medio ambiente (Whittington y col, 2004). Animales salvajes, aves (Corn y col, 2005; Beard y col, 2001), incluso los invertebrados tales como las moscas y los gusanos (Pavlik y col, 2002; Fischer y col, 2005), comúnmente encontrados en los alrededores de las explotaciones lecheras se pueden infectar con el MAP, y en ocasiones arrojar la bacteria en el medio ambiente. Aunque la cantidad de Map excretada por estos huéspedes no tradicionales es insignificante en comparación con que arrojan por el ganado (Tiwari y col, 2006), estos hospederos representan una forma en donde la bacteria puede subsistir y multiplicarse fuera de la huésped primario. La presencia de "genes relacionados con la latencia" en el genoma de Map sugiere que, en ausencia de nutrientes esenciales, Map puede entrar en un estado de latencia y luego volver a un estado viable infeccioso cuando las condiciones se vuelven favorables (Whittington y col, 2004).

Whitlock et al. (1992) muestreo el medio ambiente, sin incluir los efluentes del tambo, en 11 rebaños infectados en Pennsylvania. Los investigadores encontraron que el 45% de los establecimientos tenían muestras ambientales positivas, y sólo un establecimiento tenía una prevalencia alta de contaminación ambiental (22%).

Del mismo modo, Pavlik y col (2002) evaluaron 2906 muestras ambientales de 20 establecimientos infectados y encontró que 2% eran positivos en el muestreo ambiental.

Un estudio realizado en Minnesota por Raizman y col. (2004) encontraron que la mayoría de los áreas comunes para obtener muestras con cultivo positivo fueron los caminos de los establecimientos y las áreas de almacenamiento de estiércol, estercolero. El muestreo ambiental detectó el 78% de los establecimientos infectados de los cuales previamente se conocía el estatus de infección, por serología y cultivo individual. Berghaus y col (2006)

realizaron un estudio similar en 23 establecimientos lecheros en California y encontraron que el agua de las lagunas de efluentes era las que tenían más probabilidad de ser positivas al cultivo. Así mismo, muestras ambientales identificaron 74% de los establecimientos previamente clasificados por otras técnicas como positivos.

El Sistema Nacional de Monitoreo de Salud Animal en establecimientos lecheros (creado en USA, 2002) vigila los sistemas productivos distribuidos en 21 estados. Uno de los componentes de la vigilancia es el muestreo ambiental para la detección de rebaños infectados. Un total de 483 muestras ambientales (aproximadamente 5 por establecimiento) fueron recolectadas, y 218 (45,1%) fueron cultivo positivo para Map. Sesenta y nueve de las 98 operaciones (70,4%) tenían por lo menos una muestra del cultivo ambiental °positivo.

Pillars y col (2009) encontraron que el piso de los tambos y estercolero fueron las áreas más contaminadas, representando el 30% y 33% del total muestras positivas, respectivamente.

Recientes estudios sugieren que Map puede estar viable en las partículas de polvo depositadas en el medio ambiente, sugiriendo la posible transmisión de la infección por MAP a través de bioaerosoles (Eisenberg y col, 2010).

Con una larga persistencia en el medio ambiente y la continua excreción de microorganismos por los animales, la acumulación de Map viable en el medio ambiente ocurre, siendo un factor de riesgo para su propagación a través de un rebaño.

Una mejor comprensión de la distribución del Map en el medio ambiente puede conducir al mejoramiento de herramientas de screening como alternativas al diagnóstico a nivel de rebaño.

El objetivo de este trabajo es definir un protocolo piloto de muestreo ambiental y describir la distribución de Map en establecimientos lecheros de la cuenca sur del Uruguay.

## **Materiales & Métodos**

### **Definición Muestra ambiental**

Dado que el estiércol de los bovinos infectados es la principal fuente de contaminación ambiental por Map. Se define como una muestra ambiental el estiércol que se recoge de diferentes zonas de los establecimientos, donde la materia fecal de los animales se estanca y mezcla. Las muestras para la identificación directa o indirecta del agente se procesan por algunas de las técnicas para el diagnóstico de Map.

### **Selección de los establecimientos**

Se seleccionaron un total de 9 establecimientos lecheros, 8 del departamento de Colonia y 1 de San José. Los criterios de inclusión fueron: población bovina de al menos 30 vacas en ordeño con historia clínica (diarrea crónica) y/o antecedentes de serológica positiva de Map en el establecimiento. Los datos poblacionales fueron extraídos de la base de datos de DICOSE MGAP (División Contralor de Semovientes, Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, Uruguay). Los datos de seropositividad fueron extraídos del proyecto

“Paratuberculosis bovina en Ganado Lechero en la Cuenca Sur del país” INIA-FPTA – Facultad de Veterinaria (2006).

### **Muestreo ambiental**

Se tomaron un total de 138 muestras ambientales distribuidas entre 6 y 9 áreas diferentes en los 9 establecimientos lecheros participantes. Las áreas muestreadas fueron previamente seleccionadas teniendo en cuenta como antecedentes el muestro que se realizó en el “*Voluntary John Disease Herd Status Program del Minnesota Board of Animal Health*”. Previo a comenzar el muestreo se recibió un entrenamiento por el Dr. Scott Wells (university of Minnesota) a nivel de predio.

Las áreas muestreadas se esquematizan en cuadro III. El muestreo de áreas sufrió alguna variación por establecimiento dependiendo de las características y manejo en los mismos. La recría fue el área que más varió, realizándose en 1, 2 o 3 potreros diferentes según el establecimiento. Dos tambos tenían corrales de animales enfermos y 7 usaban el potrero de parición para alojar a dichos animales. El corral de estabulación se muestreo en un solo establecimiento el cual realizaba recría intensiva (Cuadros I y II). Los establecimientos muestreados se distribuyeron en los meses de primavera, otoño e invierno como lo indica el Cuadro I.

Cuadro I. Estación del año y total de áreas muestreadas en 9 establecimientos lecheros.

Establecimiento N°	Estación de muestreo	Total áreas	Total de Muestras Ambientales
R	Primavera (Noviembre)	8	16
S	Primavera (Octubre)	8	16
M	Primavera (Octubre)	8	16
O	Primavera (Noviembre)	6	12
U	Otoño (Marzo)	8	16
I	Otoño (Marzo)	6	12
B	Invierno (Setiembre)	9	18
E	Invierno (Setiembre)	7	14
NE	Invierno (Julio)	9	18
Total		69	138

Cuadro II. Distribución y total de áreas muestreadas en los establecimientos.

Áreas Muestreadas	N° Muestras	N° Establecimientos
Sala pre- ordeño	18	8
Estercolero Tambo	28	9
Cría terneros	18	9
Parición	20	9
Recría (I y II)	42	9
Caminos al tambo	6	3
Corral estabulación	2	1
Corral Enfermos	4	2

Cada muestra estuvo constituida por una mezcla (pool) de 4 muestras colectadas de 4



sitios diferentes de una misma área. Dentro de cada área se eligieron los lugares de mayor acumulación de estiércol, como ser bebederos y comederos (figura 1 y 2). Se colectaron 2 pools de 4 muestras por área. Las muestras se colectaron con bolsas plásticas las cuales fueron transportadas al laboratorio en forma refrigerada. Las muestras se guardaron en freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. Los establecimientos se definieron como infectados si presentaron al menos un cultivo positivo a Map, asumiendo que el cultivo de materia fecal presenta una especificidad de 100%.

Las muestras ambientales fueron sembradas en el medio bacteriológico de Herrold yema de huevo con micobactina (Herrold egg yolk medium, HEYM), utilizando cinco tubos por muestra. Un tubo Herrold yema de huevo sin micobactina (HEY) y 4 HEYM. Se utilizó un medio de cultivo comercial de Becton Dickinson. Se utilizaron 4 controles positivos de materia fecal, de los cuales obviamente ya se le conocía el estatus de positividad. El total de tubos sembrados fue de 715.

En los tubos con aislamiento de Map se contaron el número de colonias por tubo (NCT). Las mismas se clasificaron en Bajo número (1-9), Moderadas (10-49) y Alto ( $>50$ ).



Figura 1. Laguna de decantación y corral previo al ordeño.



Figura 2. Bebedero y comedero.

### **Método de cultivo de muestras ambientales.**

Dos gramos de cada muestra ambiental se colocó en 35 ml de agua estéril en un tubo cónico de 50 ml. Después de agitar durante 30 minutos, se dejó reposar por 30 minutos.

Cinco ml de la capa intermedia superior fueron transferidos a otro tubo conteniendo 25 ml de 0.9% cloruro de hexadecilpiridinio (HPC) en caldo cerebro corazón. Se incubó toda la noche a 37°C. Una vez incubado, la muestra fue centrifugada a 900 x g por 30 min. El sobrenadante fue eliminado y el pellet resuspendido en 1 ml de caldo con antibióticos (100 µl/ml Acido Nalixico, 100 µl/ml Vancomicina y 50 µl/ml de Anfotericina B). La muestra se agitó para resuspender el pellet en una solución y se incubó toda la noche a 37° C.

Por último se sembró 0,2 µl de la muestra en 1 tubo de HEY y 0,2 en cada uno de los 4 tubos conteniendo HEYM. Los tubos de cultivo se dejaron incubando 16 semanas, los mismos eran revisados semanalmente. Junto con las muestras ambientales se sembraron 5 muestras de materia fecal, las cuales se conocía el resultado (USDA, LVS), siendo 4 positivas y 1 negativa.

### **Confirmación de cepas de Map por PCR cuantitativo (qPCR)**

Las cepas aisladas en muestras ambientales se confirmaron por qPCR. Para la detección del ADN extraído de colonias aisladas de Map se utilizó un kit comercial “Mycobacterium Paratuberculosis DNA Test Kit, Polymerase Chain Reaction, VetAlert™ Johne’s Real-Time PCR, que está diseñado para la detección cualitativa in vitro de ADN de Mycobacterium paratuberculosis. La prueba se puede utilizar para detectar el ADN extraído directamente de muestras de materia fecal bovina o confirmación de muestras cultivadas en medios de cultivo liquido.

La prueba se basa en la utilización del test de PCR en tiempo Real que usa oligonucleótidos específicos y una sonda fluorogénica que genera una señal fluorescente cuando el ADN específico de *M. paratuberculosis* está presente en las muestras. La extracción de ADN fue realizada de colonias aisladas de medios de cultivo a través del sistema de extracción de Map Tetracore. Fueron incluidos en la corrida un control positivo y un control negativo aportado por el el kit.

Se utilizó el equipo de PCR en Tiempo Real “Stratagene MX305” con el siguiente programa: activación enzimática: 10 minutos a 95 ° C, PCR: en dos pasos (95 ° C x 15 segundos, 62 ° C x 60 segundos) durante 50 ciclos.

Prueba produce una señal fluorescente característica cuando el resultado es positivo. Una muestra positiva se visualiza como una curva sigmoïdal en una gráfica lineal de dos dimensiones donde el eje “x” representa el número de ciclos de PCR y el eje “y” representa la fluorescencia relativa de la señal. El ciclo de umbral o el valor Ct, es el número de ciclo en el cual el aumento de la señal fluorescente asociada con el crecimiento exponencial del producto de PCR se detectó por primera vez. Ct representa el punto en que la señal sobrepase el umbral de detección, cuanto menor sea el valor de Ct, mayor es el ADN originalmente presente en la muestra al inicio de la reacción de PCR.

La corrida se considero válida si la curva de amplificación del control positivo se encuentra entre el ciclo 20 y 26 y si el control negativo no pasa del umbral antes del punto final del test. Las muestras fueron consideradas positivas si los valores eran menores a 42 Ct. Así mismo se colocaron cepas tipificadas previamente por USDA, Laboratory Veterinary Service, de las cuales se usaron 4 controles positivos. También se utilizo una cepa Gram positiva de *Staphylococcus aureus* como control negativo que contuviera ADN microbiano diferente al buscado.

## Análisis de datos

Considerando las limitaciones de tamaño muestral se planeó la utilización de la estadística descriptiva para explicitar la distribución de las muestras ambientales y los porcentajes de positividad de los establecimientos.

## Resultados

En el cuadro III se puede observar que el total de tubos sembrados fue de 715. Se obtuvieron 11 tubos con aislamiento de *Mycobacterium avium subsp paratuberculosis*. Se aisló Map en 3 de los controles, existiendo contaminación en 1 de los mismos (cuadro III). Se aisló Map en 4 de los tubos HEYM de uno de los controles positivos, 2 tubos positivos en el segundo y un tubo positivo en el tercer control. El cuarto control, como ya se mencionó, se contaminó antes de las 2 semanas de incubación no pudiendo sacar conclusiones del mismo. En el control negativo no se obtuvo crecimiento alguno.

Cuadro III. Resultado del total de tubos sembrados clasificados como positivos, negativos y contaminados.

N ° tubos Cultivo Herrold con y sin micobactina	HEYM	Porcentaje	HEY	Porcentajes
Con aislamiento de Map	11	1,9 (11/572)	0	0,0 (0/143)
Con aislamiento de Mycobacterias no Map	12	2,1 (12/572)	7	4,8 (7/143)
Negativos	459	80,2 (459/572)	102	69,8 (102/143)
Controles positivos con aislamiento de Map	7	1,2 (7/572)	0	0,0 (0/143)
Controles positivos sin aislamiento de Map	5	0,8 (5/572)	0	0,0 (0/143)
Controles positivos contaminados	4	0,7 (4/572)	1	0,7 (1/143)
Controles negativos, sin crecimiento	4	0,7 (4/572)	0	0,0 (0/143)
Contaminados	70	12,2 (70/572)	34	23,0 (33/143)
<b>Total tubos Analizados (n=715)</b>	<b>143</b>		<b>572</b>	<b>715</b>

*HEYM: Herrold con micobactina; HEY: Herrold son micobactina*

Los aislamientos fueron confirmados por ser micobactina dependiente, ácidos alcoholes resistentes y positivos a qPCR.

Hubo 19 aislamientos en los cuales crecieron microorganismos del grupo de las Mycobacterias, las mismas fueron descartadas como sospechosas de ser Map por: la morfología de la colonia (amarillas), crecimiento en los tubos HEY demostrando ser Mycobacterias micobactina no dependientes y por ser de crecimiento rápido, menor a 2 semanas.

Dos de los 9 (22.2 %) establecimientos fueron positivos por cultivo ambiental.

En el cuadro IV se puede observar que de los 8 tipos de áreas ambientales muestreadas se obtuvo cultivos positivos en 3 de ellas.

En el 22,2 % (2/9) de los establecimientos se obtuvieron cultivos positivos en los efluentes del tambo. En el 12,5% (1/8) y 11,1 % (1/9) de los establecimientos se obtuvieron en el corral previo al ordeño y potrero de parición respectivamente (Cuadro IV).

El 3.6 % de las muestras resultaron positivas (Cuadro IV).

Cuadro IV. Distribución de muestras ambientales positivas por área

Tipos Áreas Muestreadas	Nº Muestras	Nº Establecimientos muestreados/ área	% de Áreas Positivas	% Establecimientos Positivos
Corral previo ordeño	18	8	5,6 (1/18)	12,5 (1/8)
Estercolero Tambo	28	9	10,7 (3/28)	22,2 (2/9)
Cría terneros	18	9	0	0
Parición	20	9	5,0 (1/20)	11,1 (1/9)
Recría (I y II)	42	9	0	0
Caminos al tambo	6	3	0	0
Corral estabulación	2	1	0	0
Corral Enfermos	4	2	0	0
Total	138		3.6	

En los tubos con aislamiento de Map se contaron el número de colonias por tubo (NCT).

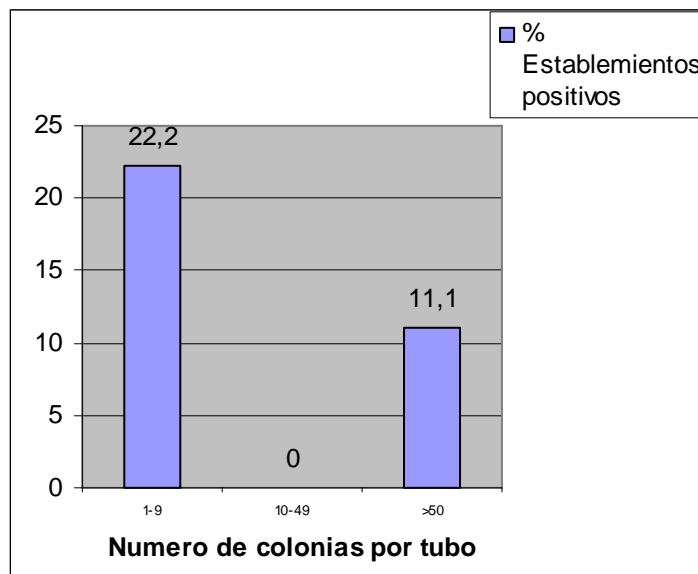
El 22,2 % de los establecimientos presentaron tubos con bajo recuento de colonias. Solamente 1 establecimiento presentó una muestra con un alto recuento (>50), no existió la categoría moderada (10-49)

Cuadro V. Prevalencia ambiental comparada con la seroprevalencia y prevalencia por cultivo individual

En el Cuadro V se expone la seroprevalencia intrarebaño y la prevalencia por cultivo individual de cada uno de los establecimientos asociado al cultivo.

ID	ELISA	Cultivo fecal individual	Cultivo Ambiental			Muestras positivas/establ.
	Seroprevalencia %	Prevalencia %	Estercolero	Potrero Parición	Sala Preordeñe	
B	4,00	2,12 (1/47)	0	0	0	0
E	2,30	0	0	0	0	0
I	0,00	2,22 (1/45)	0	0	0	0
M	6,70	4,44 (2/45)	2	0	0	2
NE	6,50	4,34 (2/46)	1	1	1	3
O	4,40	0/45	0	0	0	0
R	1,10	0/46	0	0	0	0
S	0,00	0/45	0	0	0	0
U	4,90	0/45	0	0	0	0

Gráfica 2. Porcentaje de establecimientos positivos respecto al recuento de colonias de Map.



Como se observa en el Cuadro V los establecimientos con cultivo ambiental positivo coincidieron con los establecimientos con seroprevalencias mayores a un 6 %. En ambos casos se aisló en los efluentes de tambo. La técnica de ELISA clasificó como positivos 7 de los 9 establecimientos muestreados. El cultivo ambiental clasificó como positivo únicamente a 2 de los mismos. Los establecimientos donde se detectó Map ambientalmente presentaban una prevalencia de cultivo fecal individual de mayor a 4% (Cuadro V).

Todas las colonias de Map aisladas fueron confirmadas por biología molecular (kit PCR Q).

## **Discusión**

En la cuenca sur del Uruguay la seroprevalencia de Map se estima en 3.85 % (Núñez, 2006), esto podría estar indicando la baja detección ambiental de los establecimientos infectados.

Bergahaus y col (2006) estudiaron un protocolo de muestreo ambiental en 23 establecimientos lecheros encontrando que la proporción estimada de establecimientos infectados no difirió significativamente entre los métodos aplicados (toma de muestras ambientales, 74%; cultivo fecal, 70%, y ELISA, 65%). Berghaus y col (2006) utilizaron establecimientos con seroprevalencias mayores a un 3 %, debido a la menor especificidad del ELISA con respecto al cultivo.

Pillars y col (2009), realizaron un estudio longitudinal de la distribución de Map en 7 establecimientos lecheros durante 4 años. De 731 muestras 81 fueron positivas a cultivo. Las áreas mas contaminadas con Map fueron los efluentes de tambo y el corral de ordeño. La autora encontró que las muestras ambientales positivas disminuyen a medida que la prevalencia (estimada a partir de cultivo fecal individual) del rebaño decrece. No pudiendo el muestreo ambiental clasificar como infectados rebaños con prevalencias menores al 2 %. Cuando las prevalencias se encuentran entre el 2 y el 5 % solamente se asilaron Map ambiental en los efluentes del tambo y en corrales de ordeño. A partir del 5 % de prevalencia se comienza a detectar ambientalmente el Map en otras áreas.

El 14, 5 % de los tubos de medio de cultivo HEY y HEYM en total se contaminaron. La contaminación de la muestra esta influenciada por el tipo de dieta y locación geográfica de los animales. Así mismo, tienden a coincidir la contaminación en grupos de muestras que pertenecen al mismo establecimiento (Whitlock *et al.*, 1989; Whittington y col 2009). Esta proporción de contaminación coincide con la reportada por otros autores (Kim y col, 1989; Secott y col, 1999; Nielsen y col 2004; Withlock y col 1989). Por otro lado R. Wittington, 2010 discute la falta de consistencia en la literatura con el uso de la palabra “contaminación” ya que dicha definición puede variar según el autor y hace dificultoso la comparación.

En nuestro ensayo en 2 establecimientos se aísló Map de efluentes de tambo, este resultado coincide con los de otros autores los cuales aislaron en mayor proporción Map en esta misma área (Riezman y col, 2005 y Pillars y col, 2009). Esto se debe a la cantidad de materia fecal depositada generando un gran pool de materia fecal.

Existe la posibilidad de que en el resto de los establecimientos estudiados con seroprevalencia menores al 6 % los animales excretores sean bajos eliminadores, siendo difícil captar por este método los establecimientos como ambientalmente infectados.

En uno de los establecimientos en el cuales se encontró una muestra ambiental con alto recuento (>50) coincidió con una mayor distribución ambientalmente de Map (3 áreas)

Este resultado concuerda con los resultados aportados por Riezman y col, 2005 donde encuentran una asociación entre los altos recuentos de colonias por tubos en los cultivos de pools de animales y los hallazgos ambientales del Map en dichos establecimientos.

En conclusión las zonas donde se aisló Map ambiental en mayor proporción fueron en el estercolero del tambo seguido por la sala previa al ordeño. Se aisló Map ambiental de los establecimientos que presentaron una mayor seroprevalencia (> 6%)

El muestreo ambiental resulta útil en los programas de control para determinar la infección a nivel de rebaño, requiriendo menor mano de obra y menor tiempo en el manejo de animales con respecto al cultivo individual y ELISA.

Esta investigación es el primer registro de aislamiento ambiental como estrategia de detección de establecimientos infectados por Map en rebaños lecheros en Uruguay y si bien no puede generar aproximaciones estadísticas, el análisis descriptivo coincide con los resultados reportados por otros autores.

La importancia del mismo radica en la generación de un protocolo piloto de muestreo para establecimientos lecheros de la cuenca sur del Uruguay.

### **Bibliografía**

1. Beard PM, Daniels MJ, Henderson D. (2001). Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland. *J Clin Microbiol*, 39:1517-1521.
2. Berghaus RD, Farver TB, Anderson RJ, Jaravata CC, Gardner IA. (2006). Environmental sampling for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* on large California dairies. *J Dairy Sci*;89: 963–970.
3. Corn JL, Manning EJB, Sreevatsan S, Fischer JR. (2005). Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from free-ranging birds and mammals on livestock premises. *Appl Environ Microbiol*, 71:6963–6967.
4. Eisenberg S.W.F., Nielen M., Santema W., Houwers D.J., Heederik D., Koets A.P. (2010). Detection of spatial and temporal spread of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment of a cattle farm through bio-aerosols. *Veterinary Microbiology* 143 284–292.
5. Fischer OA, Matlova L, Dvorska L. (2005). Potential risk of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* spread by syrphid flies in infected cattle farms. *Med Vet Entomol*;4:360–366.
6. Green, C.F., Gibbs, S.G., Tarwater, P.M., Mota, L.C., Scarpino, P.V. (2006). Bacterial plume emanating from the air surrounding swine confinement operations. *J. Occup. Environ. Hyg.* 3, 9–15.
7. Harris NB, Barletta RG. (2001). *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in veterinary medicine. *Clin Microbiol Rev*; 14:489–512.
8. Jørgensen, J. B. (1977). Survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in slurry. *Nord. Vet. Med.* 29:267–270.

9. Kim, Y.G., Bech-Nielsen, S., Slemons, R.D. and Spangler, E. (1989). Comparison of two methods for isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples. *American Journal of Veterinary Research* 50, 1110–1113
10. Larsen, A. B., R. S. Merkal, and R. C. Cultip. (1975). Age of cattle related to resistance to infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.* 36:255–257.
11. Larsen, A. B., S. Richard, B. S. Merkal, and T. H. Vardman. (1956). Survival time of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am. J. Vet. Res* 17:549–551.
12. Lombard, J.E., Wagner, B.A., Smith, R.L., McCluskey, B.J., Harris, B.N., Payeur, J.B., Garry, F.B., Salman, M.D. (2006). Evaluation of environmental sampling and culture to determine *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* distribution and herd infection status on US dairy operations. *J. Dairy Sci.* 89, 4163–4171.
13. Lovel, R., M. Levi, and J. Francis. (1944). Studies on the survival of Johne's bacilli. *J. Comp. Pathol.* 54:120–129.
14. Nielsen, S.S., Kolmos, B. and Christoffersen, A.B. (2004). Comparison of contamination and growth of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* on two different media. *Journal of Applied Microbiology* 96, 149–153.
15. Pavlik, I., A. W. Yayo, O. Fischer, L. Maltova, P. Svastova, M. Bartos, M. Machackova, M. Alex, and J. Lamka. (2002). Role of the external environment, plants and non-vertebrate for the spread of *Mycobacterium avium subsp paratuberculosis*. Page 514 in Proc. 7<sup>th</sup> Int. Colloquium on Paratuberculosis, Bilbao, Spain. Int. Assoc. of Paratuberculosis, Inc. Madison, WI.
16. Pillars R B, Daniel, Grooms L., Kaneene JB. (2009). Longitudinal study of the distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment of dairy herds in the Michigan Johne's disease control demonstration herd Project., *Can Vet J*;50:1039–1046
17. Predicala, B.Z., Urban, J.E., Maghirang, R.G., Jerez, S.B., Goodband, R.D. (2002). Assessment of bioaerosols in swine barns by filtration and impaction. *Curr. Microbiol.* 44, 136–140.
18. Raizman E. A., Wells S. J., Godden S. M, Bey R. F., Oakes M. J., Bentley D. C., and Olsen K. E. (2005). The Distribution of *Mycobacterium avium* ssp. *Paratuberculosis* in the Environment Surrounding Minnesota Dairy Farms. *J. Dairy Sci.* 87:2959–2966.
19. Secott T.E., Ohme A.M., Barton K.S., Wu C.C., Rommel F.A. (1999) *Mycobacterium paratuberculosis* detection in bovine feces is improved by coupling agar culture enrichment to an IS900-specific polymerase chain reaction assay. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 11, 441–447.
20. Sweeney, R. W. (1996). Transmission of paratuberculosis. *Vet. Clin. North Am.* 12:305–312.



21. Tiwari A, VanLeeuwen JA, McKenna SLB, Keefe GP, Barkema HW. (2006). Johne's disease in Canada Part I: Clinical symptoms, pathophysiology, diagnosis, and prevalence in dairy herds. *Can Vet J*;47: 874–882.
22. Whitlock, R. H., Rosenberger A. E., Siebert M., Sweeney R. (1992). Environment contamination of dairy farms with cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Proc. XVII World Buiatrics Congr.*, S Paul, MN 1:84.
23. Whitlock, R.H., Rosenberger, A.E. and Spencer, P.A. (1989). Laboratory culture techniques for Johne's disease: a critical evaluation of contamination and incubation times. In: *Proceedings of the 93rd Annual Meeting of the United States Animal Health Association*. United States Animal Health Association, Richmond, Virginia. pp. 382–386.
24. Whittington RJ, Marshall DJ, Nicholls PJ, Marsh IB, Reddacliff LA. (2004). Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in the environment. *Appl Environ Microbiol*;70: 2989–3004.
25. Whittington, R. (2009). Factors affecting isolation and identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from faecal and tissue samples in a liquid culture medium. *Journal of Clinical Microbiology* 47, 614–622.
26. Whittington, R. (2010). *Paratuberculosis : organism, disease, control*. Edited by Marcel A. Behr and Desmond M. Collins. Chapter 22, Cultivation of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*
27. Wilson, S.C., Morrow-Tesch J., Straus D.C., Cooley J.D., Wong W.C., Mitlohner F.M., McGlone J.J. (2002). Airborne microbial flora in a cattle feedlot. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3238–3242.

**Capítulo 4**

---

*Sensibilidad de protocolos de pools de materia fecal para la detección de Map a nivel de rebaños en establecimientos lecheros de una localidad de la cuenca sur de Uruguay*

## **Sensibilidad de protocolos de pools de materia fecal para la detección de Map a nivel de rebaño en establecimientos lecheros de una localidad de la cuenca sur de Uruguay**

### **Introducción**

La paratuberculosis es una enfermedad intestinal crónica y progresiva de los rumiantes y animales salvajes causado por una bacteria *Mycobacterium avium subsp paratuberculosis* (Map). Esta enfermedad se caracteriza por producir enteritis crónica, disminución de la producción láctea, diarrea intermitente y pérdida de peso progresiva que termina con la muerte del animal.

Las pruebas de diagnóstico para detectar *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* siguen siendo uno de los pilares principales en muchas investigaciones y de ellas depende, en parte, el éxito de los programas de control implantados. Esta enfermedad, causa grandes pérdidas económicas en rebaños lecheros debido a una menor producción de leche, así como la eliminación prematura de animales con pérdida de material genético (Hutchinson et al., 1996, Van Schaik et al., 1996). La enfermedad es considerada más que un problema individual, un problema de rebaño (Kalis et al., 2000).

La paratuberculosis es una enfermedad de creciente prevalencia en especies ganaderas y está ampliamente distribuida por todo el mundo (Chiodini et al., 1984, Kennedy et al., 2001). Un informe realizado por los servicios de salud animal de EEUU (U.S. Department of Agriculture (USDA), Animal and Plant Health Inspection Service, Veterinary Services, Johne's disease on U.S. dairies, 1991–2007) reportó que la enfermedad está presente en más del 68% de los establecimientos de ese país.

En Uruguay, los últimos estudios realizados en el año 2003 reportan una difusión en los establecimientos de la cuenca sur del país de  $70,2\% \pm 8,1$  con al menos un animal seropositivo y una seroprevalencia a nivel poblacional bovina de  $5,6\% \pm 1,3$  (Núñez et al., 2006).

Si bien existe extensa bibliografía de estudios de prevalencia, la verdadera prevalencia de la enfermedad seguramente está enmascarada por las dificultades que plantea su diagnóstico. Las técnicas utilizadas en la detección de animales infectados en general no son especialmente sensibles, sobre todo en las etapas subclínica de la enfermedad, a lo que hay que añadir el largo período de latencia desde la infección hasta la aparición de los síntomas, así como la variabilidad del curso de la enfermedad entre animales.

La paratuberculosis en el ganado vacuno ha sido clasificada en cuatro fases o etapas. En la fase 1, los animales infectados no presentan signos clínicos y Map no se puede detectar ni en las heces, ni mediante pruebas serológicas. En la fase 2, los animales no muestran signos clínicos, la excreción fecal de Map pueden ser intermitente y su detección por cultivo es imperfecto, sobre todo cuando los animales son débiles eliminadores. (Merkal et al., 1968). El ganado puede permanecer en la etapa 1 o 2 sin desarrollar signos clínicos o la enfermedad puede progresar a enfermedad clínica después de 2 años o más de infección. En la fase 3 se observan signos clínicos: pérdida de peso y diarrea. Los animales presentan mayor concentración de Map en las heces y se detectan anticuerpos anti-Map por medio de las pruebas serológicas. En la fase 4 avanza la enfermedad clínica: letargo, emaciación y diarrea profusa (Sweeney, 1995).

El diagnóstico de la enfermedad en animales infectados asintomáticos es extremadamente difícil, ya que no existe ningún método diagnóstico capaz de detectar a todos los animales infectados de un rebaño (Collins et al., 2004). La mayoría de las pruebas diagnósticas actualmente disponibles se basan en la detección de la respuesta inmune humoral, y en la detección de *Map* en las heces a través del cultivo fecal o mediante la prueba de PCR; sin embargo, estas pruebas no son capaces de detectar infección en animales en estadios iniciales de la enfermedad (Whitlock et al., 2000).

El cultivo fecal, a pesar de tener una sensibilidad de baja a moderada según diferentes trabajos (15-85% dependiendo de la fase de la enfermedad), es el método más ampliamente usado para la detección del agente y algunos investigadores lo han considerado como la “prueba de oro” ante mortem, con una especificidad del 100% (Egan et al., 1999; Sockett et al., 1992; Withlock et al., 2000; McKenna et al., 2005). Sin embargo, no es capaz de detectar animales que excretan *Map* en la materia fecal en cantidades inferiores a 100 ufc/g de heces (Collins, 1996, Stabel et al., 1998, Kalis et al., 2001). El cultivo fecal presenta las desventajas de ser laborioso, de alto costo y extremadamente lento para obtener un resultado, ya que se requieren de 8 a 16 semanas de incubación para detectar la presencia de colonias visibles (Sweeney et al., 1995, Collins, 1996, Kalis et al., 1999, Soto et al., 2002).

La detección de anticuerpos en el suero de animales infectados mediante la prueba de ELISA es actualmente el método de diagnóstico más ampliamente usado para el monitoreo de rebaños infectados. Esta prueba contrariamente al cultivo fecal es fácil de realizar, rápida y de bajo costo. Sin embargo, a pesar de tener una moderada a buena especificidad (90-99%) su sensibilidad promedio es baja (45%), pudiendo alcanzar hasta 85% en animales con signos clínicos, pero no supera el 15% en animales con infección subclínica debido a que la respuesta inmune humoral se desarrolla tardíamente en los animales infectados (Lombard et al., 2006; McKenna et al., 2005; Jubb et al., 2004; Cocito et al., 1994, Collins 1996, Whitlock y Buergelt 1996, Stabel 1998). En consecuencia, la principal desventaja de las pruebas serológicas es que no permiten detectar infección en animales jóvenes cuando aún no desarrollan signos clínicos a pesar de excretar la bacteria por las heces (Sockett et al., 1992, Sweeney et al., 1995). Una alternativa son las pruebas de inmunidad celular como la prueba de Interferon Gamma, dicha prueba ha sido evaluada en 2 ensayos en bovinos (Paolicchi et al., 2003; Huda et al., 2004), donde la sensibilidad de la prueba vario entre 13 % y 85 % y la especificidad entre 88 y 94 % . Si bien es cierto que este tipo de inmunidad es la primera en infecciones por mycobacterias se recomienda aplicar en animales mayores de 15 meses debido a los falsos positivos presentes en edades tempranas debido a la producción de Interferón gamma por las células Natural Killer (Jungersen et al., 2002).

Una ventaja de las prueba de cultivo de PMF, respecto al cultivo individual es el incremento en el número de animales testados, disminuyendo de esta forma los costos de las pruebas de laboratorio. Además la sensibilidad del PMF es similar al método de cultivo individual (Kalis et al., 2000; Wells et al., 2002). Los mismos autores han reportado una disminución en la detección de pools positivos en los casos en que los mismos estén compuestos por un solo animal con una baja concentración de *Map* en la muestra (Kalis et al., 2000; Wells et al., 2002).

Al aumentar el número de animales testados en PMF aumenta la sensibilidad del rebaño (Christensen J y Gardner IA, 2000). Sin embargo, para los cultivo de materia fecal, el efecto sobre especificidad del rebaño será limitado debido a de la especificidad es de casi el

100%. Lo que si se podría ver afectada es la proporción de pools positivos por un efecto dilución. Esta disminución en la sensibilidad fue demostrada por varios estudios en ganado vacuno, ovinos y ciervos (Stehman et al., 1996). En una prueba a nivel de rebaño en pools de 5 animales agrupados por edad, la sensibilidad de rebaño fue equivalente a la sensibilidad de cultivos individuales y fue significativamente menor los costos involucrados (Kalis et al., 2000; Well et al., 2003)

Varios investigadores han publicado resultados sobre los pools de materia fecal. En uno de los estudios, pools de 5 muestras fecales fueron más sensibles para detectar vacas infectadas que los pools de diez muestras (Wells et al., 2002). La sensibilidad del cultivo de pools depende fuertemente del tamaño del pool y del nivel de excreción de Map de los animales positivos. En algunos casos el cultivo de muestras de pool fue positivo mientras que las muestras individuales eran negativas (Kalis et al., 2000; Raizman et al., 2004, Pradenas et al., 2008). Evaluación de los pools de muestras de heces (1:5) en rebaños lecheros infectados detectaron al menos el 88% de las muestras que contenían al menos un animal con moderada (> 10 UFC / tubo) y altos niveles de excreción en las heces (Wells et al., 2003). Los estudios posteriores con pools de diez muestras fecales en rebaños de baja prevalencia resultaron rentables para la detección a nivel de rebaño y pueden proporcionar una estimación en rebaños lecheros de tamaño grande infectados por Map. El número óptimo de muestras por grupo puede variar de 3 para un rebaños de 500 vacas con baja prevalencia a 5 en rebaños de 1.000 vacas de alta prevalencia (van Schaik et al., 2003).

El objetivo de este trabajo es definir un protocolo de pools para detectar establecimientos infectados y estudiar la sensibilidad a nivel de rebaño de dicho método para las condiciones de la cuenca sur del Uruguay (poblaciones bovinas con baja prevalencia de Map).

## **Materiales y Métodos**

### *Selección de los establecimientos y toma de muestras*

Se seleccionaron un total de 9 establecimientos lecheros, 8 del departamento de Colonia y 1 de San José. Los criterios de inclusión fueron: población bovina de al menos 30 vacas en ordeño, con historia clínica (diarrea crónica) y/o serológica de Map en el establecimiento. Los datos poblacionales fueron extraídos de la base de datos de DICOSE-MGAP, 2008 (División Contralor de Semovientes, Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, Uruguay). Los antecedentes de seropositividad fueron extraídos del proyecto desarrollado por el Dr. Álvaro Núñez denominado “Paratuberculosis bovina en Ganado Lechero en la Cuenca Sur del país” INIA-FPTA, Facultad de Veterinaria (2006). Se seleccionaron los establecimientos que tuvieron más de 3 animales seropositivos en un total de 20 vacas muestreadas (datos del año 2006). La población seleccionada era de baja prevalencia por serología.

En cada establecimiento se seleccionaron 45 animales de más de 2 años de edad en lactación. A cada animal se le extrajo en forma manual del recto una muestra de materia fecal. Las muestras fueron extraídas con bolsas de nylon, las cuales fueron identificadas con la caravana del animal.

Las muestras fueron acondicionadas en heladeras con refrigerantes hasta la llegada al laboratorio. Posteriormente se guardaron en freezer a -20 ° C hasta su procesamiento. Las muestras fueron procesadas en el la Dirección de Laboratorios Veterinarios, del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (DiLaVe – MGAP).

#### *Medios de Cultivo*

Previa validación, se utilizó medio de cultivo Herrold hecho “*in house*” con y sin micobactina. La validación del medio de cultivo Herrolds, se realizó según el método R. Whitlock, University of Pennsylvania (2001).

Se procesaron las muestras individuales por el método de centrifugación (descrito en el Capítulo 2).

Se realizaron 16 lotes de medio de cultivo Herrold, 13 lotes fueron con mycobactina y 3 sin mycobactina. Por cada lote de 1 L. se recuperó en promedio 150 tubos conteniendo 6 ml de medio de cultivo y por cada lote de 2 L se recupero un promedio de 300 tubos. El protocolo del medio de cultivo se presenta en el Anexo I. A cada lote se le efectuó un control de calidad de esterilidad y control de crecimiento.

#### *Control de calidad de esterilidad*

Seis tubos de cultivo de cada lote de medio sin inocular se incubaron aeróbicamente por un mínimo de 3 semanas a 37 ° C. Dos tubos fueron seleccionados del comienzo, 2 de la mitad y 2 del final del medio de cultivo.

Cada tubo fue etiquetado con la fecha de efectuado el lote y un número de lote otorgado en forma secuencial.

Semanalmente se registro, cambios de color del medio, así como visualización de contaminación.

#### *Control de calidad de crecimiento de Map*

Se seleccionaron materias fecales Map positivas las cuales fueron donadas por Colorado State University, Laboratory Veterinary Service de las cuales se conocía previamente el estatus de las mismas. Se seleccionaron muestras de materia fecal las cuales fueras de recuento alto > a 50 ufc por tubo y de recuento bajo entre 1 – 10 ufc por tubo.

Se tomaron 6 tubos de cada lote de medio de cultivo Herrold con mycobactina.

Las muestra de materia fecal positivas fueron procesadas por el método de centrifugación.

Se inocularon por cada muestra de materia fecal 3 tubos con mycobactina de cada lote hecho “*in house*” y un tubo de medio de cultivo Herrold con mycobactina comercial *Becton Dickinson*. Así mismo cada grupo de 4 tubos fue acompañado por su correspondiente tubo de medio de cultivo sin mycobactina de los lotes hechos “*in house*”

#### *Procesamiento de muestras individuales*

Dos gramos de materia fecal de cada muestra individual fue procesada por el método de centrifugación. El inculo fue sembrado en 1 tubo de medio de cultivo Herrold sin

mycobactina y 3 tubos de medio de cultivo Herrold sin mycobactina los mismo fueron incubados a 37 ° C por 16 semanas, fueron evaluados semanalmente.

#### *Pools de materia fecal*

El método usado para la mezcla de pools de materia fecal fue previamente validado por Wells et al., 2002.

Dos gramos de materia fecal individual de 3 animales fueron mezclados en un tubo cónico de 50 ml con una espátula estéril, una vez homogenizados, 2 grs. del pool fueron procesados por la técnica de centrifugación, siendo por último el inóculo sembrado en 1 tubo de Herrold sin mycobactina y 3 tubos de Herrold con mycobactina.

Los Pools de 6 fueron realizados a partir de la mezcla de 2 pools de 3 y los de 9 a partir de la mezcla de 3 pools de 3 muestras individuales.

Una vez procesados todos los pools los mismos fueron incubados a 37 ° C por 16 semanas, los mismos fueron evaluados semanalmente.

El crecimiento bacteriano fue cuantificado por el método de conteo directo de colonias. El resultado final fue informado como negativo (ausencia de colonias de Map), mínimo (entre 1 y 10 colonias por tubo), moderado (entre 10> y < 50 colonias por tubo), alto (mas de >50 colonias por tubo).

#### *Confirmación de colonias de Map*

Todas las colonias sospechosas se les realizo tinción de Ziehl Neelsen y prueba de PCR en tiempo real (ver protocolo capítulo 2)

#### *Análisis de las muestras*

La sensibilidad del método de pools de materia fecal (PSE) se definió como la probabilidad de detectar un pool positivo tal que los pools contuvieran al menos una muestra individual positiva a Map.

La sensibilidad del rebaño se definió como la probabilidad de que los pools positivos detecten rebaños infectados por Map. Por los criterios de inclusión de los rebaños se asume que todos ellos tienen presencia del agente (Map) con una baja prevalencia.

Se analizo la sensibilidad del método de pools así como la sensibilidad a nivel de rebaño (HSe).

## **Resultados**

#### *Validación del medio de cultivo “In House”*

Solamente un lote del medio de cultivo hecho “in house” fue descartado por coagulación de la yema de huevo. El resto de los lotes fueron validados tanto para los controles de calidad de contaminación como de crecimiento.

*Cultivo individual de materia fecal*

Se sembraron un total de 408 muestras fecales individuales muestreadas a partir de 9 establecimientos lecheros. Se aisló Map de 6 muestras de materia fecal (1,47%) distribuidas en 4 establecimientos lecheros de un total de 9 (Cuadro I).

Cuadro I. Número de cultivos individuales y positivos por cultivo fecal distribuidos en los nueve establecimientos lecheros.

<b>ID</b>	<b>Muestras fecales individuales</b>	<b>Prevalencia %</b>
B	47	2,12 (1/47)
E	45	0,00 (0/45)
I	45	2,22 (1/45)
M	45	4,44 (2/45)
NE	46	4,34 (2/46)
O	45	0,00 (0/45)
R	45	0,00 (0/45)
S	45	0,00 (0/45)
U	45	0,00 (0/45)
<b>Total</b>	<b>408</b>	<b>1,47 (6/408)</b>

*ID = Código de identificación de cada establecimiento muestreado*

*Cultivo de pools de materia fecal.*

De los 9 establecimientos muestreados se realizaron 138 pools constituidos por 3 muestras individuales cada uno. Dos de estos pools 1,14 % (2/138) resultaron positivos, clasificando como infectado 1 de los 9 establecimientos. Los 2 pools positivos no presentaron muestras individuales positivas al cultivo fecal.

En los pools constituidos por 6 muestras individuales se obtuvieron 2,80 % (2/71) de los pools como positivos. Los 2 pools positivos estaban constituidos uno por 1 muestra individual positiva con bajo recuento bacteriano (<1-10 ufc por tubo) y el segundo con un alto recuento (> 50 ufc por tubo). Los pools de 6 detectaron 2 de los 9 (22,2%) establecimientos positivos.

Los pools constituidos por 9 muestras individuales clasificaron como positivos el 6,40 % (3/47), de los pools, 2 pertenecían al mismo establecimiento y ambos estaban constituidos por 1 muestra individual cada uno. El pool de 9 detectó un establecimiento como positivo, el cual no había sido detectado por los pools de 3 ni de 6 respectivamente ni por las muestras individuales. Para los cálculos a nivel de animales, se consideró que el mismo contenía al menos una muestra individual positiva. (Cuadro II)

El establecimiento identificado como “M” presentó 2 animales individuales positivos al cultivo, los dos fueron colocados por azar en el mismo pool de 3, dicho pool no fue detectado en los cultivos de pools de 3 ni en los de 9 respectivamente siendo detectado en los pools de 6.

Los 2 pools de 3 detectados pertenecieron al establecimiento identificado como “NE”, de ambos pools no se obtuvieron animales individuales positivos al cultivo.



Todos los pools (pool de 3 y de 9) que dieron positivos, aunque fueran negativos en los cultivos individuales, fueron considerados verdaderos positivos en función de que la especificidad del cultivo es 100%. Por lo tanto se asumió que al menos 1 animal tanto del pool de 3 como del 9 era positivo al cultivo individual (Cuadro II). Este supuesto incremento el cálculo de la prevalencia de la muestra a nivel individual de 1,47% (6/408) a 2,21% (9/408) (Cuadros I y II).

Estos supuestos fueron tenidos en cuenta para los cálculos de la sensibilidad de pools y sensibilidad de rebaño (HSe).

De las 6 muestras individuales con crecimiento bacteriano 5 fueron de bajo crecimiento (< 1-10 ufc /tubo) y 1 de alto crecimiento (> 50 ufc/tubo). De los 3 tipos de pools solo el pool de 6 detecto como positivo el pool que contenía la muestra individual con un alto recuento de microorganismos.

En las 5 muestras con menor número de recuento se obtuvo 1 tubo positivo de los 3 tubos HEYM sembrados por muestra.

Cuadro II. Distribución de los pools y de las muestras individuales por establecimiento.

Cultivo individual			Pools de 3				Pools de 6				Pools de 9			
ID a	Muestras individuales	Prev % b	N° Pools	Pools Positivos %	N° positivas individuales	N° positivas individuales no detectadas	N° pool	Pools Positivos %	N° positivas individuales	N° positivas individuales no detectadas	N° pools	Pools Positivos %	N° positivas individuales	N° positivas individuales no detectadas
B	47	2,12 (1/47)	17	0/17	0	1	7	0/7	0	1	6	0/6	0	1
E	45	2,22 (1/45)	15	0/15	0	1	8	0/8	0	1	5	20 (1/5)	1	0
I	45	2,22 (1/45)	15	0/15	0	1	8	0/8	0	1	5	0/5	0	1
M	45	4,44 (2/45)	15	0/15	0	2	8	12,5 (1/8)	2	0	5	0/5	0	2
NE	46	8,69 (4/46)	16	12,5 (2/16)	2	2	8	12,5 (1/8)	1	3	6	33,3 (2/6)	2	2
O	45	0/45	15	0/15	0	0	8	0/8	0	0	5	0/5	0	0
R	45	0/45	15	0/15	0	0	8	0/8	0	0	5	0/5	0	0
S	45	0/45	15	0/15	0	0	8	0/8	0	0	5	0/5	0	0
U	45	0/45	15	0/15	0	0	8	0/8	0	0	5	0/5	0	0
Total	408	2,21 (9/408)	138	1,44 (2/138)	2	7	71	2,81 (2/71)	3	6	47	6,38 (3/47)	3	6

a. Identificación de los establecimientos

b. prevalencia estimada a partir de los pools positivos, si un pool dio positivo y ninguna muestra individual fue positiva en forma retrospectiva se asumió que al menos había 1 animal individual positivo.

### *Sensibilidad de Pool y Sensibilidad del rebaño (HSe)*

De las 408 muestras individuales 6 tuvieron crecimiento bacteriano y 3 se consideraron como positivas a partir del crecimiento en los pools (2 de pools de 3 y 1 de pool de 9), siendo la proporción estimada de animales positivos de 2,2 % (9/408). Las 9 muestras individuales consideradas con Map se distribuyeron en 8 diferentes pools de 3 muestras, solo 1 de los pools de 3 contenía 2 muestras individuales positivas.

En los pools de 3, 6 y 9 muestras individuales, hubo 7 con una muestra positiva a Map y uno que tenía 2 muestras positivas, totalizando los 8 pools con presencia del agente. Asumiendo que el cultivo de materia fecal es 100% específico la proporción de detección positiva del cultivo de pools con muestras individuales positivas fue de 0,25 (2/8), 0,25 (2/8) y 0,38 (3/8), en pools de 3, 6 y 9 respectivamente (Cuadro III). A nivel del cultivo individual de estos pools solo en 6 se había detectado el agente 0,75 (6/8).

Considerando los nueve establecimientos positivos la sensibilidad de rebaño (HSe) fue de 0,11(1/9), 0,22 (2/9) y 0,22 (2/9), en pools de 3, 6 y 9 respectivamente. (Cuadro III). La HSe con cultivo individual fue de 0,44 (4/9) respecto a la de los 3 protocolos de pools. Pero se debe de considerar que las muestras por establecimiento fueron aproximadamente en promedio: 45, 15, 8 y 5 para las muestras individuales y los pools de 3, 6 y 9 respectivamente.

Cuadro III. Proporción de de pools detectados y Sensibilidad de rebaño (HSe) para los diferentes tamaños pools.

	Cultivo individual	Pools de 3	Pools de 6	Pools de 9
P(pool)	0,66(6/9)	25% (2/8)	25% (2/8)	38% (3/8)
HSe	44% (4/9)	11% (1/9)	22% (2/9)	22% (2/9)

### *Confirmación de colonias*

Todas las colonias sospechosas fueron ácido alcohol resistentes y presentaron un Ct < 42.

Así mismo los controles positivos dieron un Ct < 42, y los negativos fueron No Ct, confirmándose la presencia y ausencia de ADN de Map respectivamente.

Cuadro IV. Confirmación de Map por PCR en tiempo real

Establecimiento	ID Muestra	Ct a
B	B30	38,08
I	I18	40,23
M	M27	21,09
M	M35	19,33
NE	NE22	23,57
NE	NE33	22,93
Control Positivo	Fort Collins 4	21,62
Control Positivo	control del kit	20,51
Control Negativo	control del kit	neg
Control Negativo	<i>Staphylococcus aureus</i>	neg
Control Negativo	<i>M. bovis</i> (cepas de campo)	neg
Control Negativo	<i>M. avium avium</i> (secuenciadas) de Ñandú	neg

a. Ct. número de ciclo en el cual el aumento de la señal fluorescente se asocia con el crecimiento exponencial del producto de PCR.

## Discusión

Los pools lógicamente generan un efecto dilución con respecto a las muestras individuales. Es así que observamos que en un pool de 3 y en uno de 9 resultados negativos cuando ellos tenían en su conformación 2 muestras positivas individuales. Estas dos muestras positivas fueron detectadas en el pool de 6 lo que sugiere que seguramente la muestra original del pool de 3 fue parcialmente homogenizada. Esto además puede ser explicado por la dificultad que genera en la homogenización la formación de “clumps” de estos microorganismos Kalis et al., (2000) sugieren que hay un elemento del azar aparte del elemento dilución relacionado a la detección de Map en materia fecal, particularmente cuando las muestras contiene bajo número de bacterias y la distribución en la muestra no es homogénea.

Existieron 2 pools de materia fecal (uno de 3 y uno de 9) que detectaron muestras positivas que no fueron encontradas a priori en los cultivos individuales. Este fenómeno lo han evidenciados varios autores, que han realizado previamente estudios de pools de materia fecal. Well et al., (2002 y 2003) encontraron que pools fueron positivos a pesar de que las muestras individuales eran negativas. Este mismo resultado lo obtuvo Kalis et al., (2000). Asumiendo que la prueba de cultivo fecal es 100 % específica, Wells et al., (2002) interpretaron un resultado positivo a pool como verdaderamente positivos.

Wells et al., 2002 reportaron que pools de 5 muestras individuales eran sensibles para detectar animales infectados y que la reducción del costo de testear todo el rebaño era ampliamente significativa. Ese investigador probó pools de 5 y de 10 muestras individuales. La sensibilidad de los pools fue de 30 a 100% dependiendo del tamaño del pool y de la concentración de Map en las muestras individuales. Así mismo Kalis et al., (2000) encontraron que en rebaños lecheros infectados a partir de pools de 5 animales detecta al menos 87% de las muestras que contienen al menos un animal eliminador moderado (> 10 ufc /tubo y altamente eliminador > 50 ufc/tubo). Estudios posteriores

evaluaron pools de 10 en poblaciones de baja prevalencia siendo rentables para la detección de Map y proporciona una estimación de la infección del rebaño. (van Schaik et al., 2003; Tavoranpanich et al., 2004).

El tamaño óptimo del pool depende de la prevalencia, del tamaño del rebaño y los pools varían de 3 muestras por pool en rebaños de 500 animales con bajas prevalencias a 10 muestras por pool en rebaños de 1000 animales con alta prevalencia (van Schaik et al., 2003).

En nuestro ensayo debido a la baja proporción de pools positivos por establecimientos no es posible sacar conclusiones respecto a la sensibilidad de pools relacionadas a la concentración de Map en las muestras individuales como otros autores. Pero como vemos en el Cuadro III hay una tendencia a que la proporción de detección de 1 animal positivo cuando está eliminando el agente cae cuando pasamos al cultivos en pool.

El uso de pools estratégicos de acuerdo a la edad de los animales hace más eficiente su uso, ya que disminuye la probabilidad de incluir un animal infectado eliminador de bacterias en un pool donde hay animales no infectados provocando un efecto de dilución (mezcla de heces infectadas con heces no infectadas en un mismo pool), lo que trae como consecuencia una disminución de la sensibilidad del pool (Kalis et al., 2000, Praderas et al., 2008).

En nuestro ensayo en los 9 establecimientos muestreados no fue posible realizar esta clasificación por edad debido a falta de información.

Así mismo otro factor que pudo afectar la sensibilidad de los pools fue la conservación de las muestras en freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  previo a su procesamiento, lo cual baja la detección de Map. (Richards, 1981, Richards, 1977).

Otro factor a considerar es que los establecimientos en estudio son de baja seroprevalencia (3,8%) y baja prevalencia de cultivo (1,8%) es de suponer que la proporción de animales en etapa subclínica en fase 1 y fase 2 es en proporción mucho mayor que las de fase 3 y 4. Por lo tanto esto podría estar afectando la detección de animales eliminadores de materia fecal en los establecimientos.

Así mismo hay que destacar que la mayor seroprevalencia a nivel de predios, así como mayor prevalencia animal con cultivo bacteriano fue en 2 de los establecimientos que más casos clínicos presentaron en los últimos 12 meses (establecimiento M y NE) y en los cuales también se encontraron muestras ambientales positivas (capítulo 2)

Considerando la sensibilidad del cultivo individual (44%) es de esperar que en los rebaños que no se aislaron cultivos positivos estos puedan detectarse en posteriores muestreos siendo el porcentaje de los animales infectados esperado mayor al observado. Esto se ve reforzado considerando que solo 0,66 de las muestras con aislamiento fueron detectadas individualmente (Cuadro III).

A diferencia de otros estudios el cultivo individual de materia fecal clasificó como positivo mayor cantidad de establecimientos respecto a los cultivos de pools de 3, 6 y 9 respectivamente. Esto contrasta con lo encontrado por Kalis et al., (2000) donde la

diferencia en HSe de los 2 métodos no es significativa (pool 73%, cultivo individual 64%).

Una posible explicación a esta situación está en función del número de muestras procesadas por establecimiento que en nuestro estudio cayó en función del tamaño de los pools. Es así que el número de muestras cultivadas por estrategia fue en promedio por establecimiento 45, 15, 8 y 5 para muestras individuales, pools de 3, 6 y 9 respectivamente.

En la cuenca sur del Uruguay debido a las bajas prevalencias a nivel de predios es necesario rever los protocolos de muestreo de pools para siguientes investigaciones, ya que el mismo tiene la ventaja de ser un método de bajo costo el cual clasifica a los establecimientos como verdaderamente infectados dando además información de la proporción de animales infectados en los establecimientos.

### **Bibliografía**

1. Bulaga, L.L. (1998). U. S. Voluntary Johne's Disease Herd Status Program for Cattle. In: Proceedings of the 102nd Annual Meeting, United States Animal Health Association. United States Animal Health Association, Minneapolis, Minnesota, pp. 420–433.
2. Christensen J, Gardner IA. (2000). Herd-level interpretation of test results for epidemiologic studies of animal diseases. *Prev Vet Med* 45:83–106.
3. Cocito C, Gilot P, Coene M, Kesel M Pouspart, P, Vannufel P. (1994). Paratuberculosis. *Clin Microbiol Rev* 7, 328-344.
4. Collins M.T. (1996). Diagnosis of Paratuberculosis. In R.W Sweeney (ed) Paratuberculosis (Johne's Disease). In *The Veterinary Clinics of North America, Sweeney R (ed).The W.B. Saunders Company, Philadelphia .Food Animal Practice* ,12 (2):357-371.
5. Collins M.T. (1997). Mycobacterium paratuberculosis: A potential Food-Borne Pathogen. *J. Dairy Sci.* 80: 3445-3448.
6. Collins MT, Gardner IA, Garry FB. (2006). Consensus recommendations on diagnostic testing for the detection of paratuberculosis in cattle in the United States. *J Am Vet Med Assoc* 229:1912–1919.
7. Collins MT. (2004). Update on paratuberculosis: control and zoonotic potential. *Irish Vet J* 57, 49-52.
8. Egan, J., Weavers, E., O'Grady, D. (1999). An evaluation of diagnostic tests for Johne's disease in cattle. *Irish Vet. J.* 52, 86–89.
9. Ellingson JL, Bolin CA, Stabel JR. (1998). Identification of a gene unique to Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis and application to diagnosis of paratuberculosis. *Mol Cell Probes* 12:133–142.

10. [http://www.aphis.usda.gov/vs/ceah/ncahs/nahms/dairy/dairy07/Dairy07\\_is\\_Johnes.pdf](http://www.aphis.usda.gov/vs/ceah/ncahs/nahms/dairy/dairy07/Dairy07_is_Johnes.pdf).
11. Huda A., Jungersen G., Lind, P. (2004). Longitudinal study of interferon-gamma, serum antibody and milk antibody responses in cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 104, 43–53.
12. Hutchinson LL. (1996). Economic impact of paratuberculosis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 12, 373-383.
13. Jubb T.F., Sergeant, E.S., Callinan, A.P., Galvin, J. (2004). Estimate of the sensitivity of an ELISA used to detect Johne's disease in Victorian dairy cattle herds. *Aust. Vet. J.* 82, 569–573.
14. Jungersen G., Huda A., Hansen J.J. and Lind P. (2002). Interpretation of the gamma interferon test for diagnosis of subclinical paratuberculosis in cattle. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 9, 453–460.
15. Kalis C.H., Hesselink J.W., Barkema H.W. and Collins M.T. (2000). Culture of strategically pooled bovine fecal samples as a method to screen herds for paratuberculosis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 12, 547–551.
16. Kalis C.H.J., Collins M.T., Barkema H.W. and Hesselink J.W. (2004). Certification of herds as free of *Mycobacterium paratuberculosis* infection: actual pooled faecal results versus certification model predictions. *Preventive Veterinary Medicine* 65, 189–204.
17. Kalis C.H., Hesselink J.W., Barkema H.W. and Collins M.T. (2001). Use of long-term vaccination with a killed vaccine to prevent fecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in dairy herds. *American Journal of Veterinary Research* 62, 270–274.
18. Kalis C.H.J., Hesselink J.W., Russchen E.W., Barkema H.W., Collins M.T., Visser I.J.R. (1999). Factors influencing the isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* from bovine faecal samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 11, 345–351.
19. Khare S, Adams LG, Osterstock J. (2008). Effects of shipping and storage conditions of fecal samples on viability of *Mycobacterium paratuberculosis*. *J Clin Microbiol* 46:1561–1562.
20. Lombard J.E., Byrem T.M., Wagner B.A., McCluskey B.J., (2006). Comparison of milk and serum enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in dairy cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 18,448–458.
21. McKenna S.L., Keefe G.P., Barkema H.W., Sockett D.C. (2005). Evaluation of three ELISAs for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using tissue and fecal culture as comparison standards. *Vet. Microbiol.* 110, 105–111.

22. Merkal R.S., Larsen A.B., Kopecky K.E. (1968). Comparison of examination and test methods for early detection of paratuberculosis in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 29, 1533-1538.
23. Nuñez A. (2006). Paratuberculosis bovina en Ganado Lechero en la Cuenca Sur del país. Tesis de Maestría en Salud Animal. Universidad de la República, Facultad de Veterinaria.
24. Paolicchi F.A., Zumarraga M.J., Gioffre A., Zamorano P., Morsella C., Verna A., Cataldi A., Alito A., Romano M. (2003). Application of different methods for the diagnosis of paratuberculosis in a dairy cattle herd in Argentina. *J. Vet. Med. B* 50, 20–26.
25. Pradenas M, Kruz J , van Schaik G. (2008). Sensitivity of pooled faecal culture for detecting *Mycobacterium avium* subsp. Paratuberculosis infection in dairy herds and its relationship with the ELISA test. *Arch Med Vet* 40, 31-37
26. Raizman E.A., Wells S.J., Godden S.M., Bey R.F., Oakes M.J., Bentley D.C., Olsen K.E. (2004). The distribution of *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis in the environment surrounding Minnesota dairy farms. *Journal of Dairy Science* 87, 2959–2966.
27. Richards W. D., Thoen C. O. (1977). Effect of freezing on the viability of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine feces. *J. Clin. Microbiol.* 6:392–395
28. Sweeney, R.W. (1996). Transmission of paratuberculosis. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 12, 305-312.
29. Richards WB. (1981). Effects of Physical and Chemical Factors on the Viability of *Mycobacterium paratuberculosis*. *J of Clinical Microbiology*, p. 587-588
30. Sockett DC, TA Conrad, CB Thomas, MT Collins. (1992). Evaluation of four serological tests for bovine paratuberculosis. *J Clin Microbiol* 30, 1134–1139.
31. Sockett, D.C., Carr D.J., Collins M.T. (1992b). Evaluation of conventional and radiometric fecal culture and a commercial DNA probe for diagnosis of *Mycobacterium paratuberculosis* infections in cattle. *Can. J. Vet. Res.* 56, 148–153.
32. Soto JP, J Kruze, S Leiva. (2002<sup>a</sup>). Comparacion de tres metodos de diagnostico de paratuberculosis bovina en rebanos lecheros infectados. *Arch Med Vet* 34, 265-273.
33. Stabel JR. (1998). Jonhe’s disease: a hidden threat. *J Dairy Sci* 81, 283-288.
34. Stehman, S.M. (1996) Paratuberculosis in small ruminants, deer, and South American camelids. *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice* 12, 441–455.



35. Sweeney RW, Whitlock RH, Buckey CL, Spencer PA. (1995). Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle. *J Vet Diagn Invest* 7, 488-493.
36. Tavornpanich S, Gardner I A., Anderson R J, Shin S, Whitlock R, Fyock T, Adaska J M., Walker R L., Hietala SK. (2004). Evaluation of microbial culture of pooled fecal samples for detection of *Mycobacterium avium subsp paratuberculosis* in large dairy herds. *AJVR*, Vol 65, No. 8.
37. Tavornpanich S., Gardner I.A., Carpenter T.E., Johnson W.O. Anderson R.J. (2006). Evaluation of cost-effectiveness of targeted sampling methods for detection of *Mycobacterium avium subsp paratuberculosis* infection in dairy herds. *Am J Vet Res.* May;67(5):821-8
38. van Schaik G, Kalis CH, Benedictus G, Dijkhuizen AA, Huine RB. (1996). Cost benefit analysis of vaccination against paratuberculosis in dairy cattle. *Vet Rec* 139, 624-627.
39. van Schaik G., Stehman S.M., Schukken Y.H., Rossiter C.R., Shin S.J. (2003). Pooled fecal culture sampling for *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* at different herd sizes and prevalence. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 15, 233–241.
40. Wells S. J., Whitlock R. H., Wagner B. A.. (2002). Sensitivity of test strategies used in the Voluntary Johne's Disease Herd Status Program for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* infection in dairy cattle herds. *JAVMA* 220:1053–1057.
41. Wells S. J., Whitlock R. H., Lindeman C. J., Fyock T. (2002). Evaluation of bacteriologic culture of pooled fecal samples for detection of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.* 63:1207–1211.
42. Wells S. J., Godden S. M., Lindman C. J., Collins J. E. (2003). Evaluation of bacteriologic culture of individual and pooled fecal samples for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in dairy cattle herds. *JAVMA* 223:1022–1025.
43. Whitlock RH, Buergelt C. (1996). Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 12, 345-356.
44. Whitlock R.H., Wells S.J., Sweeney R.W., Van Tiem J. (2000). ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. *Vet. Microbiol.* 77, 387–398.

## **Capítulo 5**

---

**Evaluación de una prueba de ELISA indirecto como estrategias para detectar rebaños lecheros infectados con paratuberculosis bovina en una localidad de la cuenca sur del Uruguay.**

## **Evaluación de una prueba de ELISA indirecta como estrategias para detectar rebaños lecheros infectados con paratuberculosis bovina en una localidad de la cuenca sur del Uruguay.**

### **Introducción**

La paratuberculosis es una enfermedad intestinal crónica y progresiva de los rumiantes y animales salvajes causado por una bacteria *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* (Map). Esta enfermedad se caracteriza por producir una enteritis crónica, disminución de la producción láctea, diarrea intermitente y pérdida de peso progresivo que termina con la muerte del animal, pero la mayoría de los animales infectados no muestran signos clínicos.

La identificación y eliminación de animales infectados, junto con los esfuerzos de manejo en los rebaños para reducir la transmisión, son aspectos a tener en cuenta en los programas de control de la enfermedad. Numerosos programas de control recomiendan para detectar rebaños infectados el testeo de los animales con pruebas serológicas, sobre todo el test de ELISA (ensayo inmuno enzimático) en suero y/o en leche. (USDA APHIS, Uniform Program Standards for the Voluntary Bovine Johne's Disease).

La ventaja que tiene la prueba de ELISA sobre el cultivo fecal es la accesibilidad debido a la disponibilidad de numerosos laboratorios de diagnóstico que lo realizan, la obtención rápida de los resultados y el bajo costo por muestra. Sin embargo, el ELISA para Map tiene la desventaja de tener una baja sensibilidad en los animales que eliminan baja concentración de microorganismos en su materia fecal (Whitlock y col, 2000; Dargatz y col, 2001., Collins y col, 2005).

Actualmente existen múltiples técnicas comerciales de ELISA disponibles en el mercado para Map. En América del Norte, hay tres aprobados por USDA (United State Department of Agriculture), ELISA Herdchek1, IDEXX (Laboratories, Westbrook, Maine); ELISA Parachek1 Biocor (Pfizer Animal Health) y ELISA simbióticos (San Diego, CA, EE.UU.). En Europa se comercializan ELISA Svanovir (Svanova Biotech, Uppsala, Suecia) y ELISA Pourquier (proveedor IDEXX). Las preparaciones de antígenos en la mayoría de casos no son comparables.

A pesar de que se comercializan como herramientas de *screening* para su uso a nivel de rebaños, también se tienden a usar como pruebas a nivel individual.

Numerosas comparaciones de ELISA se han realizado en diferentes lugares del mundo con el objetivo principal de determinar la sensibilidad y la especificidad (Sockett y col., 1992.; Ellis y col, 1998; Nielsen y col., 2001; Kalis y col, 2002, Mackenna y col, 2005), así como la repetibilidad y la reproducibilidad de las pruebas (Collins y col, 1993;. Adaska y col., 2002; Dargatz y col., 2004; Sweeney y col., 2006).

El comportamiento de la prueba de ELISA para Map relativas al cultivo de materia fecal individual, usualmente se reportan en función del patrón de eliminación de microorganismos por las heces de los animales en: pobre, intermedios y altos excretores respectivamente. A medida que la enfermedad progresa, los animales eliminan mayor concentración de microorganismo por gramos de materia fecal, estos animales tiene una

mayor probabilidad de ser positivos a las pruebas serológicas (ELISA) (de Lisle y col, 1980; Whitlock y col, 2000.). Además en las primeras etapas de la infección bovina, los anticuerpos contra Map generalmente no están presentes en la circulación general de los animales (Chiodini, 1996).

Las estimaciones de la sensibilidad de ELISA basado en los patrones de eliminación de microorganismos son, 15% en bajos excretores fecales y 88% para los altos excretores (Dargatz y col., 2001). Las discrepancias entre las investigaciones radica en la definición de lo que es un animal verdadero positivo y cuál es la técnica "de oro" para definir al mismo (Sockett y col., 1992)

Otros autores han analizado el uso de una "prueba de oro post mortem" (cultivo de muestra de tejido intestinal) para evaluar la prueba de ELISA indirecta. Ellos muestrearon 994 animales a nivel de plantas de faena, dicho ensayo concluyó que la prueba serológica tenía una sensibilidad con respecto al cultivo de tejidos de 9% y una especificidad de 97%. (Mc Kenna y col., 2005). El mismo autor analizó los datos usando el cultivo fecal individual como "prueba de oro" ante mortem siendo la sensibilidad del ELISA indirecto 16.6% y la especificidad de 97.1%, respectivamente.

Otras investigaciones ha reportado la sensibilidad de la prueba de cultivo fecal en un rango de 23%-29% en animales en etapas tempranas de la infección (Whitlock y col., 2000) y 70% -74% en etapas avanzadas de la enfermedad (Egan y col., 1999; Sockett y col., 1992).

McKenna y col., (2006) compararon 3 kits de ELISA comerciales, 2 de USA y 1 Europeo, los resultados obtenidos dieron un pobre acuerdo entre las tres pruebas ELISA (Kappa: 0,33 y 0,18). El déficit en el acuerdo de estas 3 pruebas se puede explicar por la baja sensibilidad de las mismas. Esto tiene consecuencias mayores cuando las pruebas se utilizan para tomar decisiones en forma individual en los animales. Si un animal resulta positivo por una de las pruebas este tiene alta probabilidad de dar un resultado diferente en otra prueba debido a los bajos valores de sensibilidad de las mismas.

Algunos autores sugieren que las Mycobacterias ambientales pueden producir falsos positivos en las pruebas de ELISA dificultando aún más el diagnóstico (Norby y col., 2007; Alinovi y col., 2009)

En Uruguay se han aplicado anteriormente la prueba de ELISA para realizar estudios de prevalencia (Nuñez, 2006). Así mismo Piaggio y col, 2003 realizaron un estudio en el cual compararon 2 pruebas de ELISA (Svanova vs Idexx) reportando un malo acuerdo entre los mismos (kappa: 0,17) y un área bajo la curva ROC de 0,65.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el comportamiento de la prueba de ELISA indirecta (Idexx) como estrategias para detectar rebaños lecheros infectados en la cuenca sur del Uruguay.

## **Materiales y Métodos**

### *Selección de los establecimientos*

Se seleccionaron un total de 9 establecimientos lecheros, 8 del departamento de Colonia y 1 de San José. EL muestreo se realizó en el periodo comprendido entre julio 2009 y julio 2010. Los criterios de inclusión fueron: población bovina de al menos 30 vacas en ordeño con historia clínica (diarrea crónica) y/o serológica de Map en el establecimiento. Los datos poblacionales fueron extraídos de la base de datos de DICOSE-MGAP (División Contralor de Semovientes, Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, Uruguay). Los datos de seropositividad fueron extraídos del proyecto denominado “Paratuberculosis bovina en Ganado Lechero en la Cuenca Sur del país” INIA-FPTA, Facultad de Veterinaria (2006). Se seleccionaron los establecimientos que tuvieron más de 3 animales seropositivos en un total de 20 vacas muestreadas (datos del año 2003). La población seleccionada era de baja prevalencia por serología.

### *Toma de muestras de sangre para serología*

Se extrajo de cada animal una muestra de sangre de la vena caudal por venopunción. Para la extracción de sangre se utilizaron jeringas descartables de 10 ml y agujas 18 G x 1 y ½. La sangre se depositó en tubos de vidrio de 100 x 16 mm, fueron identificadas con el código del establecimiento y con la identificación del tubo, el que se correlacionaba en una planilla con la identificación individual del animal, en este caso caravanas. Se extrajeron un total de 451 muestras de sangre.

### *Procesamiento de las muestras*

Las muestras una vez llegadas al laboratorio de Facultad de Veterinaria fueron centrifugadas, se separó el suero del coágulo. El suero fue trasvasado por duplicado a viales de 1,5 ml. Posteriormente se identificaron, rotularon y se congelaron a -20° C hasta su procesamiento.

### *Prueba Serológica, ELISA indirecto en suero*

Se realizó el diagnóstico de laboratorio para Paratuberculosis bovina siguiendo los procedimientos del proveedor del kit diagnóstico.

Para la detección de anticuerpos contra la Paratuberculosis se utilizó la técnica de ELISA (enzyme linked immunoassay). Se empleó el kits comercial de IDEXX Lab (HerdChek Map) que detecta la presencia de anticuerpos contra Map en suero o plasma y es recomendado para ser usado como prueba de tamiz. La prueba es un ELISA en fase sólida donde las reacciones cruzadas son removidas en un paso previo de absorción. Este paso consta de la dilución de la muestra con antígenos de *Mycobacterium phlei* y posterior incubación. La densidad óptica (DO) se midió a 650 nm en un lector de placas Multiskan II, de Labsystem.

### *Toma de muestras de materia fecal*

En cada establecimiento se seleccionaron 45 animales de más de 2 años de edad en lactación.

A cada animal se le extrajo en forma manual del recto una muestra de materia fecal. Las muestras fueron extraídas con bolsas de nylon, las cuales fueron identificadas con la caravana de cada animal.

Las muestras fueron acondicionadas en heladeras con refrigerantes hasta la llegada al laboratorio. Posteriormente se guardaron en freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. Las muestras fueron procesadas en la Dirección de Laboratorios Veterinarios del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (DILAVE, MGAP).

### *Procesamiento de muestras para cultivo de materia fecal individuales*

Dos gramos de materia fecal de cada muestra individual fue procesada por el método de centrifugación. El inóculo fue sembrado en 1 tubo de medio de cultivo Herrold sin mycobactina y 3 tubos de medio de cultivo Herrold con mycobactina. Los mismos se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  por 16 semanas, siendo evaluados semanalmente.

### *Análisis de datos*

La presencia o ausencia de anticuerpos fue determinada por el cociente (S/P) entre las densidades ópticas (DO muestra- DO control negativo) / (DO control positivo- DO control negativo) según protocolo del laboratorio productor del kit.

Si este cociente es  $\geq 0.25$  la muestra es considerada positiva a la presencia de anticuerpos contra Map.

El Software Statistical Stata11.0TM (Stata Corporation, College Station, Texas) se usó para determinar la sensibilidad y especificidad de la pruebas de ELISA con un IC 95%; así como la prevalencia proyectada a la población. Además se determinó la sensibilidad de la prueba de ELISA para detección de rebaños.

## **Resultados**

Se muestrearon en promedio 45 animales por establecimiento, salvo en uno de los establecimientos en el cual se muestrearon 91 animales. De los 451 muestras de suero procesadas por la técnica de ELISA indirecto 14 resultaron positivas al título de corte (S/P  $\geq 0,25$  se considera positivo) sugerido por el fabricante del kit. De los 9 establecimientos muestreados en 7 se obtuvieron muestras seropositivas, entre 1 hasta 3 por establecimiento. (Cuadro I). Dos de los establecimientos muestreados no presentaron serologías positivas. Se obtuvieron 6 aislamientos pertenecientes a 4 establecimientos. De los 7 establecimientos con al menos un animal seropositivo, en 3 se realizó aislamiento por cultivo fecal individual (Cuadro I), uno de los establecimientos con aislamiento fue negativo a la serología. En los cultivos fecales en 5 de las 6 muestras positivas las ufc se clasificaron como bajo recuento ( $< 10$  ufc /tubo), salvo para un establecimiento, en el cual, en una de las muestras individuales se obtuvo un recuento alto clasificándose dicho animal como alto eliminador  $>50$  ufc/tubo

Cuadro I. Proporción de animales seropositivos y positivos al cultivo de materia fecal

ID	Muestras de suero		ELISA		Muestras fecales individuales	Prevalencia (%) cultivo	Numero ufc de Map /tubo
	de suero	pos	Seroprevalencia (%)	Seroprevalencia (%)			
B	50	2	4,00		47	2,12 (1/47)	< 10 ufc
E	43	1	2,33		45	0,00 (0/45)	0
I	47	0	0,00		45	2,22 (1/45)	< 10 ufc
M	44	3	6,82		45	4,44 (2/45)	>50 ufc
NE	46	3	6,52		46	4,34 (2/46)	< 10 ufc
O	46	2	4,35		45	0,00/45	0
R	91	1	1,10		45	0,00/45	0
S	45	0	0,00		45	0,00/45	0
U	39	2	5,13		45	0,00/45	0
Total	451	14	3,80*		408	1,47 (6/408)	

ID: Códigos de identificación de los establecimientos

Pos: Sueros positivos a ELISA

\* Ver en cuadro II.

Cuadro II. Seroprevalencia de paratuberculosis a partir del ELISA Indirecto

Estimación de la Proporción				
Número de e strato = 1				
Número de PSUs = 9				
Numero de observaciones (muestra) = 451				
Total de la población en los 9 establecimientos = 1811				
	Proporción	Error. Estandar	[Intervalo de Confianza de 95 %]	
Serología PT				
Seronegativos	0.9615091	0.0094051	0.9398209	0.9831974
Seropositivos	0.0384909	0.0094051	0.0168026	0.0601791
PSU: Unidad Primaria de Muestreo				

En el Cuadro II se puede observar el cálculo de seroprevalencia para la población en estudio. Los 9 establecimientos muestreados tenían una población total de 1811 animales al momento de la toma de muestras. Para determinar la prevalencia a nivel poblacional se realizó una ponderación por el tamaño poblacional de cada establecimiento. Dicho cálculo se realizó con la rutina de muestreos complejos del Software Stata 11; para esto se generó una variable con los pesos de cada observación como el inverso de la probabilidad de estar en la muestra de cada bovino que es igual para todos los animales de ese establecimiento. También se definió la variable Farm (establecimientos) como unidad primaria de muestreo (PSU), para que corrija la

estimación de la varianza al estimar la prevalencia en el total de la población considerando los conglomerados (clusters) que significan los establecimientos. A partir de estos cálculos la seroprevalencia proyectada en la población fue de 3,8 %.

Los cuadros de contingencia II y IV se utilizan para calcular la Sensibilidad y Especificidad tanto del ELISA a nivel individual como la Sensibilidad del ELISA a nivel de rebaño.

El cuadro III muestra que de un total de 407 animales a los cuales se les efectuó tanto la prueba de ELISA como el cultivo individual se encontró que únicamente 1 animal fue positivo para ambas pruebas. Dicho animal presentó en el cultivo individual un alto recuento de microorganismos (>50 ufc/tubo) (Cuadro I). Los 5 animales positivos a cultivo fecal no fueron positivos a la prueba de ELISA, los mismos presentaron una concentración de ufc < a 10, clasificados como débiles eliminadores. Así mismo la prueba de ELISA detectó 12 animales como seropositivos los cuales no fueron detectados como excretores en el cultivo.

Cuadro III. Cuadro de de contingencia Cultivo de materia fecal vs ELISA indirecto

Cultivo individual	ELISA PT a		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	1	5	6
Negativo	12	389	401
Total	13	394	407

a. ELISA PT: Test de ELISA indirecto contra paratuberculosis

El cuadro IV de contingencia se utiliza para determinar la sensibilidad de la prueba de ELISA a nivel de rebaño. Para dicha determinación previamente se clasificaron los 9 establecimientos muestreados como establecimientos que eran positivos a Map ya sea por ser seropositivos en muestreos anteriores, por tener antecedentes clínicos de la enfermedad y/o por presentar aislamientos a partir de cultivo de materia fecal.

Con la prueba de ELISA indirecto se detectaron 7 de los 9 establecimientos clasificados previamente como positivos.

La sensibilidad de la prueba de ELISA indirecto con respecto al cultivo fue de 16,6% (IC 0,42%-64,12%) y la especificidad fue de 97,0 % (IC 94,83%-98,44%) (Cuadro IV).

La sensibilidad a nivel de rebaño para la técnica de ELISA fue de 77,78% (IC 39,99%- 97,19%)



Cuadro IV. Sensibilidad y Especificidad de la prueba de ELISA indirecto respecto al cultivo de materia fecal

			IC 95%	
Sensibilidad Relativa	Pr ( T+/D+)a	16,67%	0,42	64,12
Especificidad Relativa	Pr ( T-/ D-)b	97,01%	94,83	98,44
Prevalencia	Pr (D) c	1,47%	0,54	3,18
RSe (e)	Pr(H+/HV+) d	77,78%	39,99	97,19

*a, Pr (T+/D+): Probabilidad de test positivo (ELISA) tal que el animal este infectado (positivo a Map por cultivo de materia fecal individual),*

*b, Pr (T-/ D-): Probabilidad de test negativo (ELISA) tal que el animal este sano (negativo a Map por cultivo de materia fecal individual),*

*c, Pr(D+): Prevalencia por cultivo de materia fecal individual,*

*d, Pr(H+/HV+): Probabilidad de rebaño positivo (ELISA) tal que el rebaño este infectado (positivo a Map por cultivo de materia fecal individual serología previa y antecedentes clínicos),*

*(e), RSe: sensibilidad del rebaño por la prueba de ELISA indirecta,*

*IC: Intervalo de confianza*

## Discusión

La sensibilidad de ELISA para la detección de animales infectados con Map es baja (5%-30%), pero aumenta con la edad de los animales (Nielsen y Toft, 2006). Las estimaciones de especificidad están por encima del 95% para las pruebas ELISA comerciales.

Las pruebas de ELISA más comúnmente utilizadas para detectar animales positivos son para utilizarse en suero y en leche. Algunos autores reportan que hay variaciones en el momento de aplicar dichas pruebas. Nielsen y col (2002) realizaron un ensayo donde encontraron que la prueba de ELISA en sueros detecto mas animales positivos al final de la lactancia, en cambio la prueba de ELISA en leche al comienzo de la misma. Estas diferencias se pueden utilizar para optimizar la toma de muestras. En nuestro ensayo no se tuvo en cuenta el momento de la lactancia para la toma de muestras, el único criterio fue animales mayores de 2 años en producción, a partir de este criterio los animales fueron tomados al azar.

Los 9 establecimientos muestreados tenían historia clínica de paratuberculosis además de serología previa positiva a Map por ELISA indirecto (IDEXX).

A pesar de eso en nuestro muestreo hubo 2 establecimientos muestreados que resultaron negativos a la prueba de ELISA, sin embargo uno de ellos (identificados como “I”) fue confirmado como infectado por aislamiento bacteriano a partir de cultivo de materia fecal (cuadro I).

La sensibilidad y especificidad de la prueba de ELISA se calculó a partir del cultivo fecal el que fue considerado como “prueba de oro antemortem”, dando como resultado una sensibilidad (Se) de 16, 6% y una especificidad (Sp) del 97,0; si bien el IC fue amplio (Cuadro V), este puede explicarse por un tamaño de muestra relativamente

pequeño. A pesar de esto tanto la Se como la Sp coinciden con la reportada por otros autores (McKenna y col., 2005; Jubb y col., 2004; McNab y col., 1991).

Algunos autores reportan que la capacidad del ELISA para detectar anticuerpos de Map en animales infectados depende de la frecuencia con que se realice la prueba y del punto de corte elegido. Algunos investigadores sugieren que la Se del ELISA se podría aumentar si un solo resultado positivo en la primera vez de realizado el test ya es considerado como positivo (Nielsen, 2010). En nuestro ensayo el muestreo se realizó una única vez a lo largo del estudio. Otra forma de aumentar la sensibilidad de la prueba de ELISA es aumentar la frecuencia de muestreo.

Así mismo la sensibilidad de la prueba de ELISA aumenta a medida que la enfermedad avanza y la probabilidad de tener animales seropositivos es mayor cuando estos son altos eliminadores y están clínicamente enfermos. Algunos autores reportan Se de la prueba de ELISA entre 50-80% en animales clínicamente enfermos (Sweeney y col., 1995; Bech-Nielsen y col., 1992). En nuestro ensayo el único animal seropositivo que presentó cultivo de heces positivo era un “alto” excretor de microorganismos, coincidiendo este hallazgo con los de otros autores (Nielsen, 2008).

Los animales que fueron positivos a la prueba serológica pero no al cultivo podrían ser animales infectados pero no infecciosos (no excretores) (Collins, 2010). Lo que explicaría la ausencia de cultivo positivo en los mismos.

También se han reportado la ocurrencia de falsos positivos a las pruebas serológicas debido a *Mycobacterias* spp ambientales, con similitudes antigénicas al Map, dando reacciones cruzadas entre las mismas. Las *Mycobacterias* que encontraron más frecuente en el ambiente fueron *M avium*, *M intracellulare*, and *M scrofulaceum*, (Osterstock y col., 2007).

Sweeney y col, (2006) reportaron que en algunos animales en etapas posteriores a la infección, la producción de anticuerpos puede fluctuar. Así mismo debido a la imperfecta “Se” de la prueba de ELISA existen animales negativos a la misma, en establecimientos infectados, que podrían ser infectados pero no estar eliminando el microorganismo, ya que seguramente están cursando etapas tempranas de la enfermedad y donde la respuesta inmune aun no generó un cambio notorio de celular a humoral (Collins, 1996; Stabel, 1997; Clark y col., 2008).

Sin embargo en nuestro estudio hubo 5 animales positivos al cultivo fecal pero negativos a la serología. Hay que mencionar que los mismo eran eliminadores débiles (<10ufc) encontrándose seguramente en etapas tempranas de la enfermedad donde los resultados de las pruebas de ELISA pueden no ser consistentes con el cultivo.

La sensibilidad a nivel de rodeo fue de 77,78 % al igual que para el cálculo de la sensibilidad y especificidad los IC fueron amplios debido al limitado tamaño de las muestras. Si bien el número de establecimientos es pequeño para hacer una proyección al resto de los establecimientos de la cuenca lechera, dicha estimación concuerda con los datos reportados por Núñez, 2006, siendo en ese año de de 70,2% ± 8,1.

Por último el ELISA indirecto como método de *screening* resultó ser el más sensible, de los 3 ya que detectó 7 de los 9 establecimientos infectados. Si bien esta herramienta fue la que logró una mayor sensibilidad a nivel de rebaño, debido a la

menor especificidad se corre el riesgo de clasificar rodeos como infectados en los cuales se podría estar detectando animales falsos positivos.

La importancia de estas herramientas y/o estrategias radica en detectar rebaños infectados para aplicar programas de control o detectar rodeos libres para su certificación. Dichas estrategias pueden ser usadas solas o combinadas en diferentes programas (ej. ELISA con cultivo individual de materia fecal) para aumentar la sensibilidad de detección.

Si bien en la bibliografía varias de estas estrategias tiene una buena performance en establecimientos con prevalencias altas (>16%) las mismas presentan una menor *performance* cuando son aplicadas en rebaños de bajas prevalencias (<5%). En nuestro caso esto quedo demostrado ya que los 9 establecimientos muestreados eran de baja prevalencia. Dicho fenómeno también se evidencia cuando dichas pruebas son usadas a nivel individual. (Tavornpanich y col., 2008).

Hay que tener en cuenta que Uruguay está tendiendo a la intensificación de la producción ganadera lo cual podría favorecer la transmisión de la enfermedad, estas bajas prevalencias a nivel predial son importantes para comenzar programas de control que sean exitosos y no tan extensos.

## **Bibliografía**

1. Adaska J, M Munoz-Zanzi CA, Hietala SK. (2002). Evaluation of result variability with a commercial Johne's disease enzymelinked immunosorbent assay kit and repeat testing of samples. *J Vet Diagn Invest* 14:423–426.
2. Alinovi CA, Ward MP, Lin TL, Moore GE, Wu CC. (2009). Real-time PCR, compared to liquid and solid culture media and ELISA for the detection of *Mycobacterium avium* ssp paratuberculosis *Vet Microbiol* 136: 177–179.
3. Bech-Nielsen S, Jorgensen JB, Ahrens P, Feld NC. (1992). Diagnostic accuracy of a *Mycobacterium phlei*-absorbed serum enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of bovine paratuberculosis in dairy cows. *J Clin Microbiol* 30: 613–618.
4. Chiodini RJ. (1996). Immunology: resistance to paratuberculosis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 12: 313–343.
5. Clark DL, Koziczkowski JJ, Radcliff RP, Carlson RA, Ellingson JL. (2008). Detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis: comparing fecal culture versus serum enzyme-linked immunosorbent assay and direct fecal polymerase chain reaction. *J Dairy Sci.* 91: 2620–2627.
6. Collins M T, Wells S J, Petrini KR, Collins JE, Schultz RD, and Whitlock R H.(2005). Evaluation of five antibody detection tests for diagnosis of bovine paratuberculosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 12(6): 685–692.
7. Collins MT. (1996). Diagnosis of paratuberculosis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 12: 357–371.

8. Osterstock J B, Fosgate G T, Norby B, Manning E J, Collins MT, Roussel A J. (2007). Contribution of environmental mycobacteria to false-positive serum ELISA results for paratuberculosis. *JAVMA* 230(6): 896-901
9. Collins MT, Angulo A, Buergelt CD, Hennager SG, Hietala SK, Jacobson RH, Whipple DL, Whitlock RH. (1993). Reproducibility of a commercial enzyme linked immunosorbent assay for bovine paratuberculosis among eight laboratories. *J Vet Diagn Invest* 5:52–55.
10. Dargatz DA, Byrum BA, Barber LK, Sweeney RW, Whitlock RH, Shulaw WP, Jacobson RH, Stabel JR. (2001). Evaluation of a commercial ELISA for diagnosis of paratuberculosis in cattle. *J Am Vet Med Assoc* 218: 1163–1166.
11. Dargatz DA, Byrum BA, Collins MT, Goyal SM, Hietala SK, Jacobson RH, Koprak CA, Martin BM, McCluskey BJ, Tewari D. (2004). A multilaboratory evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay test for the detection of antibodies against *Mycobacterium avium* subsp, paratuberculosis in cattle. *J Vet Diagn Invest* 16:509–514.
12. De Lisle GW, Samagh BS, Duncan JR. (1980). Bovine paratuberculosis: A comparison of fecal culture and the antibody response. *Can J Comp Med.* 44:183- 191.
13. Egan J, Weavers E, O’Grady D. (1999). An evaluation of diagnostic tests for Johne’s disease in cattle. *Irish Vet. J.* 52: 86–89.
14. Ellis TM, Carson BA, Kalkhoven MJ, Martin PA. (1998). Specificity of two absorbed ELISAs for surveys of *Mycobacterium paratuberculosis* in cattle. *Aust, Vet J* 76:497–499.
15. Hirst HL, Garry FB, Salman MD. (2002). Assessment of test results when using a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of paratuberculosis in repeated samples collected from adult dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc* 220:1685–1689.
16. Jubb TF, Sergeant ES, Callinan AP, Galvin J. (2004). Estimate of the sensitivity of an ELISA used to detect Johne’s disease in Victorian dairy cattle herds. *Aust Vet J* 82:569–573.
17. Kalis CH, Barkema HW, Hesselink JW, van Maanen C, Collin MT. (2002). Evaluation of two absorbed enzyme-linked immunosorbent assays and a complement fixation test as replacements for fecal culture in the detection of cows shedding *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *J Vet Diagn Invest* 14:219–224.
18. McKenna SLB, Barkema HW, Keefe GP, Sockett DC. (2006). Agreement between three ELISAs for *Mycobacterium avium* subsp, paratuberculosis in dairy cattle. *Veterinary Microbiology* 114: 285–291.

19. McKenna SL, Keefe GP, Barkema HW, Sockett DC. (2005). Evaluation of three ELISAs for *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis using tissue and fecal culture as comparison standards. *Vet Microbiol* 110:105–111.
20. McNab WB, Meek AH, Duncan JR, Brooks BW, Van Dreumel AA, Martin SW, Nielsen KH, Sugden, E.A, Turcotte C. (1991). An evaluation of selected screening tests for bovine paratuberculosis. *Can J Vet Res* 55:252–259.
21. Nielsen SS, Toft N. (2008). Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: A review of accuracies of ELISA, interferon-g assay and fecal culture techniques *Veterinary Microbiology* 129:217–235.
22. Nielsen SS, Houe H, Thamsborg SM, Bitsch V. (2001). Comparison of two enzyme-linked immunosorbent assays for serologic diagnosis of paratuberculosis (Johne's disease) in cattle using different subspecies strains of *Mycobacterium avium*. *J Vet Diagn Invest* 13:164–166.
23. Nielsen SS.(2008). Transitions in diagnostic tests used for detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infections in cattle. *Vet. Microbiol.* 132:274-282.
24. Nielsen SS, Toft N. (2006). Age-specific characteristics of ELISA and fecal culture for purpose specific testing for paratuberculosis. *Journal of Dairy Science* 89:569–579.
25. Norby B, Fosgate GT, Manning EJ, Collins MT, Roussel AJ. (2007). Environmental mycobacteria in soil and water on beef ranches: association between presence of cultivable mycobacteria and soil and water physicochemical characteristics. *Vet Microbiol* 124:153–159.
26. Piaggio J, Núñez A, Gil A, Huertas S, Suanes A, Cernicchiaro N. (2003). Comparación de dos pruebas de ELISA para detección de anticuerpos de *Mycobacterium paratuberculosis* en bovinos. VI Jornadas Chilenas de Buiatría Pucón, Chile.
27. Sockett DC, Carr DJ, Collins MT, (1992). Evaluation of conventional and radiometric fecal culture and a commercial DNA probe for diagnosis of *Mycobacterium paratuberculosis* infections in cattle. *Can J Vet Res* 56:148–153.a
28. Sockett DC, Conrad TA, Thomas CB, Collins MT. (1992a). Evaluation of four serological tests for bovine paratuberculosis. *J Clin Microbiol* 30:1134–1139.
29. Stabel JR. (1997). An improved method for cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples and comparison to three other methods. *J Vet Diagn Invest.* 9:375–380.

30. Stabel JR, Goff JP. (2004). Efficacy of immunologic assays for the detection of Johne's disease in dairy cows fed additional energy during the periparturient period, *J Vet Diagn Invest* 16:412–420.
31. Sweeney RW, Whitlock RH, McAdams S, Fyock T.(2006). Longitudinal study of ELISA seroreactivity to *Mycobacterium avium* subsp, paratuberculosis in infected cattle and culture-negative herd mates. *J Vet Diagn Invest* 18:2–6.
32. Sweeney RW, Whitlock RH, Buckley CL, Spencer PA. (1995). Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle. *J Vet Diagn Invest* 7:488–493.
33. Tavornpanich S, Muñoz-Zanzi CA, Wells SJ , Raizman EA , Carpenter TE, Johnson W, Gardner IA. (2008). Simulation model for evaluation of testing strategies for detection of paratuberculosis in Midwestern US dairy herds. *Prev Vet Med* 83:65–82.
34. USDA-APHIS. (2002).Uniform Program Standards for the Voluntary Bovine Johne's Disease Control Program. Washington DC.
35. Wells SJ, Godden SM, Whitlock RH, Collins JE. (2002). Interpretation of the serum ELISA for detection of *Mycobacterium avium* subsp, paratuberculosis fecal shedding in dairy cattle herds. Proceedings of the 7<sup>o</sup> International Colloquium of Paratuberculosis, International Association for Paratuberculosis, Bilbao, España.
36. Whitlock RH, Wells SJ, Sweeney RW, Van Tiem J. (2000). ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method *Vet Microbiol* 77:387–398.

## Conclusiones

Este estudio analizó 3 diferentes estrategias (muestreo ambiental, pool de materia fecal, ELISA indirecto en muestras de suero) para detectar rebaños infectados por Map.

Las mismas ya han sido reportadas por otros autores, como quedó señalado en los diferentes capítulos de esta tesis. Algunos trabajos al respecto incluyeron dentro de sus investigaciones muestreos grandes y otros en su defecto debieron trabajar con una muestra “n” pequeña de establecimientos.

Nuestro trabajo cae en los estudios de “n” pequeño debido al alto costo de las pruebas involucradas lo cual nos limita a la hora de sacar conclusiones, pero a pesar de esa debilidad, el mismo tiene fortalezas las cuales vale la pena resaltar.

En los últimos años investigadores Uruguayos publicaron sobre seroprevalencia, factores de riesgo y comparación de pruebas de ELISA en paratuberculosis (Piaggio y Nuñez 2002, 2003, 2006). Errico y col (1983 y 1990) habían reportado algunos casos en épocas anteriores de aislamiento y programas de control, pero hasta la fecha no se había realizado un trabajo que involucrara diferentes estrategias de detección de rodeos infectados aplicadas al mismo tiempo.

A pesar que los resultados obtenidos para las 3 estrategias no pueden proyectarse al resto de las poblaciones y requieren un estudio más amplio, se ha recorrido un extenso camino para poder continuar con estas investigaciones.

Uno de los productos concretos que deja este trabajo independientemente de los objetivos específicos planteados es la validación de un medio de cultivo “*in house*”, el cual disminuye sustancialmente los costos de los cultivos de materia fecal para el diagnóstico de Map. Así mismo adquirimos experiencia en muestreos ambientales y pools de materia fecal, los cual tiene la ventaja de ser estrategias de bajo costo. Respecto al muestreo ambiental una de las ventajas es que no se tiene que manejar animales durante el muestreo lo cual está en armonía con el cuidado del bienestar de los animales.

La técnica de pools de cultivo fecal sirve como herramienta de *screening* de bajo costo respecto al cultivo individual. Si bien otros autores reportaron buena sensibilidad a nivel de rebaños con respecto al cultivo individual, en nuestro caso fue menor. La menor sensibilidad del pool probablemente pueda ser compensada con un muestreo con un “n” mayor que obtenga una sensibilidad equivalente a un mismo costo.

Por ultimo el ELISA indirecto como método de *screening* resultó ser el más sensible, de los 3 ya que detectó 7 de los 9 establecimientos infectados. Si bien esta herramienta fue la que logró una mayor sensibilidad a nivel de rebaño, debido a la menor especificidad se corre el riesgo de clasificar rodeos como infectados en los cuales se podría estar detectando animales falsos positivos.

La importancia de estas herramientas y/o estrategias radica en detectar rebaños infectados para aplicar programas de control o detectar rodeos libres para su certificación. Dichas estrategias pueden ser usadas solas o combinadas en diferentes

programas (ej. ELISA con cultivo individual de materia fecal) para aumentar la sensibilidad de detección.

Si bien según la bibliografía varias de estas estrategias tiene una buena performance en establecimientos con prevalencias altas (>16%) las mismas presentan una menor *performance* cuando son aplicadas en rebaños de bajas prevalencias (<5%). En nuestro caso esto quedo demostrado ya que los 9 establecimientos muestreados eran de baja prevalencia. Dicho fenómeno también se evidencia cuando dichas pruebas son usadas a nivel individual. (Tavornpanich et al., 2008).

Hay que resaltar que los valores de sensibilidad y especificidad de las pruebas cuando son utilizadas como “Pruebas de Rebaño” están influenciados por la prevalencia dentro del rebaño, el número de muestras analizadas, y la sensibilidad y especificidad de las pruebas a nivel individual así como el valor de corte usado para designar al rebaño como positivo (Christensen y Gardner, 2000).

Hay que tener en cuenta que Uruguay esta tendiendo a la intensificación de la producción ganadera lo cual podría favorecer la transmisión de la enfermedad, estas bajas prevalencias a nivel predial son importantes para comenzar programas de control que sean exitosos y no tan extensos.

Así mismo algunos países ya están exigiendo para la importación de ganado en pie el testeo de los animales contra paratuberculosis, con lo cual dicha enfermedad comenzara a ser en Uruguay una barrera sanitaria para la exportación.

Este trabajo espera contribuir con el conocimiento de la Paratuberculosis en el Uruguay y generar nuevas hipótesis para futuros trabajos.

## **Bibliografía**

1. Errico F, Bermudez J. (1983). Aislamiento de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en bovinos en el Uruguay. *Veterinaria* 19 (83): 13-16.
2. Errico F., Rossi J., Silva M., Sallanes H.(1990). Ensayo de control de la paratuberculosis (enfermedad de Johne) en un establecimiento lechero *Veterinaria* 26 (110):10-14.
3. Núñez A. (2006). Paratuberculosis bovina en Ganado Lechero en la Cuenca Sur del país. Tesis de Maestría en Salud Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad de la República.
4. Núñez A., Piaggio J., Zaffaroni R., Cernichiaro., N Suanes A., de Freitas J., Huertas S., Gil A. (2003). Seroprevalence study of bovine paratuberculosis in dairy herds in Uruguay. In Saltijeral J. (ed), Proceedings of the XI International Congress in Animal Hygiene. ISAH 2003, 23-27. Ciudad de México. p 493-495.
5. Piaggio J., Núñez A., Gil A., Johne's disease serological prevalence in Uruguayan dairy cows. (2002). In; Juste R., Geijo M., Garrido J. (ed.) Proceedings of the 7° International Colloquium of Paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis, Bilbao, España. P. 455-456.



6. Tavoranpanich S., Muñoz-Zanzi CA, Wells S J , Raizman E A , Carpenter T E., Johnson W , Gardner I A. (2008). Simulation model for evaluation of testing strategies for detection of paratuberculosis in Midwestern US dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine* 83: 65.

## **Anexo I**

**New Bolton Center University of Pennsylvania School of Veterinary Medicine  
Johnes's Laboratoy (Protocolo, 2001)**

### **Formula del cultivo Herrlod con Micobactina**

1. 9 gr. Peptona
2. 4,1 gr Piruvato de Sodio
3. 4,5gr. NaCl
4. 15,3 gr. Agar Noble
5. 2,7 gr. Extracto de carne
6. 27 ml Glicerina
7. 4,1 ml NaOH (4%). Usar lo necesario para llevar el cultivo líquido de pH 6,9 a 7,0, el cultivo sólido debe de tener un pH de 7,2 a 7,3.
8. Micobactina (2mgr./vial)
9. 6 yemas de huevo (120 ml/L)
10. 5,1 ml 2 % verde de Malaquita

Antibióticos: Anfotericina B, Vancomicina, Acido Nalídixico

Preparación de la Micobactina: Agregar 4 ml de alcohol etílico (95%) en los viales de 2 mg de micobactina J.

Autoclavar el medio líquido 35 minutos a 121 ° C. Posteriormente agregar las yemas de huevo estériles, verde de malaquita y antibióticos.

El medio de cultivo Herrold sin micobactina se realiza de la misma forma pero sin incluir la micobactina.