



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**USO DE PCR CUANTITATIVA COMO HERRAMIENTA PARA
EL DIAGNÓSTICO DE PARATUBERCULOSIS BOVINA EN
DOS TAMBOS DE URUGUAY**

MARINA MAURENTE BERÓN

TESIS DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

**URUGUAY
2022**



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**USO DE PCR CUANTITATIVA COMO HERRAMIENTA PARA
EL DIAGNÓSTICO DE PARATUBERCULOSIS BOVINA EN
DOS TAMBOS DE URUGUAY**

MARINA MAURENTE BERÓN

**Martín Fraga
Director de Tesis**

**Federico Giannitti
Co-director**

**Sofía Fernández
Co-directora**

2022

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE

DEFENSA DE TESIS

Alejandra Suanes; DMTV, MSc

División de Laboratorios Veterinarios “Miguel C. Rubino”

Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca

Rodrigo Puentes; DVM, MSc, PhD

Facultad de Veterinaria

Universidad de la República - Uruguay

Aline de Marco Viott; MV, MSc, PhD

Universidade Federal do Paraná

Paraná - Brasil



Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
Uruguay



12/12

ACTA DE TESIS DE MAESTRÍA

ORIENTACIÓN: salud animal

LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA: aula virtual, 16/12/2022

TRIBUNAL: Alejandra Suanes, Rodrigo Puentes, Aline De Marco Viott

CI	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
6309308 - 8	Marina Maurente Berón	SSS	12

NOTA: La calificación mínima para aprobar la defensa es B.B.B (6)

TRIBUNAL

FIRMA

Alejandra Suanes

Rodrigo Puentes

Aline De Marco Viott

[Handwritten signature of Aline De Marco Viott]

[Handwritten arrow pointing downwards]

Montevideo, 16 de diciembre de 2022

Acta de tesis de Maestría en Salud animal – PPFVET

La presente tesis investigó sobre el **"USO DE PCR CUANTITATIVA COMO HERRAMIENTA PARA EL DIAGNÓSTICO DE PARATUBERCULOSIS BOVINA EN DOS TAMBOS DE URUGUAY"**.

El tema abordado por la tesista es de gran importancia para la producción pecuaria, teniendo en cuenta el impacto que esta enfermedad tiene en aspectos económicos de la producción nacional, así como para el comercio internacional.

El texto de la tesis está bien escrito, cuenta con una fundamentación, metodología y resultados que corresponden con lo solicitado por el programa de posgrado. Es una tesis con un componente metodológico de laboratorio y análisis estadístico importante, lo cual capacitó en estas herramientas a la estudiante. Este trabajo profundiza en el estudio referido al diagnóstico molecular de la enfermedad, aportando conocimiento para futuros trabajos de la Paratuberculosis bovina en el Uruguay.

En relación a la exposición se realizó con una comunicación clara y fluida validando el trabajo escrito. La Dra. Marina Maurente respondió de forma contundente y con profundo conocimiento de la temática.

Se sugiere la incorporación de las modificaciones planteadas antes de realizar la impresión final de la tesis.

En base a las anteriores apreciaciones, este tribunal otorga la calificación de Aprobado con Mención (12) felicitando a la Dra. Marina Maurente y a sus tutores por el trabajo realizado.


Dr. Aline de Marco Viott


Dra. Alejandra Suanes


Dr. Rodrigo Puentes

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por apoyarme en esta trayectoria, principalmente a mis padres, Oscar y Elen, y mi hermano, Rulián, quien estuvieron presentes desde el principio, creyendo en mí como profesional y persona. Sus apoyos fueron fundamentales para esta formación, esta conquista es nuestra.

A mi compañero de vida, Daniel Santander, por incentivarne diariamente y compartir sus conocimientos. Gracias por siempre escucharme y llenarme de amor y cariño.

A mi tutor, Martín Fraga, por sus ensañamientos y apoyos constantes, principalmente por su paciencia en mostrarme este “nuevo mundo”. A mis co-tutores, Sofía Fernández y Federico Giannitti, por todo el soporte y conocimiento. Un agradecimiento especial a Sofía por compartir todo su conocimiento en biología molecular.

Agradezco al equipo de la PSA por estar siempre presentes. En especial a mis amigas de oficina, Caroline Silveira, Laura Casaux, Ludmila Slimovich y Victoria Urioste que siempre me apoyaron y aconsejaron. Carol te agradezco por suportarme todos los días, compartir buenas energías y conocimiento.

A mis amigos de Brasil, Ronaldo y Joice, compañeros desde la residencia y que mismo lejos siempre se hicieron presentes. Muchas veces creyeron en mi más que yo misma, su amistad fue muy importante en esta jornada.

A los amigos del pabellón, que compartieron diversos momentos conmigo, desde asados hasta buscarme en el laboratorio. En especial a Camila, Diulia, Pamela y Bruno que estuvieron presentes en algunas etapas de este trabajo.

Al INIA por la disposición de los equipamientos y por apoyo financiero para poder realizar este trabajo.

A todos, ¡MUCHAS GRACIAS!

Índice

RESUMEN	v
SUMMARY	vi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Antecedentes en Uruguay	2
1.2. Agente	3
1.3. Enfermedad en los rumiantes.....	3
1.3.1. Transmisión	4
1.3.2. Patogenia	4
1.3.3. Signos clínicos y fase de infección.....	5
1.4. Diagnóstico	6
1.4.1. Detección del agente.....	6
1.4.2. Diagnóstico Inmunológico	8
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	9
3. HIPÓTESIS	9
4. OBJETIVOS.....	9
4.1. Objetivo general.....	10
4.2. Objetivos específicos	10
5. ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN	10
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
6.1. Selección de los establecimientos.....	11
6.2. Seroprevalencia de paratuberculosis.....	11
6.3. Detección de MAP	12
6.4. Estudio longitudinal.....	12
6.5. Procesamiento de muestras en el laboratorio	13
6.5.1. ELISA.....	13
6.5.2. Extracción de ADN de heces, suelo y leche.....	14
6.5.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	14
6.5.4. PCR en tiempo real cuantitativa (qPCR).....	15
6.5.5. Cultivo	15
6.5.6. Tinción de Ziehl-Neelsen	16
6.6. Análisis estadísticos	16
6.6.1. Análisis descriptivo	16
6.6.2. Prueba de concordancia.....	16
6.6.3. Análisis de características operativas del receptor (ROC)	17
6.6.4. Regresión lineal	17
7. RESULTADOS	17
7.1. Seroprevalencia de PTBC.....	18

7.2.	Detección de MAP	18
7.3.	Estudio longitudinal	19
7.4.	Análisis estadístico	21
7.4.1.	Prueba de concordancia	21
7.4.2.	ROC	21
7.4.3.	Regresión lineal	22
8.	DISCUSIÓN	23
9.	CONCLUSIONES	26
10.	REFERENCIAS	26
11.	ANEXOS	<u>3534</u>

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1: Esquema de la estrategia de investigación utilizada. T: tiempo.	11
Figura 2. Curva de análisis ROC comparado entre las técnicas de PCR (línea roja) y ZN (línea verde) para detección de MAP.	22
Tabla 1. Muestras obtenidas en los cuatro tiempos de muestreo (T1, T2, T3 y T4) en el establecimiento 2.	13
Tabla 2. Detección de MAP en muestras de heces de vacas del establecimiento 2, a través de las técnicas de PCR, qPCR y cultivo.	19
Tabla 3. Detección de MAP en muestras de heces por las técnicas de ZN, PCR y qPCR, referentes a los cuatro tiempos de muestreo (T1, T2, T3 y T4) en el establecimiento 2.	20
Tabla 4. Detección de MAP en muestras de heces y leche a través de la técnica de qPCR en los cuatro tiempos de muestreo (T1, T2, T3 y T4) en el establecimiento 2.	20
Tabla 5. Detección de MAP en muestras ambientales durante los cuatro tiempos de muestreo (T1, T2, T3 y T4), por las técnicas de PCR y qPCR en el establecimiento 2.	21
Tabla 6. Resultado del análisis ROC de la qPCR utilizando la PCR como prueba de referencia para detección de MAP.	21
Tabla 7. Resultado del análisis ROC de la qPCR utilizando el ZN como prueba de referencia para detección de MAP.	22

RESUMEN

La paratuberculosis (PTBC) es una enfermedad entérica, crónica de distribución mundial. Es producida por *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis* (MAP) y afecta rumiantes domésticos y silvestres. Debido a las características de la infección es difícil detectar a MAP o la respuesta inmune contra el mismo. En las fases más avanzadas la enfermedad se caracteriza por diarrea crónica, pérdida de peso, hipoproteïnemia y muerte. El objetivo de este estudio fue evaluar el uso de qPCR para la detección de MAP en dos tambos bovinos del departamento de Colonia con situaciones contrastantes respecto de la ocurrencia de casos clínicos de PTBC. Para esto, se determinó por ELISA la seroprevalencia real de dos establecimientos lecheros (1 y 2). Luego, se aplicó PCR y qPCR para detectar al microorganismo en materia fecal y ambiente. Por otro lado, en el establecimiento 2 se realizó un estudio longitudinal durante dos meses en que se tomaron muestras de materia fecal y leche de animales seropositivos para detectar MAP por coloración de Ziehl-Neelsen (ZN), PCR y qPCR. Durante el mismo periodo se tomaron muestras ambientales y de tanque de leche y se realizó PCR y qPCR. Se determinó la concordancia entre qPCR, PCR y coloración de ZN, y estableció un punto de corte de qPCR que permitió predecir los resultados cualitativos de las pruebas de PCR y coloración de ZN. La seroprevalencia real en el establecimiento 1 es de 0% y en el establecimiento 2 de 7%. Utilizando qPCR se pudo detectar MAP en el establecimiento 1 en una muestra de materia fecal y en una ambiental. En el establecimiento 2, se detectó MAP en la materia fecal y en muestras ambientales en el 68% y 80%, respectivamente. Al comparar las técnicas utilizadas, hubo concordancia mínima entre PCR y qPCR, concordancia moderada entre PCR y ZN y falta de concordancia entre ZN y qPCR. Se determinó el punto de corte óptimo de la qPCR que se asoció con resultado positivo de PCR de 258 copias/mg de materia fecal y para ZN de 1256 copias/mg de materia fecal. Para las muestras de leche individual, 32% presentó positividad por qPCR, entretanto en tanque de leche no hubo detección. El 100% de las muestras ambientales fueron positivas por esta técnica. Como conclusión, la qPCR presenta mejor capacidad de detección, permitiendo detectar y cuantificar MAP en distintos tipos de muestra, pudiendo ser una herramienta valiosa en programas de control. Las muestras ambientales, principalmente el pool de materia fecal de la sala pre-ordeño podría ser utilizado para monitoreos regulares para definir el estatus de un establecimiento.

SUMMARY

Paratuberculosis (PTBC) is a chronic enteric disease of worldwide distribution. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) is the etiological agent that infects domestic and wild ruminants. Due to the characteristics of the infection, it is difficult to detect MAP or the immune response against it. In the later stages, the disease is characterized by chronic diarrhea, weight loss, hypoproteinemia, and death. The objective of this study was to evaluate the use of qPCR for the detection of MAP in two dairy farms in the department of Colonia with contrasting situations regarding the occurrence of clinical cases of PTBC. For this purpose, the real seroprevalence was determined by ELISA in dairy farms 1 and 2. Later, PCR and qPCR were applied to detect the microorganism in feces and the environment. On the other hand, a longitudinal study was carried out in farm 2 for two months during which fecal and milk samples were taken from seropositive animals to detect MAP by Ziehl-Neelsen staining (ZN), PCR and qPCR. During the same period, environmental and milk tank samples were collected, and PCR and qPCR were performed. The concordance between qPCR, PCR and ZN staining was determined, and a qPCR cut-off point was established to predict the qualitative results of the PCR and ZN staining tests. The real seroprevalence in farm 1 was 0% and in farm 2 was 7%. Using qPCR, it was possible to detect MAP in farm 1 in one fecal sample and one environmental sample. In farm 2, MAP was detected in 68% and 80% of fecal and environmental samples respectively. When comparing the techniques used, there was a minimal agreement between PCR and qPCR, a moderate agreement between PCR and ZN and no agreement between ZN and qPCR. The optimal qPCR cutoff point was determined to be associated with a positive PCR result of 258 copies/mg feces and for ZN of 1256 copies/mg feces. For individual milk samples, 32% showed positivity by qPCR, 100% of the environmental samples were positive and none of the milk tanks was positive. In conclusion, qPCR has a better detection capacity allowing the detection and quantification of MAP in different types of samples. This technique could be a valuable tool in control programs. Environmental samples, mainly the fecal pool from the pre-milking parlor, could be used for regular monitoring to define the status of a farm.

1. INTRODUCCIÓN

La paratuberculosis (PTBC), también conocida como enfermedad de Johne, es una enfermedad entérica, crónica, producida por *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis* (MAP) (Constable et al., 2016). Comúnmente afecta rumiantes domésticos (bovinos, ovinos, caprinos y búfalos) y silvestres (ciervos) (OIE, 2021). También se ha reportado en otras especies animales (equinos, cerdos, camélidos, conejos, zorros, comadrejas, etc.) (Greig et al., 1999; Beard et al., 2001; Roller et al., 2020). Debido al carácter crónico de la enfermedad, la mayoría de los casos cursa con una forma subclínica, y un reducido grupo de animales presenta cuadros clínicos de diarrea crónica, pérdida de peso, hipoproteinemia y muerte (Beth & Collins, 2010).

Presenta una distribución mundial, siendo descrita por primera vez por Johne y Frothingham en Alemania en 1895, quienes especularon acerca de la posibilidad de tratarse de una forma atípica de tuberculosis. El agente fue aislado por primera vez por Twort en 1910, denominando inicialmente de *Mycobacterium enteriditis chronicae pseudotuberculosis bovis johnes* (Beth & Collins, 2010). En el año de 1990 recibió su denominación taxonómica actual (Thorel et al., 1990).

Los establecimientos con bovinos lecheros son los más afectados, la prevalencia por animal en la población bovina europea se estimó en más del 20% y la prevalencia por rebaño en más del 50% (Nielsen & Toft, 2009). En EEUU se determinó la presencia de MAP en más del 95% de los rodeos lecheros con más de 500 vacas, y en el 63% de aquellos con menos de 100 vacas (USDA, 2008). Fernández-Silva et al. (2014) indicaron que la prevalencia en el Caribe y América Latina fue de 16,9% y 75,8% a nivel de animal y rodeo, respectivamente.

Las pérdidas económicas están asociadas con la reducción en la producción de leche, mayor incidencia de mastitis clínica, fertilidad reducida y mayor susceptibilidad a otras enfermedades (Beth & Collins, 2010; Fecteau, 2017). En EEUU las pérdidas anuales por vaca y por el efecto de la reducción de la producción de leche fueron estimadas en US\$21 a US\$79 y US\$200 millones, respectivamente (Losinger, 2005; Pillars et al., 2009). La pérdida de leche por vaca se ha estimado en 2,1 a 6 kg/día (Smith et al., 2009). Estudios realizados en Argentina estimaron una pérdida económica de US\$ 22 millones en la zona de cría de la Cuenca del Salado y de US\$ 6,3 millones para la cuenca lechera de la provincia de Buenos Aires (Traversa et al., 2005).

Además de las grandes pérdidas económicas, otro aspecto importante es la posible participación de MAP con la enfermedad de Crohn en los seres humanos, sugerida desde 1913. En estudios actuales consiguieron aislar MAP o identificar su ADN en pacientes con la enfermedad de Crohn (Naser et al., 2004; Romero et al., 2005; Zarei-Kordshouli et al., 2019). Aunque el vínculo de la zoonosis de MAP y enfermedad de Crohn ha sido controvertido, este tema sigue en discusión en la comunidad científica (Atreya et al., 2014; Liverani et al., 2014; Pal et al., 2015; Waddell et al., 2016; Agrawal et al., 2021; Dow & Alvarez, 2022).

1.1. Antecedentes en Uruguay

La PTBC fue diagnosticada por primera vez en Uruguay en 1944 por Cassamagnaghi & Cassamagnaghi (1947). Posteriormente MAP fue aislado de animales con sospecha clínica de PTBC provenientes de establecimientos lecheros (Errico & Bermúdez, 1983). Errico et al. (1990), realizaron un ensayo de control de la enfermedad en establecimientos lecheros, recomendando medidas de control basadas de un correcto diagnóstico, medidas de manejo e higiene.

Los primeros datos de seroprevalencia de la enfermedad en rebaños lecheros fueron obtenidos por Núñez (2006), con una seroprevalencia estimada proyectada a la población de 5,6% a nivel individual y un 70,2% a nivel predial (establecimientos con al menos un animal seropositivo). La seroprevalencia fue determinada a través del uso de un ELISA comercial (IDEXX, HerdChek Map). En el mismo estudio se evaluaron diferentes factores de riesgo y prácticas de manejo asociadas a la infección con MAP, mediante un modelo multivariable de regresión logística. Se encontró que el número de vacas en ordeño y el uso del área de parto para encerrar o tratar animales enfermos presentaba una tendencia ($p=0,08$) a estar asociada a la seroprevalencia. La distancia de la fuente del agua de bebida al estercolero presentó una asociación ($p=0,04$) con la seroprevalencia, cuanto más cerca mayor la seroprevalencia.

Suanes (2011) estudió tres estrategias diagnósticas para detectar rodeos infectados por MAP, que incluyeron cultivo a partir de muestras ambientales, cultivos a partir de pools fecales, y serología (ELISA). A través de cultivo de muestras ambientales obtuvo aislados de MAP a partir de los efluentes del tambo en 22,2% (2/9) de los establecimientos estudiados, 12,5% (1/8) presentaron muestras positivas en corral previo al ordeño (corral de espera) y 11,1% (1/9) en el potrero de parición. Con muestras de materia fecal realizó pools de 3, 6 y 9 muestras individuales por pool, presentando sensibilidad del rodeo de 11% (1/9), 22% (2/9) y 22% (2/9), respectivamente, para el cultivo individual tuvo una sensibilidad de rodeo de 44% (4/9). 451 muestras de suero sanguíneo fueron procesadas por ELISA (IDEXX, HerdChek Map), obteniendo una sensibilidad y especificidad de la técnica con respecto al cultivo individual de 16,7% y 97%, respectivamente.

El último dato de seroprevalencia en bovinos lecheros es del año 2015, estimando prevalencias individuales y prediales de 2,54% y 46%, respectivamente. Los tambos se estratificaron según la cantidad de vacas en <50 vacas, 50-250 vacas y >250 vacas, resultando en seroprevalencias de 1,58%, 1,54% y 3,14%, respectivamente. La seroprevalencia fue determinada por ELISA (ID Screen, ID Vet) (Núñez et al., 2018).

Si bien la seroprevalencia en este último trabajo fue menor que la identificada en el trabajo inicial, lo cual podría sugerir una disminución de la misma, no debe desestimarse que la diferencia se deba a diferencias en los kits de ELISA utilizados, que pueden presentar sensibilidad y especificidad distintas.

Además de la información en el país sobre la enfermedad en bovinos, su primer diagnóstico en ovinos fue en el año de 2016 por Giannitti et al., (2018). La estimación de prevalencia real (ELISA comercial para detección de anticuerpos anti-MAP) en una majada fue $\leq 2,3\%$, además de describir hallazgos clínico-patológicos, moleculares y bacteriológicos de PTBC causados por una cepa de MAP tipo S.

1.2. Agente

El género *Mycobacterium* comprende más de 100 especies diferentes (Chacon et al., 2004). Sus miembros se caracterizan por ser bacilos rectos o ligeramente curvados, Gram positivos, de tamaño variable (0,2-0,6 x 1,0-10,0 μm), inmóviles, aerobios y con una temperatura óptima de crecimiento entre 30-45°C (Levy-Frebault & Portaels, 1992).

Dentro de este género se encuentra el complejo *Mycobacterium avium* (MAC), un grupo heterogéneo de cuatro subespecies: *Mycobacterium avium* subesp. *avium*, *Mycobacterium avium* subesp. *silvaticum*, MAP y *Mycobacterium avium* subesp. *hominissuis*, que presentan características genéticas y fenotípicas particulares, se difieren en el tipo de enfermedad que provocan y su patogenicidad (Rindi & Garzelli, 2014; Imperiale et al., 2017).

MAP es un patógeno intracelular facultativo, ácido alcohol resistente, a pesar de ser considerado Gram positivo no se tiñe bien con la tinción de Gram, por su pared celular rica en lípidos, principalmente de ácidos micólicos, que lo torna resistente a soluciones de ácido-alcohol (Markey et al., 2013). Una de sus características es la dependencia de micobactina, sideróforo necesario para metabolizar el hierro. La mayoría de las micobacterias son capaces de sintetizar micobactina, pero MAP es incapaz (OIE, 2021).

A pesar de su incapacidad de producir micobactina, MAP puede sobrevivir en el ambiente por largos periodos. Estudios realizados por Whittington et al., (2004) mostraron su supervivencia en heces durante 55 semanas en lugares secos y sombreados y periodos más cortos en condiciones sin sombra. Para el agua, Whittington et al., (2005) encontraron supervivencia de hasta 48 semanas. Un resultado común a ambos estudios fue la detección de MAP seguida de su desaparición y luego detección nuevamente después de un período de tiempo, sugiriendo latencia. Fecteau et al., (2013) encontraron MAP en material vegetal y suelo, estando en mayor concentración en este último, en campos que se esparció estiércol. Además, varios estudios han demostrado su supervivencia a la pasteurización en leche (Clark et al., 2006; Grant et al., 2002; Paolicchi et al., 2012).

1.3. Enfermedad en los rumiantes

El periodo de incubación de PTBC es largo, pudiendo variar de dos a siete años, dependiendo de la edad inicial a la exposición y la dosis infectiva (Beth & Collins, 2010). Los terneros presentan mayor susceptibilidad a la infección por MAP, ocurriendo un aumento en la resistencia a la infección con el aumento de la edad, pudiendo ser explicada por la falta de experiencia inmunológica de terneros en comparación con bovinos adultos (Windsor & Whittington, 2010; Sweeney, 2011).

1.3.1. Transmisión

El principal modo de transmisión es fecal-oral (Beth & Collins, 2010). El MAP es eliminado por las heces, contaminando el ambiente y es ingerido por animales susceptibles. También puede ocurrir la ingestión de materia fecal presente en la ubre de vacas infectadas, o por calostro y leche contaminados (Sweeney et al., 1992; Committee on Diagnosis and Control of Johne's Disease, 2003).

Otra vía de infección es la intrauterina, en un estudio de metaanálisis se sugirió que 9% de los terneros nacidos de vacas subclínicamente infectadas y 39% de los terneros nacidos de vacas con enfermedad clínica se infectan en el útero (Whittington & Windsor, 2009).

1.3.2. Patogenia

Una vez que los animales se exponen al MAP, en el intestino es internalizado por las células M presentes en las placas de Peyer (Bermudez et al., 2010). Las placas de Peyer están presentes en los terneros en una larga extensión del intestino, aunque van involucionando a medida que avanza la edad, pudiendo ser este uno de los motivos por los que los animales más jóvenes serían más susceptibles a la infección (Momotani et al., 1988). Aunque las células M parecen ser el tipo celular predilecto para invadir la pared intestinal, el MAP puede penetrar la mucosa a través de los enterocitos (Sigurðardóttir et al., 2005; Bermudez et al., 2010).

Una vez que los microorganismos son internalizados por las células son translocados desde la luz intestinal a la lámina propia y/o submucosa, donde son capturados por macrófagos o células dendríticas. Tras la entrada en estos fagocitos, la eliminación inicial puede ocurrir debido a maduración del fagosoma, mediante la fusión fagosoma-lisosoma, lo que resultaría en destrucción bacteriana y presentación de antígenos a las células T. Sin embargo, MAP es capaz de inhibir la maduración del fagosoma y, de esta forma, limitar su destrucción y presentación antigénica a linfocitos T (Russell et al., 2002; Arsenault et al., 2014). La destrucción de MAP por macrófagos es fundamental para la etapa inicial de defensa contra el establecimiento de una infección (Sweeney, 2011).

Con el tiempo la infección comienza a imponerse, la inmunidad mediada por células empieza a disminuir y la infección progresa más rápido. Frecuentemente, juntamente está asociada a una transición de respuesta de tipo Th1 (celular) a una respuesta Th2 (humoral). La respuesta Th1 está caracterizada por expresión de interferón gamma (IFN- γ) y producción de inmunoglobulinas IgG2, que promueve lisis de micobacterias. Por otro lado, la respuesta Th2 produce inmunoglobulinas IgG1 específicas contra MAP, promovida por la liberación de IL-4 y IL-10 por parte de los linfocitos T CD4+ (Stabel, 2000; Beth & Collins, 2010; Sweeney, 2011).

Aunque la infección puede controlarse en las primeras etapas de la infección, la presencia de antígenos de MAP dentro de la submucosa intestinal provoca una respuesta inflamatoria, debido al esfuerzo del huésped para contener la infección. Más macrófagos y linfocitos son atraídos hacia el área y ocurre la formación de lesiones granulomatosas con células gigantes

multinucleadas, células epitelioides, linfocitos y macrófagos. A medida que la infección progresa las lesiones se vuelven más graves (González et al., 2005; Sweeney, 2011).

1.3.3. Signos clínicos y fase de infección

El cuadro clínico de PTBC se caracteriza por diarrea intermitente que evoluciona hacia una emaciación progresiva que conduce a la muerte del animal. El signo más característico y evidente es la pérdida progresiva de condición corporal (Chiodini et al. 1984). La PTBC puede ser dividida en cuatro fases, dependiendo de los signos clínicos, la eliminación de la bacteria por la materia fecal y la facilidad con la que puede detectarse la enfermedad mediante técnicas de diagnóstico en laboratorios.

- **Fase I o infección silenciosa:** Suele tener una duración mínima de dos años, pudiendo llegar hasta los siete años, durante los cuales los animales no presentan signos clínicos. En esta fase los animales no tienen anticuerpos séricos detectables de MAP y pueden eliminar MAP en las heces, pero a un nivel menor que los niveles de detección de los métodos de diagnóstico, como el cultivo y PCR. En el examen post-mortem, es posible que no se observe bacilos de MAP mediante microscopía (histopatología), pero pueden ser detectados por cultivo de muestras intestinales seriadas (Clarke, 1997; Stabel et al. 2009; Sweeney et al. 2006).
- **Fase II o infección subclínica:** Los animales, aunque no demuestren signos clínicos, pueden manifestar reducción en la producción de leche y de la eficiencia reproductiva (Lombard et al. 2005). Además, pueden presentar una respuesta inmune alterada, con aumento de la producción de IFN- γ por parte de las células T sensibilizadas y/o aumento de la respuesta de tipo humoral (Bassey & Collins, 1997). La eliminación de MAP en las heces puede ocurrir en cargas posibles de detectar por cultivo, en general 15-25% de los animales presentan cultivo positivo (Bassey & Collins, 1997; Constable et al. 2016; Lombard et al. 2005).
- **Fase III o infección clínica:** Los animales presentan pérdida de peso gradual y diarrea intermitente, el apetito permanece normal (Constable et al. 2016). También ocurre el engrosamiento de la mucosa intestinal debido a la infiltración de macrófagos y células gigantes multinucleadas conteniendo MAP, y linfocitos reactivos. Los animales eliminan altas concentraciones de MAP, siendo positivos por cultivo fecal y, en la mayoría se pueden detectar anticuerpos séricos mediante ELISA y/o inmunodifusión en gel de agar (Sweeney, 2011; Constable et al., 2016; Fecteau, 2017).
- **Fase IV o infección clínica avanzada:** Los animales están débiles, caquéticos y, generalmente, presentan diarrea crónica y profusa. El edema subcutáneo en la región intermandibular, secundario a hipoproteinemia, es un signo típico de esta fase. Hay eliminación de altas cargas de MAP en las heces y los animales tienen una respuesta alta de anticuerpos detectables por ELISA (Fecteau, 2017).

1.4. Diagnóstico

El diagnóstico de PTBC es complejo debido a su largo periodo de incubación (tiempo transcurrido desde la infección hasta la aparición de los primeros signos clínicos). Además, las pruebas de detección no suelen presentar una alta sensibilidad y/o especificidad. Hay varias pruebas de diagnóstico disponibles, cada una tiene sus ventajas y aplicaciones, que permiten ya sea la detección de la respuesta inmunitaria del animal y/o la detección del agente causal (Fecteau, 2017; OIE, 2021).

1.4.1. Detección del agente

1.4.1.1. Examen patológico (autopsia, histología)

Las lesiones son observadas en intestino, desde el duodeno hasta el recto, siendo la válvula ileocecal el local más frecuente. Se puede observar engrosamiento de la mucosa intestinal, decurrente del acumulo de macrófagos y liquido edematoso en mucosa y submucosa, además de linfangiectasia y linfadenopatía. La ocurrencia de lesiones en otros locales es menos frecuente, pero en casos crónicos puede ocurrir lesiones de fibrosis y mineralización en la íntima de la aorta. A través de la histopatología, utilizando la tinción de Ziehl-Neelsen (ZN) juntamente con la hematoxilina-eosina, es posible la visualización de bacilos ácido-alcohol resistentes en el citoplasma de macrófagos y células gigantes (Committee on Diagnosis and Control of Johne's Disease, 2003; Uzual et al., 2015; Constable et al., 2017).

Esta técnica permite detectar animales en fase clínica, así como en fase subclínica que presenten lesiones, haciéndose necesario el examen histopatológico de distintos segmentos intestinales y ganglios. Este método de diagnóstico presenta fácil ejecución y bajo costo, pero es un diagnóstico post mortem, aunque se ha propuesto la posibilidad de realizar de biopsia en animales vivos, es una técnica invasiva y de elevado costo económico (Benedictus & Bosma, 1985; Committee on Diagnosis and Control of Johne's Disease, 2003).

1.4.1.2. Tinción directa

Este método es utilizado para la identificación de MAP basado en el empleo de la tinción de ZN sobre un frotis a partir de heces o impronta de mucosa intestinal. Es un método simple, rápido y económico, pero de baja sensibilidad y especificidad. El éxito de esta técnica depende del número bacterias presentes, obteniendo buenos resultados en casos de enfermedad clínica y en improntas de intestinos con lesiones típicas de PTBC. Sin embargo, la presencia de bacilos ácido-alcohol resistente no es específico de MAP, siendo esta una desventaja de esta prueba (Gilardoni et al., 2012; Constable et al., 2016; OIE, 2021).

1.4.1.3. Cultivo

El aislamiento mediante cultivo bacteriológico de MAP es considerada la prueba de diagnóstico de referencia. La detección por cultivo en heces presenta una especificidad de 98% pero en animales clínicamente sanos la sensibilidad puede ser 30% (Nielsen et al., 2002; Beth & Collins, 2010). Permite detectar animales en estado avanzado de la

enfermedad, pero pocos en fases iniciales. La desventaja es el lento crecimiento de MAP, pudiendo tardar 8-16 semanas o más en muchos casos (Committee on Diagnosis and Control of Johne's Disease, 2003; Nielsen & Toft, 2008; OIE, 2021).

Los medios utilizados pueden ser sólidos, como el medio de Herrold con yema de huevo (HEYM), Middlebrook 7H10 y el Löwenstein-Jensen (LJ), o líquidos como Middlebrook 7H9. Se utilizan tubos de medio con y sin micobactina, para cada muestra, para evaluar la dependencia de micobactina asociada con MAP. Se puede utilizar una prueba de confirmación de base molecular, como la PCR, para confirmar las muestras positivas (Nielsen & Toft, 2008; Gilardoni et al., 2012).

1.4.1.4. Técnicas moleculares

La detección por técnicas moleculares, basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), disminuyen el tiempo necesario para detectar MAP, permitiendo procesar grandes cantidades de muestras en un corto periodo de tiempo (Rodríguez-Lázaro et al., 2005). Esta técnica puede ser utilizada para distintos tipos de muestras, como en heces, leche, tejidos, sangre y muestras ambientales, además de permitir detectar el agente cuando el mismo no se encuentra viable (OIE, 2021).

Generalmente, la PCR tiene como objetivo la amplificación de la secuencia de inserción IS900, distribuida en un total de 12 a 18 copias en el genoma de MAP (Slana et al., 2008a). Aunque, se ha descrito elementos similares a IS900 en otras micobacterias, lo que podría afectar negativamente la especificidad de las PCR que utilizan la IS900 (Cousins et al., 1999). Se ha identificado nuevas secuencias que se consideran exclusivas de MAP, como ISMav2, F57, ISMap02 y IS1311, esta última utilizada para tipificar las cepas ovinas, bovinas y de bisontes (Committee on Diagnosis and Control of Johne's Disease, 2003; Sevilla et al., 2005; Gilardoni et al., 2012). Dado que estos se presentan es una sola copia en el genoma, la sensibilidad diagnóstica puede ser menor en relación a otras secuencias con mayor número de copias, como el IS900 (Slana et al., 2008a).

Existen variantes de la PCR, como la PCR anidada, la PCR multiplex y la PCR en tiempo real (qPCR). La qPCR es más rápida que las demás, permitiendo la cuantificación del agente. En comparación con el cultivo, presenta sensibilidad y especificidad de 0,60 y 0,97, respectivamente (Alinovi et al., 2009). A pesar de las ventajas de utilizar las técnicas moleculares, esta es un método con costo más alto y que posee la posibilidad de falsos negativos por presencia de inhibidores (Mackay, 2004; Slana et al., 2008a; Gilardoni et al., 2012). Por esto, si hace necesario contar con un método de extracción de ADN confiable, que aumente la recuperación del ADN de MAP y al mismo tiempo disminuya los inhibidores de la PCR (Park et al., 2014)

1.4.2. Diagnóstico Inmunológico

1.4.2.1. Respuesta inmune mediada por células

La primera respuesta inmune después de la entrada de MAP está mediada por células (linfocitos T). Los animales que se encuentran subclínicamente infectados, normalmente, no reaccionan a las pruebas serológicas, siendo necesarios pruebas que midan la inmunidad mediada por células. Las pruebas diagnósticas son la reacción intradérmica (in vivo) y la detección de producción de IFN- γ (in vitro) (Fecteau, 2017; OIE, 2021).

1.4.2.1.1. Intradermorreacción

Es una prueba que evalúa la reacción de hipersensibilidad retardada que se produce tras la inoculación intradérmica de un antígeno (PPD aviar y johnina), midiendo el grosor de la piel antes de la inoculación y 72 h después. Se considera positivo un aumento del grosor de la piel superior a 2 mm o 3 mm (Committee on Diagnosis and Control of Johne's Disease, 2003; Gilardoni et al., 2012; OIE, 2021). En un estudio realizado por Alvarado Pinedo (2015) se determinó una sensibilidad de 69% y una especificidad de 86,2%.

1.4.2.1.2. Prueba de detección del IFN- γ

Esta prueba evalúa la liberación de IFN- γ por parte de linfocitos T después de la estimulación con antígeno específico (PPD aviar, PPD bovina o johnina). La detección cuantitativa del IFN- γ se realiza a través de un ELISA de tipo sándwich, en el que se utilizan dos anticuerpos monoclonales para el IFN- γ bovino. Durante las primeras etapas de la enfermedad hay secreción significativa de IFN- γ , siendo una herramienta atractiva para detectar animales en etapas subclínicas. La sensibilidad de esta técnica varía de 13 a 85%, dependiendo de los criterios de interpretación, y la especificidad de 67 a 94% (Committee on Diagnosis and Control of Johne's Disease, 2003; Kalis, 2003; Nielsen & Toft, 2008; Gilardoni et al., 2012; OIE, 2021).

1.4.2.2. Pruebas serológicas

En las últimas etapas de la enfermedad los animales muestran una alta concentración de anticuerpos específicos para MAP y en estas etapas pueden identificarse animales expuestos/infectados usando pruebas que se basan en la detección de anticuerpos (Fecteau, 2017; OIE, 2021).

1.4.2.2.1. Prueba de fijación del complemento (FC)

Esta prueba ha sido ampliamente utilizada en el pasado como estándar para el diagnóstico de PTBC. Está indicada para detectar animales altamente infectados, siendo su uso una herramienta para el control poblacional limitado (OIE, 2021).

1.4.2.2.2. Inmunodifusión en gel de agarosa (IDGA)

Esta prueba consiste en la confrontación en un gel de agarosa entre suero y antígeno de MAP, si el suero contiene anticuerpos específicos frente a MAP, se produce una

precipitación visible de los complejos antígeno-anticuerpo. Es un método simple, rápido, pero tiene baja sensibilidad en las primeras etapas de la enfermedad, siendo su sensibilidad en casos clínicos avanzados de 90 - 95%, pero en casos subclínicos de 18,9 - 30% (Committee on Diagnosis and Control of Johne's Disease, 2003; Gilardoni et al., 2012).

1.4.2.2.3. Ensayo inmunoenzimático (ELISA)

La técnica de ELISA es la prueba más utilizada para el diagnóstico serológico de PTBC, siendo la más sensible y específica para la detección de anticuerpos séricos contra MAP. Se puede utilizar suero sanguíneo o leche para esta prueba, y presenta mayor sensibilidad en comparación con las técnicas de FC y IDGA en cuanto a la detección de animales subclínicamente infectados. Detecta, aproximadamente, el 30 – 40% del ganado bovino identificado como infectado por el cultivo de heces. En bovinos, la sensibilidad está entre el 7 y el 94%, y la especificidad, entre el 40 y el 100% (Gilardoni et al., 2012; S. S. Nielsen & Toft, 2008; OIE, 2021).

Presenta como ventajas la fácil automatización, la repetibilidad, la interpretación objetiva de los resultados y la posibilidad de evaluar muchas muestras juntas. Además, tiene buena sensibilidad y especificidad en etapas clínicas y es relativamente económica comparada a otras técnicas, siendo un buen método para evaluar la prevalencia de PTBC en el rebaño (Gilardoni et al., 2012).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La producción de leche bovina tiene un importante papel social y económico en Uruguay. En 2020 se destinaron a esta actividad 757 miles de hectáreas (~5% del territorio nacional) y la producción alcanzó los 2,205 millones de litros de leche. Las exportaciones uruguayas de lácteos en este año fueron de US\$ 643 millones, representando el 9,4% del total de exportaciones de productos agropecuarios (DIEA, 2021).

El control de la PTBC bovina ha sido difícil en parte por la poca sensibilidad de las pruebas diagnósticas, la elevada persistencia de la bacteria en el ambiente, las dificultades en cuanto a la utilización de vacunas y, por supuesto, el carácter crónico y prolongado de la infección (García & Shalloo, 2015). En virtud de la dificultad diagnóstica sería importante contar a nivel local con herramientas moleculares que permitan cuantificar MAP en heces, ambiente y tanque de leche, como se dispone en otros países.

3. HIPÓTESIS

La técnica de qPCR tendrá un mejor desempeño para la detección de MAP que la PCR y la coloración de ZN en bovinos lecheros de tambos con casos clínicos y sin casos clínicos de PTBC.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar el uso de qPCR para la detección de MAP en dos tambos bovinos del departamento de Colonia con situaciones contrastantes respecto de la ocurrencia de casos clínicos de PTBC.

4.2. Objetivos específicos

1. Aplicar una metodología de qPCR para la detección y cuantificación de MAP en materia fecal en dos tambos, uno sin signos clínicos y otro con signos clínicos.
2. Determinar la concordancia entre qPCR, PCR y coloración de ZN, y establecer un punto de corte de qPCR que permita predecir los resultados cualitativos de las pruebas de PCR y coloración de ZN.
3. Aplicar la qPCR para la detección y cuantificación de MAP en muestras de leche y muestras ambientales.

5. ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN

La estrategia de investigación consistió en determinar la seroprevalencia de PTBC y detección/cuantificación de MAP en dos establecimientos lecheros (Figura 1). Para la detección/cuantificación se utilizaron las técnicas de PCR y qPCR.

Para evaluar la eliminación intermitente de MAP, fecal y en la leche, se realizó un estudio longitudinal durante un periodo de dos meses en uno de los establecimientos. Para esto, se tomaron muestras de animales seropositivos para detección/cuantificación. En el caso de la materia fecal se comparó el desempeño de tres técnicas: coloración de ZN, PCR y qPCR. Adicionalmente, se realizaron muestreos ambientales y del tanque de leche, buscando detectar/cuantificar MAP en este tipo de muestra. Con los resultados se pudo determinar la concordancia entre las pruebas y se estableció, para la materia fecal, un punto de corte de la qPCR para predecir los resultados de PCR y ZN.

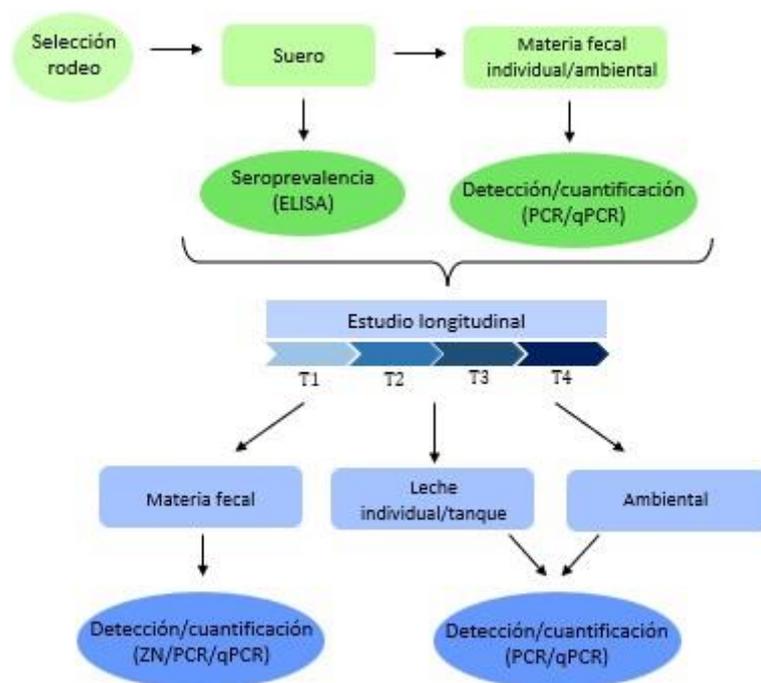


Figura 1: Esquema de la estrategia de investigación utilizada. T: tiempo.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Establecimientos lecheros

Los muestreos se realizaron por conveniencia en dos establecimientos lecheros que habían enviado muestras para la detección de MAP a la Plataforma de Investigación en Salud Animal de INIA. Ambos establecimientos están ubicados en el departamento de Colonia, Uruguay. El primer establecimiento (1) estuvo conformado por un rodeo de 483 bovinos (de todas las categorías) de la raza Holstein, con 267 vacas en lactación y con ocho animales seropositivos por ELISA para IgG anti-MAP en el año 2016, pero sin antecedentes de enfermedad clínica. Por otra parte, el segundo establecimiento (2) poseía 2000 bovinos de raza Holstein, con 800 vacas en lactación, y antecedentes de enfermedad clínica (diarrea crónica y pérdida de peso), con diagnóstico confirmado de PTBC por PCR y ELISA en los años 2018 y 2019.

6.2. Seroprevalencia de paratuberculosis

Se realizaron dos muestreos de suero sanguíneo en ambos establecimientos en el rodeo de bovinos adultos. Para el establecimiento 1, el primer muestreo fue en noviembre de 2019 con un total de 399 vacas muestreadas. El segundo muestreo fue en noviembre de 2020 y se realizó en 351 vacas.

Para el establecimiento 2, el primer muestreo fue en febrero de 2020 y fueron muestreadas 803 vacas. El segundo muestreo fue en octubre del mismo año, con un total de 667 vacas.

Todas las muestras de sangre fueron obtenidas por punción de la vena coccígea utilizando una aguja estéril y jeringa descartable por animal. La sangre fue colectada en tubos de 10 ml sin anticoagulante, identificadas para cada animal y llevadas al laboratorio de la Plataforma de Investigación en Salud Animal de INIA La Estanzuela para obtención de suero. Las muestras fueron analizadas utilizando la técnica de ELISA (ver sección 6.5.1 para más detalles).

6.3. Detección de MAP

Para detección de MAP en el establecimiento 1 se realizó un muestreo individual de materia fecal en noviembre de 2019, con un total de 399 vacas. Además, se realizaron dos muestreos ambientales, el primero en diciembre de 2019 y el segundo en febrero de 2020, para ambos se tomaron muestras de suelo de cuatro potreros pastoreados por vacas en ordeño, un potrero de parto y pool de material fecal obtenidos del piso de la sala pre-ordeño (PMFA), totalizando 12 muestras.

Por otro lado, en el establecimiento 2, se tomaron muestras de materia fecal individual en julio de 2020, para este momento fueron seleccionadas vacas seropositivas por ELISA, totalizando 25. También se realizaron dos muestreos ambientales, el primero en febrero de 2020, compuesto por muestras de suelo de tres potreros donde se esparcían los efluentes (materia fecal lavada de la sala de ordeño que se recolectaba en un estercolero) del propio tambo como fertilizante. El segundo muestreo fue en julio de 2020, siendo muestreado el estercolero y el camino a la sala pre-ordeño.

Cada muestra ambiental estuvo constituida por un pool de ocho muestras de sitios diferentes de la misma área. La materia fecal de los animales fue colectada con bolsas de nylon desde la ampolla rectal, las cuales fueron identificadas con la caravana del animal correspondiente. Las muestras fueron transportadas en conservadora con refrigerantes y llevadas al laboratorio de la Plataforma de Investigación en Salud Animal de INIA La Estanzuela, donde fueron fraccionadas en microtubos de 1,5 ml, rotuladas y congeladas a -20°C. La detección y cuantificación de MAP fue realizada utilizando las técnicas de PCR y qPCR en paralelo para cada muestra. Además, se realizó el cultivo (ver sección 6.5.5 para más detalles) de siete muestras de materia fecal positivas por PCR del establecimiento 2.

6.4. Estudio longitudinal

Para esta etapa fue usado solamente el establecimiento 2, siendo acompañados los animales positivos por ELISA. Se realizaron cuatro muestreos en cuatro tiempos diferentes (T1, T2, T3 y T4) entre mayo y junio de 2021, con intervalos de 15 días. Este procedimiento fue realizado durante el ordeño y se tomaron muestras de materia fecal y leche de forma individual (Tabla 1). A los animales que no se encontraban en etapa de lactancia no se les extrajo muestra de leche.

En cada tiempo de muestreo se obtuvieron muestras ambientales (PMFA). Además, se colectaron aproximadamente 50 ml de leche desde el tanque de leche y leche de descarte destinada a la alimentación de los terneros. Se colectaron muestras de estercolera, camino a sala de pre-ordeño y suelos de potreros donde se había esparcido estiércol, siguiendo para estos muestreos y de PMFA el mismo protocolo indicado en la sección 6.3.

Las muestras de leche fueron obtenidas después de la limpieza de los pezones con agua, los tres primeros chorros de leche fueron descartados seguido de la colecta de aproximadamente 50 ml de leche en pool de los cuatro cuartos mamarios en frascos e identificados con la caravana del animal. Las muestras fueron almacenadas en frío y llevadas al laboratorio de la Plataforma de Investigación en Salud Animal de INIA La Estanzuela.

Tabla 1. Muestras obtenidas en los cuatro tiempos de muestreo (T1, T2, T3 y T4) en el establecimiento 2.

Muestra/Tiempo	T1	T2	T3	T4
Heces	12	14	13	13
Leche	11	13	13	13
PMFA	1	1	1	1
Estercolera	ND	1	ND	ND
Camino	ND	1	1	ND
Potrero	ND	ND	ND	2
Tanque de leche	1	1	1	1
Leche de descarte	1	1	1	1

ND: No disponible para análisis. PMFA: Pool de materia fecal obtenido del piso de la sala de pre-ordeño.

La detección y cuantificación de MAP en muestras ambientales, de heces y leche fue realizada utilizando las técnicas de PCR y qPCR; para las muestras de heces también se realizó la tinción de ZN (ver sección 6.5.6).

6.5. Procesamiento de muestras en el laboratorio

6.5.1. ELISA

Todas las muestras de sangre fueron centrifugadas, se separó el suero del coágulo y fue trasvasado a microtubos de 1,5 ml identificados que se congelaron a -20°C hasta su procesamiento. Las muestras fueron analizadas mediante un kit comercial de ELISA (Parachek 2, Prionics, Suiza) que detecta anticuerpos IgG contra MAP siguiendo las recomendaciones del fabricante (Anexo I). Se utilizó un espectrofotómetro (Multiskan™ FC Microplate Photometer, Thermo Fisher Scientific) para la lectura de la densidad óptica (DO) de cada pocillo de las microplacas, con filtro de 450 nm, y 620 nm como longitud de onda de referencia. Para obtener los resultados, se leyeron las DO de los controles positivos y negativos y se aplicaron las fórmulas recomendadas por el fabricante. Para ser considerado válido el ensayo el valor de DO corregido del control positivo debe ser mayor o igual a 0,5 y relación del valor medio de DO corregido del control positivo respecto al valor del control

negativo debe ser mayor o igual a 5. El cálculo del porcentaje de positividad (PP) de la muestra se realizó de la siguiente manera:

$$PP = (\text{DO de la muestra} - \text{DO del control negativo}) / (\text{DO del control positivo} - \text{DO del control negativo}) \times 100.$$

Una muestra se consideró positiva cuando el valor de PP fue mayor o igual a 15%.

6.5.2. Extracción de ADN de heces, suelo y leche

Las muestras de heces y suelo se descongelaron a temperatura ambiente. La extracción de ADN se realizó con el kit comercial *Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep* (Zymo Research), siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo II). Para la agitación de las muestras mencionadas en la sección 6.3 se utilizó un vórtex por 20 minutos, y para aquellas listadas en la sección 6.4 se realizó con Bioprep-6 Homogenizer con dos ciclos a 6 m/s durante 40 segundos.

Para las muestras de leche se realizó un pre-procesamiento de la muestra según Hanifian et al., (2013) y luego se utilizó el kit comercial Quick DNA/RNA Pathogen Miniprep (Zymo Research). Para ello, 40 ml de la muestra de leche fueron transferidos a un tubo de fondo cónico, centrifugados a 4.000 g por 30 minutos a 4°C. Posteriormente se descartó el sobrenadante, reteniendo el pellet, que fue suspendido en 10 ml de PBS y 0,05% de Tween 20 y sometido a agitación (vórtex), seguida por una centrifugación a 15.000 g por 15 minutos a 4°C, descartándose el sobrenadante. Para los demás pasos se siguieron las instrucciones del fabricante del kit (Anexo III).

Todas las extracciones de ADN realizadas en este trabajo fueron cuantificadas con NanoDrop (ThermoFischer) y se registró la concentración de ADN (ng/μL), y la relación de absorbancia a 260/280 nm y 260/230 nm.

6.5.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la detección de MAP se amplificó la secuencia de inserción IS900 utilizando los cebadores DirC (5'- GATCGGAACGTCGGCTGGTCAGG-3') y RevC (5'- GATCGCCTTGCTCATCGCTGCCG-3') (Collins et al. 1993). Se utilizó 2 μL de ADN en una reacción de 25 μL que contenía 0,8 mM de dNTP, 1X de tampón de reacción, 3mM MgCl₂, 0,2 μM de cada cebador, 1% de albúmina sérica bovina y 1,25 U de ADN polimerasa Taq (Invitrogen). La amplificación se realizó en un termociclador Applied Biosystems ProFlex PCR System (Thermo Fisher Scientific) utilizando las siguientes condiciones de ciclo: una desnaturalización inicial durante 5 minutos a 95°C seguida de 30 ciclos de desnaturalización durante 1 minuto a 95°C, hibridación durante 1 minuto a 65°C, extensión durante 1 minuto a 72°C, seguidos de una extensión final de 1 minuto a 72°C. Los productos amplificados se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, se tiñeron con Good View™ y se visualizaron en un fotodocumentador Gel Doc™ EZ Imager (Bio-Rad). El tamaño del fragmento esperado (217 pb), se determinó comparando con un marcador de peso molecular (HyperLadder 100 pb, Biorline, UK).

6.5.4. PCR en tiempo real cuantitativa (qPCR)

La PCR en tiempo real se llevó a cabo siguiendo un protocolo descrito previamente por Slana et al. (2008a). Los cebadores (IS900qPCRf: 5'- GATGGCCGAAGGAGATTG-3'; IS900qPCRr: 5'- CACAACCACCTCCGTAACC-3') y sonda (IS900qPCRTM: 6FAM-ATTGGATCGCTGTGTAAGGACACGT-BHQ) tienen como blanco la secuencia de inserción IS900 y el tamaño del amplicón es de 145 pb. Se realizó en un volumen final de 20 µl que contenía: 2 µL de ADN, 1X de SensiFAST Probe No-ROX (Bioline, UK), 0,5 µM de cada cebador, 0,1 µM de sonda. Fue utilizado el termociclador Applied Biosystems QuantStudio 5 Real-Time PCR System con las siguientes condiciones de ciclado: desnaturalización a 95°C por 5 minutos, luego 40 ciclos a 95°C por 15 segundos y 60°C por 30 segundos. Los resultados se interpretaron usando el software QuantStudio™ Design and Analysis.

Para el establecimiento 1 (sin casos clínicos), se confirmaron los resultados positivos utilizando un protocolo que amplifica una región del gen F57 de copia única y específica para MAP. Los cebadores (F57qPCRf: 5'-GCCCATTTTCATCGATACCC-3'; F57qPCRr: 5'-GTACCGAATGTTGTTGTCAC-3') y sonda (F57qPCRTM: 6FAM-CAATTCTCAGCTGCAACTCGAACACAC-BHQ) fueron descritos por Slana et al., (2008a), siendo el tamaño del amplicón de 147 pb. Se utilizaron las mismas condiciones de reacción y ciclado que para la secuencia de inserción IS900. Además, se utilizó un control de extracción/inhibición (Wernike et al., 2011) en 10% de las muestras. El tamaño del amplicón es de 95pb, se realizó en un volumen final de 20 µl que contenía: 2 µL de ADN, 1X de SensiFAST Probe No-ROX (Bioline, UK), 0,25 µM de cada cebador, 0,125 µM de sonda. Fue utilizado el termociclador Applied Biosystems QuantStudio 5 Real-Time PCR System con las condiciones de ciclado: desnaturalización a 95°C por 5 minutos, luego 40 ciclos a 95°C por 15 segundos y 60°C por 30 segundos.

Para el análisis cuantitativo utilizó el protocolo de la secuencia de inserción IS900, el *Ct* de cada muestra se comparó con el *Ct* de curvas estándar construidas con seis diluciones seriadas a partir del ADN de un cultivo puro de MAP. Teniendo en cuenta la concentración y el tamaño del genoma de 4,8 Mb (Li et al. 2005) se calculó el número de copias en las curvas estándar. La eficiencia y el coeficiente de correlación (R^2) tuvieron un promedio de 91,2% y 0,992, respectivamente. El rango dinámico utilizado fue de 92,8 copias/µL a $2,9 \times 10^5$ copias/µL. El número de copias de las muestras positivas fue cuantificado utilizando como referencia la curva estándar obtenida. Las muestras en las que se detectó MAP con un número de copias por debajo del límite inferior del rango se consideraron positivas, pero no se cuantificaron.

6.5.5. Cultivo

Las muestras de heces fueron sometidas a un proceso de descontaminación, conforme lo descrito por Stabel (1997) y OIE (2021). Dos gramos de heces fueron colados en 30 ml de agua estéril en un tubo cónico de 50 ml, se agitaron y se dejaron reposar por 30 minutos a

temperatura ambiente, para su sedimentación. Cinco mililitros del sobrenadante fueron transferidos a otro tubo conteniendo 25 mL de solución de cloruro de hexadecilpiridinio (0,9%) y se incubaron a 37°C durante la noche. Luego de este proceso, se inocularon 0,25 ml en medio Herrold con yema de huevo y micobactina (HEYM) y medio Herrold con yema de huevo sin micobactina (HEY) (Becton Dickson and Co. – USA), ambos medios contienen 0,05 g de cada uno de los siguientes antibióticos: anfotericina B, ácido nalidíxico y vancomicina. Los tubos fueron incubados a 37°C durante 16 semanas, siendo revisados a cada 15 días.

Cuando se evidenciaron colonias características de MAP se procedió a la realización de la tinción de ZN y prueba de PCR a partir de las mismas.

6.5.6. Tinción de Ziehl-Neelsen

Para las muestras de heces del estudio longitudinal y colonia sospechosa de MAP en los cultivos se realizó un frotis en portaobjeto que fueron teñidos con coloración de ZN (Carson & Cappellano, 2015), conforme el descrito en el Anexo IV. Los frotis se observaron en microscopio óptico con objetivo de 100X y ocular de 10X (1000 aumentos en total) con aceite de inmersión.

6.6. Análisis estadísticos

6.6.1. Análisis descriptivo

El análisis de estadística descriptiva para determinar las frecuencias de los diagnósticos fue realizado en Excel 2016 (Microsoft Office®). Se calculó una prevalencia real según lo descrito por Dohoo et al. (2003), basada en la sensibilidad (59,7%) y especificidad (99,0%) del ELISA (Collins et al., 1991). La ecuación es:

$$P = \frac{AP+Sp-1}{Se+Sp-1}$$

Donde:

P es la prevalencia real;

AP es la prevalencia aparente;

Sp es la especificidad;

Se es la sensibilidad.

6.6.2. Prueba de concordancia

Para evaluar la concordancia corregida por azar entre pruebas (qPCR, PCR y ZN) estimamos el coeficiente kappa de Cohen y su intervalo de confianza del 95% (IC95%) y probamos la hipótesis nula de que el grado de concordancia es el mismo que el aleatorio

(kappa=0), usando el software R versión 4.1.2 con el paquete *fsmb*. Se realizó la concordancia entre las técnicas de qPCR vs PCR, qPCR vs ZN y PCR vs ZN con los resultados obtenidos del establecimiento 2. La interpretación del coeficiente kappa de Cohen se realizó según el siguiente rango: 0-0,20= falta de concordancia; 0,21-0,39= concordancia mínima; 0,40-0,59= concordancia débil; 0,60-0,79= concordancia moderada; 0,80-0,90= concordancia fuerte; y >0,9 concordancia casi perfecta (McHugh, 2012).

6.6.3. Análisis de características operativas del receptor (ROC)

Se realizó el análisis estadístico empleando el software R versión 4.1.2, según los resultados obtenidos del qPCR (número de copias/ μ L), PCR y ZN, generando un análisis de la curva ROC con el área bajo la curva (AUC), utilizando el paquete *pROC*. La variable continua en estudio fue el número de copias/ μ L (qPCR), y las variables dicotómicas utilizadas fueron los resultados de la PCR y examen de frotis coloreados con ZN. Los valores positivos se consideraron casos (1) y los negativos controles (0). Se trabajó sobre los resultados del establecimiento 2, el número de copias/ μ L utilizados fueron los valores que estaban dentro del rango dinámico (92,8 copias/ μ L a $2,9 \times 10^5$ copias/ μ L). Se calculó el punto de corte óptimo para distinguir resultados positivos y negativos de las pruebas de PCR y examen de frotis coloreados con ZN, mediante la maximización del índice de Youden (sensibilidad diagnóstica + especificidad diagnóstica - 1) (Fluss et al., 2005). La significancia estadística se estableció como $p < 0,05$.

6.6.4. Regresión lineal

Se realizó el análisis estadístico empleando el software R versión 4.1.2, utilizando los paquetes *epiR*, *lmtree* y *sandwich*. Se utilizó un modelo lineal, usando como la variable dependiente las copias/ μ L en función de las variables tipo de muestras; heces, leche, suelo y ambientales (PMFA, estercolera y camino) como variables independientes. La variable dependiente fue normalizada utilizando función logarítmica. Para este análisis se utilizaron los datos del establecimiento 2. Se aplicó test de Tukey y se estableció un valor de significancia de $p < 0,05$. Entonces, la ecuación está dada por:

$$Y_i = \alpha + \beta x_i$$

Donde:

Y_i es la variable dependiente (valor predicho) dado un predictor x_i ;

x_i es la variable predictora independiente;

α es el valor predicho de Y cuando $x = 0$ (el intercepto); y

β indica cuánto cambia Y, en promedio, por unidad de cambio en x (pendiente).

7. RESULTADOS

7.1. Seroprevalencia de PTBC

Para el establecimiento 1, en el primer muestreo 2/399 (0,5%) vacas presentaron un resultado positivo para anticuerpos anti-MAP por ELISA (prevalencia aparente), lo que en función de la sensibilidad y especificidad de esta prueba se traduce en una seroprevalencia real de 0%. Los dos animales positivos fueron eliminados del rodeo. En el segundo muestreo, un año después, 2/351 (0,57%) vacas fueron positivas (seroprevalencia aparente), representando una seroprevalencia real de 0%.

Con respecto al establecimiento 2, en el primer muestreo 41/803 (5,1%) vacas fueron positivas, representando una prevalencia real de 7% (IC95% 5,23 – 8,76). Para el segundo muestreo, ocho meses luego del primero, 16/667 (2,4%) vacas fueron positivas, representando una prevalencia real de 2,4% (IC95% 1,23 – 3,54), la corrección por la sensibilidad y especificidad de la prueba arroja una seroprevalencia real igual a la aparente. De los 16 animales positivos, 13 representaban un nuevo resultado positivo, o sea, las mismas vacas habían sido negativas en el primer muestreo.

7.2. Detección de MAP

Para la detección de MAP en el establecimiento 1, todas las muestras de heces (399) obtenidas en noviembre de 2019 fueron negativas por PCR. Sin embargo, 2/399 (0,5%) animales presentaron por qPCR una leve amplificación (no se observa fase exponencial). Para comparar resultados se realizó la qPCR para la secuencia F57, de los cuales 1/2 (50%) fue positivo, que pertenecía a un animal negativo por ELISA. En noviembre de 2019, se realizó un muestreo ambiental y todas las muestras (6) fueron negativas por PCR y qPCR, pero en febrero de 2020, 1/6 (16,6%) fue positiva por qPCR. Esta muestra positiva, de PMFA, fue confirmada a través de la amplificación de la secuencia F57. Ambos amplicones de la qPCR de F57 fueron enviados a secuenciar a Macrogen Inc y se confirmó su identidad. En 10% (40) de las muestras de materia fecal se realizó el control de extracción/inhibición y presentaron amplificación.

Por otro lado, en el establecimiento 2 para las muestras de heces, en el momento del muestreo de las 41 vacas seropositivas solamente se encontraban 25 en el establecimiento, de estas, en 10 (40%) fue detectado MAP por PCR y en 17 (68%) por qPCR (Tabla 2). Para las heces sometidas a cultivo, 4/7 (57,1%) presentaron aislamientos de MAP (Tabla 2), siendo las colonias confirmadas por ZN y PCR para IS900. Se amplificó el gen ribosomal 16S de uno de los aislamientos y fue enviado para secuenciar presentando 99% de similitud con MAP. Por otro lado, en 3/3 (100%) muestras ambientales del primer muestreo (potrero) no hubo detección por PCR, pero 2/3 (66,7%) fueron positivas por qPCR. En relación con segundo muestreo (estercolero y camino), 2/2 (100%) fueron negativas por PCR y 2/2 (100%) positivas por qPCR.

Al realizar la cuantificación de MAP en las heces por qPCR, 8/17 (47%) presentaron un número de copias $<92,8$ copias/ μ L, los demás (9/17, 53%) variaron de 94,46 a $4,97 \times 10^3$ copias/ μ L, que corresponde a valores de 63 a 3311 copias/mg de materia fecal. Todas las

muestras ambientales presentaron número de copias por debajo del límite inferior del rango de cuantificación.

Tabla 2. Detección de MAP en muestras de heces de vacas del establecimiento 2, a través de las técnicas de PCR, qPCR y cultivo.

Animal	PCR	qPCR	Cultivo
1	-	-	NA
2	+	+	+
3	+	+	NA
4	-	-	NA
5	-	-	NA
6	+	+	-
7	-	+	NA
8	+	+	-
9	+	+	NA
10	-	-	NA
11	-	+	NA
12	-	+	NA
13	-	-	NA
14	-	-	NA
15	+	+	NA
16	+	+	+
17	-	+	NA
18	+	+	+
19	+	+	+
20	-	+	NA
21	-	+	NA
22	-	-	NA
23	-	+	NA
24	+	+	-
25	-	-	NA
Total	10	17	4

+: Positivo; -: Negativo; NA: No analizado.

7.3. Estudio longitudinal

La detección de MAP en muestras de heces con las diferentes técnicas, ZN, PCR y qPCR, presentó resultados diferentes entre los tiempos de muestreos. Hubo una mayor detección a través de la qPCR (Tabla 3), con un total de 82,7% (43/52) de positividad. Por otro lado, para leche no hubo detección por PCR, pero por qPCR fueron positivas 27,3% (3/11), 30,8% (4/13), 38,5% (5/13) y 30,8% (4/13), en T1, T2, T3 y T4 respectivamente, totalizando 32% (16/50). Cuando se comparó la detección en heces y leche del mismo animal, solamente en T2 hubo una detección positiva en leche y no en heces. Para los demás animales la detección positiva en leche también lo fue en heces (Tabla 4).

Para la cuantificación en heces, 5/52 (9,6%) presentaron número de copias $<92,8$ copias/ μL , los demás (47/52, 90,4%) variaron de 108,06 a $2,88 \times 10^4$ copias/ μL , que corresponde a 72 a $1,7 \times 10^4$ copias/mg de materia fecal. Todas las muestras de leche individuales presentaron número de copias $<92,8$ copias/ μL .

Con respecto a las muestras ambientales, sólo fue positiva por PCR la muestra del camino a sala pre-ordeño. A su vez, todas las muestras ambientales fueron positivas por qPCR (Tabla 5), cuando se cuantificó la carga de MAP en la muestra de PMFA del T1, presentó un valor por debajo del límite inferior del rango, las demás variaron de 107,51 a 272,61 copias/ μL , que corresponde a 56 a 170 copias/mg de materia fecal. Por otro lado, las muestras de tanque de leche y leche de descarte fueron negativas por PCR y qPCR.

Tabla 3. Detección de MAP en muestras de heces por las técnicas de ZN, PCR y qPCR, referentes a los cuatro tiempos de muestreo (T1, T2, T3 y T4) en el establecimiento 2.

Técnica/Tiempo	T1	T2	T3	T4
ZN	4/12 (33,3%)	3/14 (21,4%)	4/13 (30,8%)	3/13 (23,1%)
PCR	7/12 (58,3%)	5/14 (35,7%)	6/13 (46,2%)	6/13 (46,2%)
qPCR	11/12 (91,7%)	11/14 (78,6%)	11/13 (84,6%)	10/13 (76,9%)

Tabla 4. Detección de MAP en muestras de heces y leche a través de la técnica de qPCR en los cuatro tiempos de muestreo (T1, T2, T3 y T4) en el establecimiento 2.

Animal	T1		T2		T3		T4	
	Heces	Leche	Heces	Leche	Heces	Leche	Heces	Leche
1	+	+	+	-	+	-	+	-
2	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND
3	+	-	+	-	+	+	+	+
4	+	-	+	+	+	-	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	-	+	+	+	-	+	-
7	+	-	+	-	+	+	+	-
8	+	-	+	-	+	-	+	-
9	+	ND						
10	+	-	+	-	+	-	+	-
11	+	-	+	-	+	+	+	+
12	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
13	ND	ND	-	+	+	-	-	-
14	ND	ND	+	-	ND	ND	ND	ND
15	ND	ND	-	-	-	-	-	-
16	ND	ND	-	-	-	-	-	-
17	ND	ND	ND	ND	+	+	+	-

+: Positivo; -: Negativo; ND: No disponible para análisis.

Tabla 5. Detección de MAP en muestras ambientales durante los cuatro tiempos de muestreo (T1, T2, T3 y T4), por las técnicas de PCR y qPCR en el establecimiento 2.

Muestra	T1		T2		T3		T4	
	PCR	qPCR	PCR	qPCR	PCR	qPCR	PCR	qPCR
PMFA	-	+	-	+	-	+	-	+
Estercolera	ND	ND	-	+	ND	ND	ND	ND
Camino	ND	ND	+	+	-	+	ND	ND
Potrero	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	+
Tanque de leche	-	-	-	-	-	-	-	-
Leche descarte	-	-	-	-	-	-	-	-

+: Positivo; -: Negativo; ND: No disponible para análisis; PMFA: Pool de materia fecal obtenido del piso de la sala de pre-ordeño.

7.4. Análisis estadístico

7.4.1. Prueba de concordancia

Cuando se evaluó la concordancia entre PCR y qPCR para las muestras de heces, el valor de kappa=0,37 ($p < 0,001$, IC95% 0,17 – 0,56), que corresponde a concordancia mínima (o a concordancia nula a débil cuando se interpreta según el IC95%). Por otro lado, entre PCR y ZN el valor kappa=0,60 ($p < 0,001$, IC95% 0,38 – 0,82) siendo una concordancia moderada (o concordancia mínima a fuerte cuando se interpreta según el IC95%). A su vez, el análisis de concordancia entre ZN y qPCR arrojó un kappa=0,143 ($p = 0,08$, IC95% -0,06 – 0,35) indicando falta de concordancia.

Para las muestras de leche, la concordancia entre PCR y qPCR presentó un índice kappa=0, indicando una falta de concordancia. Para el análisis de concordancia con las muestras ambientales el índice kappa=0,025 ($p = 0,29$, IC95% -0,24 – 0,29), indicando falta de concordancia.

7.4.2. ROC

El análisis ROC para la PCR indicó una AUC=0,937 (IC95% 0,861 – 1,01) y para el ZN una AUC=0,921 (IC95% 0,839 – 1,00), no observándose diferencias significativas entre ambas AUC ($p = 0,77$) (Figura 1). El punto de corte óptimo de la qPCR que se asoció con resultado positivo (caso) de PCR fue 464,98 copias/ μ L y asociado al resultado positivo (caso) de ZN fue de 2136 copias/ μ L. La sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos (VPP) y negativos (VPN) y la AUC se muestran en las Tablas 6 y 7.

Tabla 6. Resultado del análisis ROC de la qPCR utilizando la PCR como prueba de referencia para detección de MAP.

Índice de Youden	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN	AUC
0,909	0,909	1	1	0,823	0,937

VVP: Valor predictivo positivo; VPN: Valor predictivo negativo; AUC: Área bajo la curva.

Tabla 7. Resultado del análisis ROC de la qPCR utilizando el ZN como prueba de referencia para detección de MAP.

Índice de Youden	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN	AUC
0,720	0,928	0,791	0,722	0,950	0,921

VVP: Valor predictivo positivo; VPN: Valor predictivo negativo; AUC: Área bajo la curva.

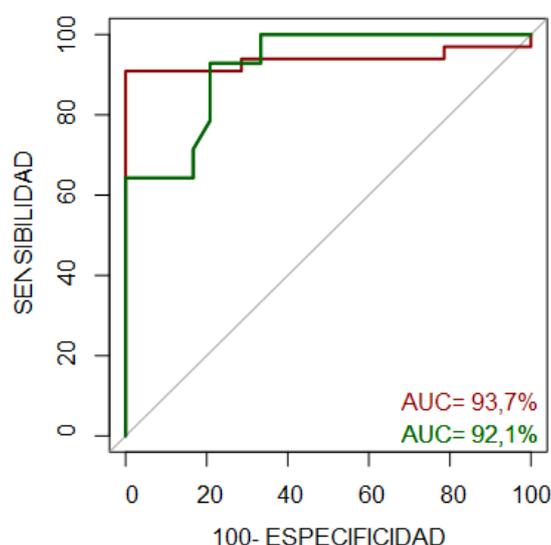


Figura 2. Curva de análisis ROC comparado entre las técnicas de PCR (línea roja) y ZN (línea verde) para detección de MAP.

7.4.3. Regresión lineal

El modelo empleado presentó una correlación de 75% (R^2 ajustado=0,75) y un valor $p < 0,001$. Con respecto al logaritmo del número de copias, la variable muestra (tipo de muestra) para muestras ambientales (PMFA, estercolera y camino) [Odds ratio (OR) = 0,4; IC95% 0,3 – 0,8] y leche (OR = 0,05; IC95% 0,03 – 0,08) presentaron diferencia significativa ($p < 0,05$) en comparación con muestras de heces individuales. Sin embargo, el tipo de muestra suelo no presentó diferencia significativa ($p > 0,05$) dentro del modelo. El ajuste del valor de p por el método de Tukey para comparar una familia de 4 estimaciones (heces individuales, muestras ambientales, leche, suelo) mostró que las muestras de leche tenían un 88% menos de copias que las muestras de heces ambientales ($p < 0,001$) e incluso las muestras de suelo mostraron 10 veces más copias que las muestras de leche ($p < 0,001$) aunque con un intervalo de confianza mayor (IC95% 3,6 – 28,3).

8. DISCUSIÓN

El diagnóstico de PTBC es complejo, con pruebas de detección generalmente imperfectas, pero útiles cuando son aplicadas con un propósito específico, como para la estimación de la prevalencia (Whittington et al., 2019). La prevalencia se puede estimar a nivel de rodeos o individual, siendo las pruebas serológicas, principalmente el ELISA, las más utilizadas (Committee on Diagnosis and Control of Johne's Disease, 2003; Nielsen, 2009). Sin embargo, según Collins et al., (1991) el ELISA sería adecuado para predios con prevalencia real mayor a 3% para la toma de decisión de eliminación de animales.

En nuestro trabajo buscábamos evaluar el uso de la qPCR en un establecimiento sin casos clínicos y otro con casos clínicos de PTBC. Al determinar la seroprevalencia real en dos establecimientos (1 y 2), el establecimiento 2 obtuvo resultados positivos de 7% y 2,4% en el primer y segundo muestreo, respectivamente. Valores similares a los encontrados anteriormente en el país por Núñez (2006) y Núñez et al., (2018), siendo de la prevalencia aparente de 5,65% y 2,54%, respectivamente. En países vecinos, como Argentina, estimaciones más recientes arrojaron una seroprevalencia aparente individual de 13,6% en rodeos lecheros (Alvarado Pinedo et al., 2019), mientras que en Brasil esta osciló entre 2,7 y 32,3% (Mota et al., 2007; Costa et al., 2010; Sá et al., 2013).

Por otro lado, el establecimiento 1 tuvo una prevalencia real de 0% en ambos muestreos. Además, no hubo detección de MAP en heces individuales por PCR, pero por qPCR dos muestras fueron consideradas dudosas, siendo sometidas a confirmación a través de la qPCR de la secuencia F57, presentando positividad para una de ellas. En cuanto a las muestras ambientales, una de ellas (PMFA) fue positiva por qPCR en el segundo muestreo (febrero 2020), tanto para la secuencia de inserción IS900 como para F57. Esta última está presente en una copia en todo el genoma de MAP y se considera específica para esta subespecie (Poupart et al., 1993). Estos resultados, ELISA sumado al qPCR, establecen una prevalencia muy baja para este establecimiento.

La detección de MAP en materia fecal y ambiente en este establecimiento demuestra que a pesar de los animales no presentaren signos clínicos existe la circulación del microorganismo. La positividad de la muestra ambiental podría estar relacionada con una posible eliminación intermitente de MAP en animales infectados, como se ha descrito en la bibliografía (Nielsen, 2008b; Beth & Collins, 2010). Posiblemente durante el muestreo previo de materia fecal algunos animales no estaban eliminando MAP o eliminaban bajas cargas que no fueron detectados por PCR/qPCR, pero dos meses después pudieran estar eliminando cargas detectables en el ambiente. La eliminación intermitente se asocia con el estrés, etapa de lactancia y cambios hormonales (Dalton & Hill, 2011; Stabel et al., 2014). Este resultado es interesante, indicando que sólo un muestreo ambiental podría no ser suficiente como para determinar el estatus con seguridad, particularmente en rodeos con baja prevalencia.

La diferencia de prevalencia de PTBC entre los establecimientos puede estar relacionada a la exposición de los animales al MAP y del manejo al que se ven sometidos los mismos.

La detección de MAP en muestras de heces, ambientales y leche en el establecimiento 2, sugiere que los animales de este predio tienen un riesgo de exposición mayor. En contrapartida, en el establecimiento 1 hubo detección en un animal y una muestra de ambiente, por lo que los animales tendrían un riesgo de exposición mucho menor.

Cabe mencionar que los establecimientos presentaban manejos diferentes, principalmente con relación a los terneros. En el establecimiento 1 los terneros eran separados de la madre al nacer, recibían calostro pasteurizado y posteriormente sustituto lácteo; mientras que en el establecimiento 2 los terneros permanecían 24 h con sus madres, consumiendo el calostro, y subsecuentemente eran alimentados con leche de descarte del mismo tambo. Se sabe que las infecciones en periodo neonatal están asociadas a ingestión de calostro contaminado con MAP; la alimentación de los terneros con leche de descarte puede facilitar la diseminación de MAP de los adultos infectados a los terneros (Committee on Diagnosis and Control of Johne's Disease, 2003; Fecteau, 2017). Factores asociados al manejo del rebaño pueden ayudar a prolongar la enfermedad en el establecimiento y afectar su prevalencia.

En nuestro estudio se realizó el cultivo de muestras de materia fecal del establecimiento 2, obteniendo positividad en cuatro muestras, siendo esta una prueba confirmatoria. Sin embargo, tres muestras fueron negativas por esta técnica y positivas por las técnicas moleculares (PCR y qPCR). Esto puede ser explicado por la capacidad de los métodos moleculares de detectar ADN independientemente de que el microorganismo esté viable o no. Por otro lado, el cultivo presenta baja sensibilidad y los pasos de descontaminación previos al cultivo podrían contribuir a inactivar MAP (Reddacliff et al., 2003; Whitlock et al., 2000).

A pesar de que en este estudio solamente se acompañaron vacas seropositivas, fue posible observar que la excreción de MAP en heces fue, de manera general, constante. Sin embargo, las muestras de leche presentaron positividad intermitente, con un bajo porcentaje de positividad en comparación a las heces, 32% y 82,7%, respectivamente. Similar porcentaje de positividad fue observado por Pillai & Jayarao (2002), quienes detectaron MAP en 33% de muestras de leche de un establecimiento MAP positivo. Por otro lado, Khol et al. (2013) mostraron una positividad inferior a 5%.

Durante el periodo del estudio longitudinal las muestras de leche provenientes del tanque de leche y leche de descarte no presentaron positividad. Es posible que la ausencia de detección esté relacionada con la dilución de la leche de vacas excretoras de MAP con la de no excretoras (Slana et al. 2008b). Este predio contaba con 800 vacas en ordeño, lo que favorece que la concentración de MAP en la leche sea baja como para ser detectable por qPCR. Similares resultados fueron observados por Khol et al. (2013), no detectando MAP en muestras provenientes de tanque de leche. Resultados diferentes fueron presentados por Bosshard et al. (2006), con una detección de 3% en muestras de tanque de leche, y que incluso puede llegar a un 68% de detección según lo presentado por Stabel et al. (2002). Por otro lado, actualmente existen metodologías que mejoran la sensibilidad de detección, como

por ejemplo mediante el uso de separación magnética mediada por péptidos o anticuerpos (Husakova et al., 2017).

Los resultados de nuestro estudio sugieren que las muestras de leche (individuales y de tanque) pueden no ser útiles para la detección de animales con PTBC por técnicas moleculares, debido a la baja detección en este tipo de muestra. En contrapartida, muestras ambientales (PMFA, estercolera o camino) pueden ser una mejor opción, visto que presentaron 88% más copias que las muestras de leche. Incluso las muestras de suelo presentaron hasta 10 veces más copias de MAP que las muestras de leche, aunque con un intervalo de confianza mayor, que puede ser explicado por la baja cantidad de muestras. Además, en el establecimiento de muy baja prevalencia se presentó positividad en una muestra de PMFA, lo cual indica la ventaja de esta metodología para ser utilizada en monitoreos regulares y para incluirlo en un potencial protocolo de definición del estatus de un establecimiento. Por ejemplo, se ha planteado el uso de “boot swabs” en la sala de ordeño para dicho fin (Eisenberg et al., 2013).

La qPCR presentó mayor porcentaje de detección que las demás técnicas, tanto en muestras de heces como de leche. Cuando se compararon las técnicas de qPCR y PCR para heces se obtuvo una concordancia mínima ($\kappa=0,37$), pero para leche no hubo concordancia ($\kappa=0$). En este último, la falta de concordancia está relacionada con la negatividad por PCR en todas las muestras de leche. La qPCR se mostró más eficiente para la detección de MAP. Esta técnica presenta ventajas sobre la PCR, como permitir la cuantificación, mayor sensibilidad y especificidad que puede mejorarse mediante el uso de sondas (Mackay, 2004; Rodríguez-Lázaro et al., 2005). Al comparar la qPCR y ZN no hubo concordancia ($\kappa=0,143$) entre ambas, mientras que para PCR y ZN la concordancia fue moderada ($\kappa=0,60$). Todas las muestras positivas por ZN también lo fueron por PCR y qPCR, no presentando falsos positivos. Entretanto, el ZN resultó poco sensible para la detección de MAP y su éxito depende del número de bacterias presentes en la muestra (Zimmer et al., 1999; OIE, 2021).

El análisis ROC indica un área bajo la curva (AUC), que es utilizada para discriminar correctamente entre resultados negativos y positivos a una prueba de diagnóstico; cuanto más cerca esté el punto de la curva en la esquina superior izquierda mayor será la precisión de la prueba (Burgueño et al. 1995). El punto de corte óptimo de la qPCR que discriminaría mejor resultados positivos y negativos de PCR fue 464,98 copias/ μ L (258 copias/mg de materia fecal), que corresponde a 31 células de MAP por microlitro (17 células/mg de materia fecal), considerando un promedio de 15 copias de IS900 por cada célula de MAP (Slana, et al. 2008a). A partir de este valor hay 93,7% de probabilidad de que la PCR dé un resultado positivo. Para discriminar resultados positivos y negativos de ZN el punto de corte de qPCR fue de 2136 copias/ μ L (1256 copias/mg de materia fecal), 142 células de MAP por microlitro (84 células/mg de materia fecal). A partir de ese valor hay 92,1% de chance de tener un resultado positivo por coloración de ZN. A pesar de no haber diferencias significativas entre la AUC de PCR y coloración de ZN, a través de la PCR es necesario un

número menor de MAP para tener un resultado positivo, este número es casi cinco veces mayor para la coloración de ZN, demostrando una detección superior.

9. CONCLUSIONES

1. Los datos obtenidos en este estudio nos indican una mejor capacidad de detección de MAP por técnicas moleculares, especialmente la qPCR. Además, permitió detectar y cuantificar MAP utilizando distintos tipos de muestras, siendo que para heces presentó un mayor porcentaje de detección comparada con la leche.
2. A pesar de detectar MAP en muestras de leche individual, no hubo detección en tanque de leche. Como una mejor opción de detección del agente en establecimientos son las muestras ambientales (PMFA), que presentaron una mejor detección a nivel general.
3. Se determinó el punto de corte de la qPCR de 258 copias/mg de materia fecal para distinguir resultados positivos y negativos para PCR y 1256 copias/mg de materia fecal para la coloración de ZN. La PCR fue más eficiente, necesitando de un menor número de MAP para detección.
4. La qPCR resultó ser una técnica con mejor capacidad de detección que la PCR o la coloración de ZN, incluso en establecimientos de muy baja prevalencia.
5. La técnica de cuantificación puede ser una herramienta valiosa en programas de control, permitiendo la detección de animales que excretan una baja carga de MAP, siendo una alternativa viable para desarrollar estrategias de control de PTBC en rodeos bovinos.

10. REFERENCIAS

- Agrawal, G., Aitken, J., Hamblin, H., Collins, M., & Borody, T. J. (2021). Putting Crohn's on the MAP: Five Common Questions on the Contribution of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis to the Pathophysiology of Crohn's Disease. *Digestive Diseases and Sciences*, 66(2), 348–358. <https://doi.org/10.1007/s10620-020-06653-0>
- Alinovi, C. A., Ward, M. P., Lin, T. L., Moore, G. E., & Wu, C. C. (2009). Real-time PCR, compared to liquid and solid culture media and ELISA, for the detection of *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis. *Veterinary Microbiology*, 136(1–2), 177–179. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.10.012>
- Alvarado Pinedo, F. (2015). *Posibilidades diagnósticas de la PPD aviar en la paratuberculosis bovina en animales jóvenes*.
- Alvarado Pinedo, M. F., Di Paolo, L. A., Sosa, P. S., Romero, M. A., Peralta, L. M., Costa, E. F., & Travería, G. E. (2019). Seroprevalencia de paratuberculosis bovina mediante la prueba de ELISA urea en rodeos de cría y de leche con sospecha de la enfermedad, localizados en la provincia de Buenos Aires, Argentina. *Analecta Veterinaria*, 39(1), 2–9. <https://doi.org/10.24215/15142590e032>
- Arsenault, R. J., Maattanen, P., Daigle, J., Potter, A., Griebel, P., & Napper, S. (2014). From mouth to macrophage: Mechanisms of innate immune subversion by *Mycobacterium avium* subsp. Paratuberculosis. *Veterinary Research*, 45, 1–15. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-45-54>
- Atreya, R., Bülte, M., Gerlach, G. F., Goethe, R., Hornef, M. W., Köhler, H., Meens, J., Möbius, P., Roeb, E., & Weiss, S. (2014). Facts, myths and hypotheses on the

- zoonotic nature of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *International Journal of Medical Microbiology*, 304(7), 858–867.
<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.07.006>
- Bassey, E. O. E., & Collins, M. T. (1997). Study of T-lymphocyte subsets of healthy and *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis-Infected cattle. *Infection and Immunity*, 65(11), 4869–4872. <https://doi.org/10.1128/iai.65.11.4869-4872.1997>
- Beard, P. M., Daniels, M. J., Henderson, D., Pirie, A., Rudge, K., Buxton, D., Rhind, S., Greig, A., Hutchings, M. R., McKendrick, I., Stevenson, K., & Sharp, J. M. (2001). Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(4), 1517–1521. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.4.1517-1521.2001>
- Benedictus, G., & Bosma, J. (1985). Paratuberculosis: a surgical method of diagnosis in practice. *The Veterinary Quarterly*, 7(3), 217–221.
<https://doi.org/10.1080/01652176.1985.9693985>
- Bermudez, L. E., Petrofsky, M., Sommer, S., & Barletta, R. G. (2010). Peyer ' s Patch-Deficient Mice Demonstrate That *Mycobacterium avium* subsp . paratuberculosis Translocates across the Mucosal Barrier via both M Cells and Enterocytes but Has Inefficient Dissemination. *Infection and Immunity*, 78(8), 3570–3577.
<https://doi.org/10.1128/IAI.01411-09>
- Beth, M. A., & Collins, D. M. (2010). *Paratuberculosis Organism, Disease, Control*.
- Bosshard, C., Stephan, R., & 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(7), 1662–1667. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.7.1662>
- Burgueño, M. J., García-Bastos, J. L., & González-Buitrago, J. M. (1995). Las curvas ROC en la evaluación de las pruebas diagnósticas. *Medicina Clínica*, 104(17), 661–670.
- Cassamagnaghi, A., & Cassamagnaghi, A. (h). (1947). La Enfermedad de Johne, los primeros casos reconocidos en los bovinos del Uruguay. *Anales de La Facultad de Veterinaria*, 5(1), 83–104.
- Chacon, O., Bermudez, L. E., & Barletta, R. G. (2004). Johne's disease, inflammatory bowel disease, and *Mycobacterium paratuberculosis*. *Annual Review of Microbiology*, 58, 329–363. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.58.030603.123726>
- Clark, D. L., Anderson, J. L., Koziczkowski, J. J., & Ellingson, J. L. E. (2006). Detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis genetic components in retail cheese curds purchased in Wisconsin and Minnesota by PCR. *Molecular and Cellular Probes*, 20, 197–202. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2005.12.006>
- Clarke, C. J. (1997). The Pathology and Pathogenesis of Paratuberculosis in Ruminants and Other Species. *Journal of Comparative Pathology*, 116, 217–261.
- Collins, D. M., Stephens, D. M., & De Lisle, G. W. (1993). Comparison of polymerase chain reaction tests and faecal culture for detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine faeces. *Veterinary Microbiology*, 36, 289–299.
[https://doi.org/10.1016/0378-1135\(93\)90095-O](https://doi.org/10.1016/0378-1135(93)90095-O)
- Collins, M. T., Sockett, D. C., Ridge, S., & Cox, J. C. (1991). Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for Johne's disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(2), 272–276. <https://doi.org/10.1128/jcm.29.2.272-276.1991>
- Committee on Diagnosis and Control of Johne's Disease. (2003). Diagnosis and Control of Johne's Disease. In *National Academies Press*.
<https://doi.org/https://doi.org/10.17226/10625>
- Constable, P. D., Hinchcliff, K. W., Done, S. H., & Grünberg, W. (2017). Diseases of the Alimentary Tract-Ruminant. In *Veterinary Medicine* (pp. 436–621).
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-5246-0.00008-5>

- Costa, J. C. M., Pieri, F. A., Souza, C. F., Espeschit, I. F., Felipe, A. G., Santos, G. M., Tobia, F. L., Silva Junior, A., & Moreira, M. A. S. (2010). Levantamento sorológico de *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* em bovinos leiteiros no estado do Espírito Santo. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 62(6), 1491–1494. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352010000600028>
- Cousins, D. V., Whittington, R., Marsh, I., Masters, A., Evans, R. J., & Kluver, P. (1999). *Mycobacteria* distinct from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from the faeces of ruminants possess IS900-like sequences detectable by IS900 polymerase chain reaction: Implications for diagnosis. *Molecular and Cellular Probes*, 14, 431–442. <https://doi.org/10.1006/mcpr.1999.0275>
- Dalton, J., & Hill, C. (2011). *Mycobacterium* spp. In *Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 87–92).
- DIEA. (2021). Anuario Estadístico Agropecuario. *Anuario Estadístico Agropecuario*. <https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Anuarios/Anuario2021/LIBRO ANUARIO 2021 Web.pdf>
- Dohoo, I., Martin, W., & Stryhn, K. (2003). Veterinary Epidemiologic Research. In *Applied Animal Behaviour Science* (Vol. 88, Issues 1–2). <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2004.03.001>
- Dow, C. T., & Alvarez, B. L. (2022). *Mycobacterium paratuberculosis* zoonosis is a One Health emergency. *EcoHealth*, 19, 164–174. <https://doi.org/10.1007/s10393-022-01602-x>
- Eisenberg, T., Wolter, W., Lenz, M., Schlez, K., & Zschöck, M. (2013). Boot swabs to collect environmental samples from common locations in dairy herds for *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) detection. *Journal of Dairy Research*, 80(4), 485–489. <https://doi.org/10.1017/S002202991300040X>
- Errico, F., & Bermúdez, J. (1983). *Aislamiento de Mycobacterium paratuberculosis (M. johnei) en bovinos en el Uruguay*. 19(83), 13–16.
- Fecteau, M.-E. (2017). Paratuberculosis in Cattle. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 34(1), 209–222. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2017.10.011>
- Fecteau, M. E., Hovingh, E., Whitlock, R. H., & Sweeney, R. W. (2013). Persistence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in soil, crops, and ensiled feed following manure spreading on infected dairy farms. *Canadian Veterinary Journal*, 54, 1083–1085.
- Fernández-Silva, J. A., Correa-Valencia, N. M., & Ramírez, N. F. (2014). Systematic review of the prevalence of paratuberculosis in cattle, sheep, and goats in Latin America and the Caribbean. *Tropical Animal Health and Production*, 46(8), 1321–1340. <https://doi.org/10.1007/s11250-014-0656-8>
- Fluss, R., Faraggi, D., & Reiser, B. (2005). Estimation of the Youden Index and its Associated Cutoff Point. *Biometrical Journal*, 47(4), 458–472. <https://doi.org/10.1002/bimj.200410135>
- García, A. B., & Shalloo, L. (2015). Invited review: The economic impact and control of paratuberculosis in cattle. *Journal of Dairy Science*, 98(8), 5019–5039. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-9241>
- Giannitti, F., Fraga, M., Caffarena, R. D., Schild, C. O., Bancharo, G., Armien, A. G., Travería, G., Marthaler, D., Wells, S. J., & Riet-Correa, F. (2018). *Mycobacterium paratuberculosis* sheep type strain in Uruguay: Evidence for a wider geographic distribution in South America. *Journal of Infection in Developing Countries*, 12(3), 190–195. <https://doi.org/10.3855/jidc.9751>
- Gilardoni, L. R., Paolicchi, F. A., & Mundo, S. L. (2012). Bovine paratuberculosis: a review of the advantages and disadvantages of different diagnostic tests. *Revista*

- Argentina de Microbiologia*, 44(3), 201–215.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23102470>
- González, J., Geijo, M. V., Garcí-Pariente, C., Verna, A., Corpa, J. M., Reyes, L. E., Ferreras, M. C., A, J. R., García Marín, J. F., & Pérez, V. (2005). Histopathological Classification of Lesions associated with Natural Paratuberculosis Infection in Cattle. *Journal of Comparative Pathology*, 133, 184–196.
<https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2005.04.007>
- Grant, I. R., Hitchings, E. I., McCartney, A., Ferguson, F., & Rowe, M. T. (2002). Effect of commercial-scale high-temperature, short-time pasteurization on the viability of Mycobacterium paratuberculosis in naturally infected cows' milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(2), 602–607. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.2.602-607.2002>
- Greig, A., Stevenson, K., Henderson, D., Perez, V., Hughes, V., Pavlik, I., Hines, M. E., McKendrick, I., & Sharp, J. M. (1999). Epidemiological study of paratuberculosis in wild rabbits in Scotland. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(6), 1746–1751.
<https://doi.org/10.1128/jcm.37.6.1746-1751.1999>
- Hanifian, S., Khani, S., Barzegari, A., & Shayegh, J. (2013). Quantitative real-time PCR and culture examination of Mycobacterium avium subsp . paratuberculosis at farm level. *Veterinary Microbiology*, 162(1), 160–165.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.08.026>
- Husakova, M., Dzedzinska, R., & Slana, I. (2017). Magnetic Separation Methods for the Detection of Mycobacterium avium subsp . paratuberculosis in Various Types of Matrices : A Review. *BioMed Research International*, 2017.
- Imperiale, B. R., Moyano, R. D., & Giulio, A. B. D. I. (2017). Genetic diversity of Mycobacterium avium complex strains isolated in Argentina by MIRU-VNTR. *Epidemiol Infect*, 145(7), 1382–1391. <https://doi.org/10.1017/S0950268817000139>
- Kalis, C. (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. *Veterinary Microbiology*, 97, 73–86. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(03\)00242-6](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(03)00242-6)
- Khol, J. L., Wassertheurer, M., Sodoma, E., Revilla-Fernández, S., Damoser, J., österreicher, E., Dünser, M., Kleb, U., & Baumgartner, W. (2013). Long-term detection of mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in individual and bulk tank milk from a dairy herd with a low prevalence of johne's disease. *Journal of Dairy Science*, 96(6), 3517–3524. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6466>
- Levy-Frebault, V. V., & Portaels, F. (1992). Proposed minimal standards for the genus Mycobacterium and for description of new slowly growing Mycobacterium species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42(2), 315–323.
<https://doi.org/10.1099/00207713-42-2-315>
- Li, L., Bannantine, J. P., Zhang, Q., Amonsin, A., May, B. J., Alt, D., Banerji, N., Kanjilal, S., & Kapur, V. (2005). The complete genome sequence of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(35), 12344–12349.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0505662102>
- Liverani, E., Scaioli, E., Cardamone, C., Dal Monte, P., & Belluzzi, A. (2014). Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in the etiology of Crohn's disease, cause or epiphenomenon? *World Journal of Gastroenterology*, 20(36), 13060–13070.
<https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i36.13060>
- Lombard, J. E., Garry, F. B., McCluskey, B. J., & Wagner, B. A. (2005). Risk of removal and effects on milk production associated with paratuberculosis status in dairy cows.

- Journal of the American Veterinary Medical Association*, 227(12), 1975–1981.
<https://doi.org/10.2460/javma.2005.227.1975>
- Losinger, W. C. (2005). Economic impact of reduced milk production associated with Johne's disease on dairy operations in the USA. *Journal of Dairy Research*, 72, 425–432. <https://doi.org/10.1017/S0022029905001007>
- Mackay, I. M. (2004). Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infection*, 10(3), 190–212. <https://doi.org/10.1111/j.1198-743X.2004.00722.x>
- Markey, B., Leonard, F., Archambault, M., Cullinane, A., & Maguire, D. (2013). Mycobacterium species. In *Clinical Veterinary Microbiology* (pp. 161–176).
- McHugh, M. L. (2012). Interrater reliability : the kappa statistic. *Biochemica Medica*, 22(3), 276–282. <https://hrcak.srce.hr/89395>
- Momotani, E., Whipple, D. L., Thiermann, A. B., & Cheville, N. F. (1988). Role of M Cells and Macrophages in the Entrance of Mycobacterium paratuberculosis into Domes of Ileal Peyer's Patches in Calves. *Veterinary Pathology*, 25(2), 131–137.
- Mota, R., Pinheiro Junior, J., Gomes, M., Peixoto, R., Maia, F., Brito, M., Chies, J., Snel, G., Bercht, B., & Juffo, G. (2007). Paratuberculose Em Um Rebanho Bovino Leiteiro No Estado De Pernambuco, Pe. *Arquivos Do Instituto Biológico*, 74(2), 73–79.
http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v74_2/mota.pdf
- Naser, S. A., Ghobrial, G., Romero, C., & Valentine, J. F. (2004). Culture of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis from the blood of patients with Crohn's Disease. *Lancet*, 364, 1039–1044. [https://doi.org/10.1016/s0084-3954\(07\)70122-7](https://doi.org/10.1016/s0084-3954(07)70122-7)
- Nielsen, S. (2009). *Paratuberculosis in dairy cattle : epidemiological studies used for design of a control programme in Denmark*.
https://books.google.com.co/books/about/Paratuberculosis_in_Dairy_Cattle.html?id=fSaNtwAACAAJ&redir_esc=y
- Nielsen, S. S. (2008). Transitions in diagnostic tests used for detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infections in cattle. *Veterinary Microbiology*, 132(3–4), 274–282. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.05.018>
- Nielsen, S. S., & Toft, N. (2008). Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: A review of accuracies of ELISA, interferon- γ assay and faecal culture techniques. *Veterinary Microbiology*, 129(3–4), 217–235. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.12.011>
- Nielsen, Soren S., Gronbak, C., Agger, J. F., & Houe, H. (2002). Maximum-likelihood estimation of sensitivity and specificity of ELIAs and faecal culture for diagnosis of paratuberculosis. *Preventive Veterinary Medicine*, 53(3), 191–204.
[https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(01\)00280-X](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(01)00280-X)
- Nielsen, Søren Saxmose, & Toft, N. (2009). A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. *Preventive Veterinary Medicine*, 88(1), 1–14.
<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2008.07.003>
- Nuñez, A., Suanes, A., Salaberry, X., Macchi, V., Piaggio, J., Fernandez, F., & Gil, A. (2018). SEROPREVALENCE STUDY OF BOVINE PARATUBERCULOSIS IN DAIRY HERDS IN URUGUAY. *14th International Colloquium on Paratuberculosis 2018*, 137.
- OIE. (2021). Paratuberculosis (Johne's disease). In *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* (Issue 3.1.15, pp. 1–17).
- Pal, M., Alema, J., & Rahman, M. T. (2015). Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis: An Emerging Bacterial Disease of Global Public Health Significance. *Microbes and Health*, 4(1), 4–13.
<https://doi.org/10.3329/mh.v4i1.23085>

- Paolicchi, F., Cirone, K., Morsella, C., & Gioffré, A. (2012). First isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from commercial pasteurized milk in Argentina. *Brazilian Journal of Microbiology*, *43*(3), 1034–1037. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000300028>
- Park, K. T., Allen, A. J., & Davis, W. C. (2014). Development of a novel DNA extraction method for identification and quantification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from tissue samples by real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, *99*(1), 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.02.003>
- Pillai, S. R., & Jayarao, B. M. (2002). Application of IS900 PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* directly from raw milk. *Journal of Dairy Science*, *85*(5), 1052–1057. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74165-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74165-9)
- Pillars, R. B., Grooms, D. L., Wolf, C. A., & Kaneene, J. B. (2009). Economic evaluation of Johne's disease control programs implemented on six Michigan dairy farms. *Preventive Veterinary Medicine*, *90*, 223–232. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2009.04.009>
- Poupart, P., Coene, M., Heuverswyn, H. V. A. N., & Cocitol, C. (1993). Preparation of a Specific RNA Probe for Detection of *Mycobacterium paratuberculosis* and Diagnosis of Johne's Disease. *Journal of Clinical Microbiology*, *31*(6), 1601–1605.
- Reddacliff, L. A., Vadali, A., & Whittington, R. J. (2003). The effect of decontamination protocols on the numbers of sheep strain *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from tissues and faeces. *Veterinary Microbiology*, *95*, 271–282. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(03\)00181-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(03)00181-0)
- Rindi, L., & Garzelli, C. (2014). Infection, Genetics and Evolution Genetic diversity and phylogeny of *Mycobacterium avium*. *INFECTION, GENETICS AND EVOLUTION*, *21*, 375–383. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.12.007>
- Rodríguez-Lázaro, D., D'Agostino, M., Herrewegh, A., Pla, M., Cook, N., & Ikononopoulos, J. (2005). Real-time PCR-based methods for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in water and milk. *International Journal of Food Microbiology*, *101*, 93–104. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.09.005>
- Roller, M., Hansen, S., Knauf-Witzens, T., Oelemann, W. M. R., Czerny, C. P., Abd El Wahed, A., & Goethe, R. (2020). *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* Infection in Zoo Animals: A Review of Susceptibility and Disease Process. *Frontiers in Veterinary Science*, *7*(December), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.572724>
- Romero, C., Hamdi, A., Valentine, J. F., & Naser, S. A. (2005). Evaluation of surgical tissue from patients with Crohn's disease for the presence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* DNA by in situ hybridization and nested polymerase chain reaction. *Inflammatory Bowel Diseases*, *11*(2), 116–125. <https://doi.org/10.1097/00054725-200502000-00004>
- Russell, D. G., Mwandumba, H. C., & Rhoades, E. E. (2002). *Mycobacterium* and the coat of many lipids. *The Journal of Cell Biology*, *158*(3), 421–426. <https://doi.org/10.1083/jcb.200205034>
- Sá, L. D. M., Oliveira, J. M. B. De, Santos, G. R., Brandespim, D. F., Júnior, J. L. S., Mota, R. A., M, A. S. L., Oliveira, J. M. B., Santos, G. R., Brandespim, D. F., & Mota, R. A. (2013). Avaliação sorológica e de fatores de risco para a infecção por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* em rebanhos leiteiros da Microrregião de Garanhuns, Pernambuco. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, *33*(3), 310–313.
- Sevilla, I., Singh, S. V., Garrido, J. M., Aduriz, G., Rodríguez, S., Geijo, M. V., Whittington, R. J., Saunders, V., Whitlock, R. H., & Juste, R. A. (2005). Molecular typing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* strains from different

- hosts and regions. *Rev Sci Tech*, 24(3), 1061–1066.
<https://doi.org/10.20506/rst.24.3.1634>
- Sigurðardóttir, Ó., Bakke-McKellep, A. M., Djønnæ, B., & Evensen, Ø. (2005). Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis enters the small intestinal mucosa of goat kids in areas with and without Peyer's patches as demonstrated with the everted sleeve method. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 28, 223–230. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2005.01.004>
- Slana, I., Kralik, P., Kralova, A., & 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(2), 250–257. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.08.013>
- Slana, I., Paolicchi, F., Janstova, B., Navratilova, P., & Pavlik, I. (2008). Detection methods for Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in milk and milk products: A review. *Veterinarni Medicina*, 53(6), 283–306. <https://doi.org/10.17221/1859-VETMED>
- Smith, R. L., Grohn, Y. T., Pradhan, A. K., Whitlock, R. H., van Kessel, J. S., Smith, J. M., Wolfgang, D. R., & Schukken, Y. H. (2009). A longitudinal study on the impact of Johne's disease status on milk production in individual cows. *Journal of Dairy Science*, 92(6), 2653–2661. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1832>
- Stabel, J.R. (2000). Transitions in immune responses to Mycobacterium paratuberculosis. *Veterinary Microbiology*. *Veterinary Microbiology*, 77(3–4), 465–473.
[http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037811350000331X%5Cnpapers3://publication/doi/10.1016/S0378-1135\(00\)00331-X](http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037811350000331X%5Cnpapers3://publication/doi/10.1016/S0378-1135(00)00331-X)
- Stabel, J. R., Palmer, M. V., Harris, B., Plattner, B., Hostetter, J., & Robbe-Austerman, S. (2009). Pathogenesis of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in neonatal calves after oral or intraperitoneal experimental infection. *Veterinary Microbiology*, 136, 306–313. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.11.025>
- Stabel, J. R., Wells, S. J., & Wagner, B. A. (2002). Relationships between fecal culture, ELISA, and bulk tank milk test results for Johne's disease in US dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 85(3), 525–531. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74104-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74104-0)
- Stabel, J R, Bradner, L., & Beitz, D. C. (2014). Clinical disease and stage of lactation influence shedding of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis into milk and colostrum of naturally infected dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 97(10), 6296–6304. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8204>
- Stabel, Judith R. (1997). An improved method for cultivation of Mycobacterium paratuberculosis from bovine fecal samples and comparison to three other methods. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 9(4), 375–380.
<https://doi.org/10.1177/104063879700900406>
- Suanes, A. (2011). *Paratuberculosis bovina: estrategias para el diagnóstico en rebaños lecheros de la cuenca sur del Uruguay*.
- Sweeney, R. W., Uzonna, J., Whitlock, R. H., Habecker, P. L., Chilton, P., & Scott, P. (2006). Tissue predilection sites and effect of dose on Mycobacterium avium subs. paratuberculosis organism recovery in a short-term bovine experimental oral infection model. *Research in Veterinary Science*, 80, 253–259.
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2005.07.007>
- Sweeney, R W. (2011). Pathogenesis of Paratuberculosis. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 27, 537–546.
<https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2011.07.001>
- Sweeney, Raymond W, Whitlock, R. H., & Rosenberger, A. E. (1992). Mycobacterium

- paratuberculosis Cultured from Milk and Supramammary Lymph Nodes . of Infected Asymptomatic Cows. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(1), 166–171.
- Thorel, M.-F., Krichevsky, M., & Lévy-Frébault, V. V. (1990). Numerical taxonomy of mycobactin dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium* and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *si*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 40(3), 254–260. <http://ijs.sgmjournals.org/content/40/3/254.short>
- Traversa, M., Alcobedo, J., Chettino, D., Sanz, H., Rodríguez, E., Olmos, M., & Jorge, M. (2005). Pérdidas económicas de un rodeo con paratuberculosis en el oeste de la provincia de Buenos Aires. Argentina. *Revista Argentina de Producción Animal*, 25(1), 336–337.
- USDA. (2008). Johne's Disease on U.S. Dairies, 1991-2007. *USDA-APHISVS, CEAH, National Animal Health Monitoring System, Fort Collins*.
- Uzual, F. A., Plattner, B. L., & Holstetter, J. M. (2015). Alimentary System. In *Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals* (Vol. 2, pp. 1–257). <https://doi.org/10.1016/C2012-0-00823-X>
- Waddell, L. A., Rajić, A., Stärk, K. D. C., & McEwen, S. A. (2016). The potential Public Health Impact of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: Global Opinion Survey of Topic Specialists. *Zoonoses and Public Health*, 63(3), 212–222. <https://doi.org/10.1111/zph.12221>
- Wernike, K., Hoffmann, B., Kalthoff, D., König, P., & Beer, M. (2011). Development and validation of a triplex real-time PCR assay for the rapid detection and differentiation of wild-type and glycoprotein E-deleted vaccine strains of Bovine herpesvirus type 1. *Journal of Virological Methods*, 174(1–2), 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.03.028>
- 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. *Veterinary Microbiology*, 77, 387–398. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00324-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00324-2)
- Whittington, R., Donat, K., Weber, M. F., Kelton, D., Nielsen, S. S., Eisenberg, S., Arrigoni, N., Juste, R., Sáez, J. L., Dhand, N., Santi, A., Michel, A., Barkema, H., Kralik, P., Kostoulas, P., Citer, L., Griffin, F., Barwell, R., Moreira, M. A. S., ... De Waard, J. H. (2019). Control of paratuberculosis: Who, why and how. A review of 48 countries. *BMC Veterinary Research*, 15(1), 1–29. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1943-4>
- Whittington, R. J., Marschall, D. J., Nicholls, P. J., Marsch, I. B., & Reddacliff, L. A. (2004). Survival and Dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the Environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(5), 2989–3004. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.5.2989>
- Whittington, R. J., Marsh, I. B., & Reddacliff, L. A. (2005). Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dam water and sediment. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 5304–5308. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5304-5308.2005>
- Whittington, R. J., & Windsor, P. A. (2009). In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* : A critical review and meta-analysis. *The Veterinary Journal*, 179, 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.08.023>
- Windsor, P. A., & Whittington, R. J. (2010). Evidence for age susceptibility of cattle to Johne's disease. *Veterinary Journal*, 184, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.01.007>

- Zarei-Kordshouli, F., Geramizadeh, B., & Khodakaram-Tafti, A. (2019). Prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis IS 900 DNA in biopsy tissues from patients with Crohn's disease: Histopathological and molecular comparison with Johne's disease in Fars province of Iran. *BMC Infectious Diseases*, *19*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3619-2>
- Zimmer, K., Dräger, K. G., Klawonn, W., & Hess, R. G. (1999). Contribution to the diagnosis of Johne's disease in cattle. Comparative studies on the validity of Ziehl-Neelsen staining, faecal culture and a commercially available DNA-Probe® test in detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in faeces from cattle. *Journal of Veterinary Medicine, Serie B*, *46*, 137–140. <https://doi.org/10.1111/j.0931-1793.1999.00214.x>

11. ANEXOS

ANEXO I. Protocolo de ELISA “Parachek 2”

Preparación de reactivos:

- Solución de Lavado – 20x Concentrada: Mezclar una parte de la solución de lavado concentrada 20x con 19 partes de agua desionizada.
- Preparación del conjugado: Llevar el diluyente azul a temperatura ambiente ($22\pm 3^{\circ}\text{C}$) y agitarlo bien. Realizar una dilución 1/100 del conjugado 100x suministrado en el kit con el diluyente azul previamente atemperado para obtener la dilución lista para usar.

Procedimiento:

1. Atemperar todos los componentes del kit (excepto el conjugado).
2. Diluir las muestras de suero 1/20 en diluyente verde en una placa de trabajo. Ej. 15 μl de suero o controles en 285 μl de diluyente verde si el ensayo es por duplicado o 10 μl de muestra más 190 μl de diluyente verde si el ensayo es individual. Mezclar bien ya sea con pipeta o con agitador de placas al menos un minuto a velocidad moderada. La reacción entre la muestra y el diluyente verde puede mantenerse desde 1 minutos hasta 24 horas.
3. Transferir 100 μl de las muestras test y de los controles de la placa de trabajo a los pocillos correspondientes de la placa test tapizada con *M. paratuberculosis*.
4. Cubrir e incubar 30 ± 3 minutos a temperatura ambiente ($22\pm 3^{\circ}\text{C}$). El conjugado 100x concentrado deberá diluirse a la dilución de uso una vez terminado el paso de lavado.
5. Vaciar los pocillos y lavar 3 veces con 300 μl solución de lavado. Después del último ciclo de lavado, situar las placas bocabajo sobre un papel de filtro limpio material similar para eliminar la solución de lavado de los pocillos.
6. Añadir 100 μl del conjugado recién diluido, a cada pocillo y agitar la placa.
7. Tapar las placas e incubar a temperatura ambiente ($22\pm 3^{\circ}\text{C}$) durante 30 ± 3 minutos.
8. Lavar según procedimiento descrito en el paso 5.
9. Añadir 100 μl de la solución de sustrato recién preparada en cada pocillo.
10. Tapar las placas, agitarlas e incubar a temperatura ambiente ($22\pm 3^{\circ}\text{C}$) durante 15-20 minutos.
11. Añadir 50 μl de la solución de frenado a cada pocillo. Luego mezclar agitando cuidadosamente. La solución de frenado debe añadirse a los pocillos en el mismo orden y a la misma velocidad que la solución del sustrato.
12. Leer a 450 nm, y utilizar 620 nm como longitud de onda de referencia en los 30 minutos siguientes a haber parado la reacción. Los valores de absorbancia serán utilizados para el cálculo de resultados.

ANEXO II. Protocolo de extracción de ADN de heces y suelo con kit Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep

1. Agregar 150 mg y 250 mg de materia fecal y suelo, respectivamente, en el *ZR Bashing bead lysis tube* y agregar 750 μL de *Bashing bead buffer* al tubo.
2. Agitar las muestras (especificado en materiales y métodos).
3. Centrifugar el *Bashing bead lysis tube* a 10000 g por un minuto.
4. Transferir 400 μL a la columna de *ZYMO spin III F Filter* dentro de un tubo de colecta y centrifugar a 8000 g por un minuto.
5. Agregar 1200 μL de *Genomic Lysis buffer* a lo que quedó en el tubo de colecta anterior.
6. Transferir 800 μL de la solución resultante anterior a la columna *Zymo Spin IIC* con tubo de colección nuevo y centrifugar a 10.000 g por un minuto.
7. Descartar el filtrado del paso anterior del tubo de colección y repetir el paso 6.
8. Agregar 200 μL de *DNA pre wash buffer* al *ZYMO Spin IIC* en un tubo de colecta nuevo y centrifugar a 10000 g por un minuto.
9. Agregar 500 μL de g-DNA wash buffer al *ZYMO Spin IIC* y centrifugar a 10000 g por un minuto.
10. Transferir la columna *ZYMO Spin IIC* a un tubo de 1,5 mL nuevo y agregarle 100 μL de *DNA Elution buffer*, centrifugar 30 segundos a 10000 g.
11. Colocar el *ZYMO Spin III HRC Filter* en un tubo de colecta nuevo y agregar 600 μL de *Prep solution* y centrifugar a 8000 g por 3 minutos.
12. Transferir el ADN eluido a *ZYMO Spin III HRC Filter* (anterior preparado) en un tubo de 1,5 mL nuevo, centrifugar a 16000 g por 3 minutos.
13. Conservar el ADN filtrado a -20°C .

ANEXO III. Protocolo de extracción de ADN de leche con kit Quick DNA/RNA Pathogen miniprep

1. Agregar 800 μL de *DNA/RNA Shield* al tubo cónico conteniendo la muestra (pellet), mezclar y transferir a *ZR Bashing bead lysis tube*.
2. Agitar en FastPrep24 con 2 ciclos a 6m/s durante 40 segundos.
3. Centrifugar a 12,2 rpm por un minuto y transferir a un tubo de 1,5 mL.
4. Agregar 6 μL de *proteinase K* y 500 μL de *Pathogen DNA/RNA buffer*, agitar e incubar a 56°C por 30 minutos.
5. Transferir a la columna de *ZYMO spin IICR* dentro de un tubo de colecta, centrifugar a 12,2 rpm por un minuto.
6. Descartar el filtrado del paso anterior del tubo de colección, agregar 500 μL *Pathogen DNA/RNA Wash Buffer* y centrifugar a 12,2 rpm por un minuto.
7. Descartar el filtrado y repetir el paso 6.
8. Descartar el filtrado, agregar 500 μL de etanol y centrifugar a 12,2 rpm por un minuto.
9. Transferir la columna *ZYMO spin IICR* a un tubo de 1,5 mL y agregarle 30 μL de *ZymoBIOMIC DNase/RNase-Free Water*, centrifugar por un minuto a 16000 g.
10. Agregar 30 μL de *ZymoBIOMIC DNase/RNase-Free Water*, centrifugar por un minuto a 16000 g.
11. Conservar el ADN filtrado a -20°C.

ANEXO IV. Frotis de materia fecal o de colonias de cultivo y tinción de ZN para observación de MAP

Procedimiento para realizar el frotis de materia fecal o de colonias del cultivo:

1. Sumergir el ansa de 10 µl en PBS estéril y colocar la gota en el centro del portaobjetos.
2. Con la misma ansa, tomar una muestra de materia fecal o una colonia del cultivo, colocarla en la gota de PBS y realizar un extendido delgado.
3. Dejar secar al aire.
4. Fijar por inmersión en metanol.

Tinción de los frotis con ZN:

1. Colocar la solución de fucsina fenicada de Ziehl sobre los frotis hasta cubrir completamente y calentar sobre la llama del mechero hasta ver el desprendimiento de vapores blancos, el tiempo mínimo de coloración de la fucsina es de 5 minutos (en cuanto comienzan a desprenderse vapores blancos apagar el mechero y dejar actuar la fucsina el tiempo restante), dejar enfriar a temperatura ambiente.
2. Enjuagar con agua destilada o desionizada a baja presión.
3. Cubrir completamente los cortes con solución alcohol-ácido por 2 minutos.
4. Enjuagar con agua destilada o desionizada a baja presión.
5. Cubrir completamente los preparados con solución de azul de metileno por 2 minutos.
6. Enjuagar con agua destilada o desionizada a baja presión.