



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA FACULTAD DE CIENCIAS  
VETERINARIAS**

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

**“Desarrollo y aplicación de métodos diagnósticos de Paratuberculosis  
bovina a partir de muestras de leche, calostro, suero sanguíneo y materia  
fecal”**

**AUTOR: SOSA, Pedro Sebastián.**

**DIRECTOR: TRAVERÍA, Gabriel Eduardo.**

**CODIRECTOR: ALVARADO PINEDO, María Fiorella.**

**LUGAR DE TRABAJO: Centro de Diagnóstico e Investigaciones Veterinarias  
(CEDIVE). Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.**

**MIEMBROS DEL JURADO: Dra. COLAVECCHIA, Silvia  
Dra. LARSEN, Alejandra  
Dra. ROMANO, María Isabel.**

**AÑO: 2023.**

**DEDICATORIA**

Dedico este trabajo de tesis a mi familia que me infundió valores, afecto y me brindó su apoyo a la hora de estudiar y trabajar. A mis amistades, A mis compañeros de trabajo que me bancan en el día a día con los cuales compartí muestreos, laboratorio, congresos, charlas y miles de anécdotas. A mi país que me ha brindado la oportunidad de formarme como profesional y desarrollarme en aspectos de mi vida personal.

“No digas “no puedo” ni en broma, porque el inconsciente no tiene sentido del humor, lo tomará en serio y te lo recordará cada vez que lo intentes.”

Facundo Cabral.

## AGRADECIMIENTOS

Sin dudas son muchas a las personas e instituciones que colaboraron en la realización de esta tesis con las cuales estoy agradecido. Quiero agradecer a mis compañeros de trabajo: “Luis”, “Popo”, “Lore” y todo el personal del CEDIVE. Al personal de la “Asociación Cooperadora de la Estación Experimental Manantiales” (Chascomús), a Martin Garríz, Roxana Galarza, Ricardo Saharrea y “Pablo”. A Roberto Vaca, Sebastián Astoreca que colaboraron con los animales y muestreos realizados en esta tesis. Al Dr. Alfredo Rigalli por su transmisión de conocimientos en forma desinteresada. A la “Asociación de Fomento Rural de General Belgrano” y al laboratorio “LabVima”, “Mari” y “Silvia” que colaboraron con los datos de control lechero oficial.

A mis directores Travería y Alvarado Pinedo que siempre me guiaron para poder ejecutar este plan de tesis y depositaron su confianza en mí para trabajar a la par de ellos.

Agradecer especialmente a mi familia, siempre al pie del cañón a pesar de la distancia, intentando superarse cada día y enorgulleciéndome con sus logros, mis hermanas y mis viejos, a mi amor y compañera que me apoya siempre y me banca en el cotidiano.

Muy agradecido a todos.

**CITAS BIBLIOGRÁFICAS CORRESPONDIENTES A LAS PUBLICACIONES  
PARCIALES RELACIONADAS AL TRABAJO DE TESIS.**

Sosa PS, Alvarado Pinedo MF, Di Paolo LA, Peralta LM, Romero MA, Travería GE. Comparación entre un ELISA indirecto en suero y un ELISA en leche para el diagnóstico de paratuberculosis en vacas de tambo: resultados preliminares. Asociación Argentina De Veterinarios De Laboratorios De Diagnósticos (AAVLD). Rio Cuarto, Córdoba. Nov. 2018.

Di Paolo LA, Sosa PS, Alvarado Pinedo MF, Peralta LM, Romero MA, Travería GE. Paratuberculosis bovina: asociación entre la índice urea y la densidad óptica de los sueros en la técnica de ELISA indirecto. Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnósticos (AAVLD). Rio cuarto, Córdoba. Nov. 2018.

Alvarado Pinedo MF, Sosa PS, Di Paolo LA, Romero MA, Peralta LM, Travería GE, Moyano RD, Jaureguiberry M, Romano MI. ELISA urea in the diagnosis of paratuberculosis: estimation of seroprevalence in some localities of Buenos Aires province, Argentina. 14 th International Colloquium on paratuberculosis. Fecha 4-8 de junio de 2018. Rivera Maya. México. Pág. 73. Disponible en: <http://www.paratuberculosis.net/proceedings/proc14.pdf>

Sosa PS, Di Paolo LA, Alvarado Pinedo MF, Moyano RD, Travería GE. Avidity ELISA-Urea response to different antigens in sera from cattle with paratuberculosis and tuberculosis. Presentado y aceptado en el 15th International Colloquium on paratuberculosis a realizarse en Dublín Castle, Dame St, Dublín, Ireland. del 14 al 18 de junio de 2020.

Alvarado Pinedo MF, Di Paolo LA, Sosa PS, Romero MA; Peralta LM, Costa EF, Travería GE. 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. Revista Analecta Veterinaria. 2019; 39(1), 032. ISSN electrónica 1514-2590. doi: <https://doi.org/10.24215/15142590e032>

Romero MA, Alvarado Pinedo MF, Moyano RD, Peralta LM, Sosa PS, Santangelo M, Travería G. Medio de cultivo líquido para el diagnóstico de paratuberculosis bovina. Aplicación y análisis comparativo con el medio de Herrold: resultados preliminares. Revista Analecta Veterinaria. 2018; 38 (1): 50 - 55. [doi.org/10.24215/15142590e025](https://doi.org/10.24215/15142590e025)

Sosa PS. "AISLAMIENTOS EN LECHE DE *Mycobacterium avium* SUBSP. *paratuberculosis* DE BOVINOS SEROPOSITIVOS AL TEST DE ELISA". Enviado al primer congreso de microbiología veterinaria Argentina.

Sosa PS, Alvarado Pinedo MF, Travería GE. ELISA indirecto para el diagnóstico de paratuberculosis en bovinos de tambo utilizando pooles de muestras de leche. Rev med vet [En línea] 2021; 102(2):37-42. Disponible en: <http://www.someve.com.ar/images/revista/2021/Vol102/Pag-30-35-Sosa.pdf>

Sosa PS, Alvarado Pinedo MF, Di Paolo LA, Peralta LM, Travería GE. Comparación de ELISA indirecto en suero sanguíneo versus ELISA indirecto en leche, para el diagnóstico de paratuberculosis en bovinos de tambo: Realizada en la provincia de Buenos Aires, Argentina. Veterinaria (Montevideo) [Internet]. 26 de agosto de 2021 [citado 27 de agosto de 2021];57(216): e20215721602. Disponible en: <https://www.revistasmvu.com.uy/index.php/smvu/article/view/782>



## **TABLA DE CONTENIDOS/ INDICE.**

ABREVIATURAS.....	3
A) RESUMEN.....	6
B) PALABRAS CLAVE.....	6
C) TÍTULO EN IDIOMA INGLÉS.....	7
D) RESUMEN EN IDIOMA INGLÉS.....	7
E) KEYWORDS.....	7
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1. Generalidades de la enfermedad.....	8
1.2. Características del agente etiológico .....	9
1.4. Enfermedad en bovinos.....	13
1.5. Inmunopatogenia.....	15
1.6. Situación en Argentina y en el mundo .....	19
1.7. Estrategias de control .....	23
1.8. Diagnóstico .....	26
1.8.1. Métodos de diagnósticos de la PTBC en bovinos .....	27
1.9. Características del ELISAI-L.....	35
1.10. Objetivos del plan de tesis .....	39
1.10.1. Objetivos generales .....	39
1.10.2. Objetivos particulares .....	39
1.11. Hipótesis .....	39
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	40
2.1. Rodeos.....	40
2.1.1. Muestras recolectadas .....	41
2.2. Producción de antígeno.....	43
2.3. Caracterización del antígeno/ comparación con PPA y SDS-PAGE. ....	44
2.4. ELISAI en suero.....	44
2.5. ELISAI en leche .....	45
2.5.1. Titulación de reactivos en ELISAI-L. ....	45
2.5.2. Implementación de ELISAI en pools de leche.....	47
2.5.3. ELISAI en leche de tanque .....	49
2.5.4. ELISAI en calostro.....	49
2.6. Intradermorreacción con PPD Aviar .....	49
2.7. Tinción de Ziehl Neelsen.....	50

2.8. Descontaminación y cultivo en materia fecal .....	50
2.9. Producción de micobactina a partir de micobacterias .....	52
2.10. Cultivo en leche .....	53
2.11. Extracción de ADN a partir de cultivos BAAR+ .....	54
2.12. Extracción de ADN de materia fecal .....	54
2.12.1. Extracción de ADN mediante kit comercial.....	54
2.12.2 Extracción de ADN en materia fecal mediante solventes.....	55
2.13. Extracción de ADN a partir de calostro y leche.....	56
2.14. Protocolo de PCR IS900 .....	57
2.15. Protocolo de LAMP IS900. ....	57
2.16. Métodos estadísticos .....	58
CAPÍTULO 3. RESULTADOS .....	67
3.1. Producción y caracterización de antígeno. ....	67
3.2. Resultados serológicos y aislamientos de <i>Map</i> en heces. ....	70
3.2.1. Análisis ROC de ELISAI-L y ELISAI-S.....	72
3.2.2. Análisis de variables y ELISAI-L.....	77
3.3. Implementación de ELISAI-L en pools de muestras individuales.....	83
3.4 Análisis de ELISAI-L de tanque y seroprevalencia individual.....	86
3.5. Implementación de <i>Nocardia spp.</i> como pre-adsorbente en el ELISAI-S de PTBC .....	88
3.6 ELISAI-C de individuos con y sin aislamientos de <i>Map</i> en heces. Curva ROC.....	90
3.7. Evaluación de micobactinas obtenidas a partir de <i>Ms</i> , <i>M. phlei</i> , y <i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> .....	92
3.8 PCR IS900 en calostro y leche. ....	95
3.9. Aislamientos de <i>Map</i> en leche y su asociación con los diferentes métodos de diagnóstico de PTBC. ....	98
3.10 PCR y LAMP en materia fecal de individuos positivos al cultivo.....	102
CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN .....	104
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES.....	117
BIBLIOGRAFÍA.....	119
ANEXOS .....	140

## **ABREVIATURAS.**

**ABTS:** sustrato cromógeno [2.2-azino bis (3 etilbenzotiazolina 6 ácido sulfónico)]. Anhidro PM. 54870.

**ADN:** ácido desoxirribonucleico.

**AGID:** inmunodifusión en gel de agar.

**AUC:** área bajo la curva.

**BAAR:** bacilos ácido alcohol resistentes.

**C+:** control positivo.

**CFL:** cabina de flujo laminar.

**Chi<sup>2</sup>:** test Chi-cuadrado.

**Conjugado:** anti-IgG bovina conjugada con la enzima peroxidasa de rábano rustico.

**DO:** densidad óptica.

**DOLT:** densidad óptica en leche de tanque.

**DS:** desvío estándar

**EC:** enfermedad de Crohn.

**EJ:** enfermedad de Johne.

**ELISAI:** ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas indirecto.

**ELISAI-S:** ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima en suero.

**ELISAI-L:** ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima en leche.

**ELISAI-C:** ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima en calostro.

**ELISAip-L:** ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima en pooles de leche.

**ELISAI-LT:** ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima en leche de tanque.

**FN:** falso/s negativo/s.

**FP:** falso/s positivo/s.

**gr:** gramos.

**C°:** grados centígrados.

**Has:** hectáreas (10000 m<sup>2</sup>).

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** peróxido de hidrogeno.

**H<sub>2</sub>OD:** agua destilada.

**HPC:** cloruro de hexadecil piridinio.

**IC 95%:** intervalo de confianza del 95%.

**ICB 95%:** intervalo de credibilidad bayesiana del 95%.

**Ig:** inmunoglobulinas.

**IL:** interleuquina.

**IFN-γ:** interferón gamma.

**IHQ:** inmunohistoquímica.

**IS:** secuencia de inserción.

**LAM:** lipoarabinomanano.

**LAMP:** amplificación isotérmica mediada por un bucle.

**LR:** likelihood ratio o razón de verosimilitud

**LRp:** likelihood ratio positivo o razón de verosimilitud positiva.

**LRn:** likelihood ratio negativo o razón de verosimilitud negativa.

**L:** litro/s.

**Mac:** complejo *Mycobacterium avium*.

**Map:** *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*.

**M:** *Mycobacterium*.

**mg:** miligramos.

**mL:** mililitro.

**Ms:** *Mycobacterium smegmatis*.

**μg:** microgramos.

**μL:** microlitros.

**NK:** natural *killer*.

**nm:** nanómetro, unidad de medida de longitud de onda equivalente a  $1 \cdot 10^{-9}$  metros.

**Oapri:** odds a priori.

**OIE:** Organización Mundial de Sanidad Animal.

**OpostN:** odds posteriori negativo.

**OpostP:** odds posteriori positivo.

**PA:** prevalencia aparente.

**PBS:** solución fisiológica bufferada.

**PBS-T:** solución salina bufferada fosfato- tween 20 al 0.05% V/V.

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa.

**PPA:** antígeno protoplasmático de paratuberculosis.

**PPD:** derivado proteico purificado.

**pos:** porcentaje de positividad.

**PTBC:** paratuberculosis.

**ROC:** características operativas del receptor.

**rpm:** revoluciones por minuto.

**Se:** sensibilidad.

**Sp:** especificidad.

**TBC:** tuberculosis.

**Th:** linfocito T helper.

**UFC:** unidad formadora de colonia.

**VN:** verdadero negativo.

**VP:** verdadero positivo.

**VPN:** valor predictivo negativo.

**VPP:** valor predictivo positivo.

**WLA:** antígeno lisado completo (Holo-lisado).

## A) RESUMEN.

En este trabajo de tesis se desarrolló un ELISAI en leche y se evaluó la aplicación de diferentes métodos diagnósticos de paratuberculosis bovina; entre los cuales podemos mencionar al cultivo de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (*Map*) en medio líquido a partir de materia fecal y leche; las pruebas moleculares de PCR y LAMP sobre heces, leche y calostro, para la detección de material genético de *Map*. El análisis ROC sobre el ELISAI-L arrojó un AUC de 0,817 con un IC 95% (0,75-0,89). Se calculó un punto de corte de 63,9% mediante índice de Youden cuya sensibilidad fue del 72,9% (61-83%) y su especificidad de 89,7% (86,5-92,9%), el VPP fue 0,57 y el VPN fue 0,94; siendo muy similares a los resultados obtenidos en el ELISAI-S. Se elaboraron micobactinas a partir de *M. avium*; *M. phlei* y *M. smegmatis* con excelentes resultados en el desarrollo de *Map* en medio líquido M7H9. A partir de 91 muestras de leche procesadas por PCR IS900 y cultivo se obtuvieron 19 PCR positivos y 9 aislamientos de *Map*, se evidenció asociación estadísticamente significativa entre la obtención del resultado positivo de PCR IS900 en leche y el aislamiento de *Map* en heces y en leche ( $p < 0,05$ ). El ELISAI-L mostró características operativas y predictivas alentadoras para la detección de animales con PTBC lo cual permitiría una vigilancia epidemiológica no invasiva.

## B) PALABRAS CLAVE.

Paratuberculosis bovina; Diagnóstico; ELISAI-L; *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*); micobactina; PCR IS900 en leche.

### **C) TÍTULO EN IDIOMA INGLÉS.**

“Development and application of diagnostic methods for bovine Paratuberculosis from milk, colostrum, blood serum and fecal samples”.

### **D) RESUMEN EN IDIOMA INGLÉS.**

In this thesis work a milk ELISA<sub>i</sub> was developed and the implementation of different diagnostic methods for bovine paratuberculosis was evaluated, among which we can mention the culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*) in liquid medium from faecal material and milk; the PCR and LAMP molecular tests on faeces, milk and colostrum, for the detection of *Map* genetic material. ROC analysis on the M-ELISA yielded an AUC of 0.817 with a 95% CI (0.75-0.89). A cut-off point of 63.9% was calculated by Youden index with a sensitivity of 72.9% (61-83%) and specificity of 89.7% (86.5-92.9%), PPV was 0.57 and NPV was 0.94; very similar to the results obtained in the S-ELISA. Mycobactins were produced from *M. avium*; *M. phlei* and *M. smegmatis* with excellent results in the development of *Map* in liquid medium M7H9. From 91 milk samples processed by IS900 PCR and culture, 19 positive PCR and 9 *Map* isolates were obtained. There was a statistically significant association between obtaining a positive IS900 PCR result in milk and the isolation of *Map* in faeces and milk ( $p < 0.05$ ). The M-ELISA showed encouraging operational and predictive characteristics for the detection of animals with PTBC, which would allow a non-invasive epidemiological surveillance.

### **E) KEYWORDS.**

Bovine paratuberculosis; Diagnosis; M-ELISA<sub>i</sub>; *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*); mycobactin; milk IS900 PCR.

## CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Generalidades de la enfermedad.

La paratuberculosis (PTBC) o enfermedad de Johne (EJ) es una enfermedad entérica, infecciosa, crónica, e incurable, cuyo agente etiológico es *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*) (Johne y Frothingham, 1895). Afecta a rumiantes domésticos, como bovinos, ovinos, caprinos entre otras especies. Se caracteriza por ocasionar una ileocolitis granulomatosa difusa con compromiso de los linfonodos y vasos linfáticos asociados al colon y al íleon (Chiodini y col., 1984). Se ha reportado la enfermedad en ciervos, alpacas, llamas, conejos, armiños, zorros y comadreas, entre otros animales silvestres, que pueden actuar como reservorio (Beard y col., 1999; Greig y col., 1999; Maroudam y col., 2015; Barkema y col., 2017). Su principal vía de transmisión es horizontal siendo la más común fecal-oral, también está descrita su diseminación por calostro, leche y la vía vertical (Körmendy, 1988; Streeter y col., 1995; Sweeney, 2011; Stabel y col., 2014; Vasini Rosell y col., 2018). El período de incubación es de 2 a 8 años tras el cual se evidencia clínicamente con diarreas, edemas en zonas declives, caquexia y muerte (Chiodini y col., 1984; Clarke y col., 1994; Manning & Collins., 2001). A nivel productivo ocasiona una reducción en la producción de leche, carne y eliminación prematura de los animales infectados, esta última se aconseja como medida para evitar la propagación de la enfermedad (Ott y col., 1999; Tiwari y col., 2006., 2008; García y Shalloo, 2015; Maroudam y col., 2015; Smith y col., 2016; Barkema 2017). No existe tratamiento con antibióticos aplicable en la práctica actual, los estudios realizados indican que sería necesario medicación diaria durante periodos prolongados con resultados de carácter paliativo, sin cura definitiva (St-Jean & Jernigan, 1991).

Si bien existen diferentes posturas en cuanto a la potencialidad zoonótica de *Map* entre los investigadores en todo el mundo, la gran similitud clínica patológica entre EJ y la enfermedad de Crohn (EC) junto a los aislamientos de *Map* y otras micobacterias del complejo *avium* en pacientes con EC (Chiodini y col., 2012; Rathnaiah y col., 2017) refuerzan dicha hipótesis. También se la ha asociado con otras enfermedades de base autoinmune como la tiroiditis de Hashimoto, a favorecer la progresión del VIH, enfermedad inflamatoria intestinal, colitis ulcerosa, sarcoidosis, y diabetes mellitus. La PTBC se ha clasificado como enfermedad zoonótica epidémica de tipo B según la OMS, que se transmite al ser humano a través del consumo de productos lácteos y cárnicos. (Fortea Ormaechea y col., 2009; Hermon Taylor & Bull, 2002; Liverani y col., 2014; Timms y col., 2016; Eslami y col., 2019). De existir dicha relación entre EC y *Map*, el consumo de leche comercial contaminada con *Map* sería la principal vía de exposición para los seres humanos (Paolicchi y col., 2012; Timms y col., 2016; Eslami y col., 2019).

## **1.2. Características del agente etiológico**

*Map* es un bacilo de 1-2  $\mu\text{m}$  de longitud por 0,2-0,5  $\mu\text{m}$  de ancho, es aerobio e inmóvil, intracelular facultativo, posee la capacidad de sobrevivir en los macrófagos (Ramírez y col., 2013), no presenta esporos, cápsula, ni toxinas, y es de crecimiento lento, con un tiempo de generación de 20 a 24 horas (Lambrecht y col., 1988; Vincent Levy-Frebault & Portaels 1992; Bannantine y col., 2003). Si bien desde el punto de vista tintorial se podría definir como Gram positivo, no se tiñe con cristal violeta. Son ácido-alcohol resistentes cuando se tiñen con Ziehl Neelsen, característica otorgada por su pared celular gruesa, hidrofóbica, cerosa y rica en contenido de ácidos micólicos de 60 a 90 carbonos. (Maroudam y col., 2015). Podemos distinguir una capa exterior en su pared formada por ácidos

micólicos, lipoarabinomananos (LAM) y una capa interna donde se encuentran péptidoglicanos, arabinogalactanos y los manósidos de fosfatidil inositol los cuales juntamente con los lipomananos son los precursores de LAM (Adams y col., 1994; Clarke, 1997; Souza y col., 2007). LAM puede estar asociado a manosa o arabinomananos formando el LAM-manosa y el LAM-arabinomanano respectivamente, las cuales son moléculas características de las micobacterias patógenas. (Hett y Rubin, 2008; Thirunavukkarasu y col., 2014). (Figura 1).

La dureza de su pared le aporta resistencia en el medio ambiente y ante la acción de agentes desinfectantes. Su sobrevivencia se ve favorecida por diversos factores como: pH ácido, presencia de hierro y de materia orgánica, pudiendo llegar a subsistir por un período de 1 año o más (Manning y Collins, 2001). También se reconocen formas durmientes o de resistencia de las bacterias no esporuladas, donde ante condiciones no favorables la micobacteria responde disminuyendo el metabolismo y es transitoriamente refractaria al crecimiento *in vitro* (Whittington y col., 2004; Fecteau y col., 2013).

En su ADN contiene un 69,3% de G+C, (Vincent Levy-Frebault & Portaels 1992). Se adapta a crecer en medios que contienen amonio o aminoácidos y glicerol como fuente de nitrógeno y carbono, respectivamente (Maroudam y col., 2015). En medios sólidos presenta desarrollo posterior a los 7 días, no produce pigmento, por lo que encuadra en el grupo III de la clasificación de Runyon. (Juste y col., 1991; Harris y Barletta, 2001; Manning y Collins, 2001). Se precisan desde 8 a 16 semanas para poder visualizar la formación de colonias, en cultivos a base de huevo, medios sintéticos y hasta 6 meses para poder definir un cultivo como negativo (Chiodini y col., 1984; Dimareli-Malli y col., 2013; Whittington y col., 2013), la temperatura óptima de crecimiento es de 37°C. Una característica específica de especie es el requerimiento de suplementación con micobactina J, un agente quelante del hierro, necesario como factor de crecimiento para su

desarrollo *in vitro* (Lambrecht y col., 1993; Schwartz y col., 2001). Calidad utilizada tradicionalmente para poder diferenciarla de otras micobacterias no patógenas o atípicas, inoculando medios con y sin dicho sideróforo (Juste y col., 1991; Stevenson, 2015). Con la secuenciación del genoma de *Map* y su análisis se comprendió que la dependencia de micobactina estaría asociada a la delección del gen *mbtA*, el cual se encuentra relacionado con el operón de síntesis de micobactina. (Li y col., 2005; de Kruijf y col., 2017).

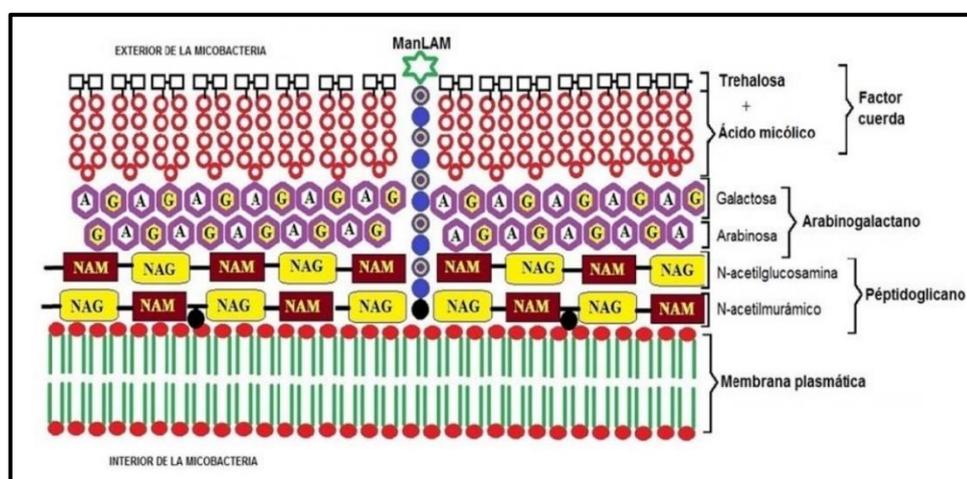


Figura 1. Constitución de la pared de las micobacterias. Desde el interior hacia el exterior de la bacteria se encuentra: membrana plasmática, peptidoglucano, arabinogalactano, ácidos micólicos y trehalosa. ManLAM (lipoarabinomanano unido a manosa). Extraído de: Patogenicidad microbiana en Medicina Veterinaria. [Patogenicidad microbiana en Medicina Veterinaria \(unlp.edu.ar\)](http://Patogenicidad%20microbiana%20en%20Medicina%20Veterinaria%20(unlp.edu.ar))

La presencia de nidos de bacilos fucsias, a la coloración de Ziehl Neelsen también es común en *Map*. (Figura 2). Molecularmente podemos darle identidad a *Map*, determinando la presencia de la secuencia de inserción específica IS900 o IS1331; que sirve de diana para su detección por pruebas de PCR y su diferenciación por RFLP ISMav2 (Strommenger y col., 2001) o en la identificación de polimorfismos de IS1311 (Collins y col., 1989; Green y col., 1989; Whittington y col., 2001ab; Whittington y col., 2000a). El elemento IS900 está presente en 17 copias dentro del genoma de *Map* K-10 y en 14-18 copias en los aislados de *Map*

(McFadden y col., 1987; Green y col., 1989) proporcionando un marcador altamente específico para su identificación precisa, así como para la subclasificación en subconjuntos de tipo I (Sheep), tipo II (Cattle) y tipo III (Intermedio) (Collins y col., 1990; Bauerfeind y col., 1996; Pavlik y col., 1999; Whittington y col., 2001b).

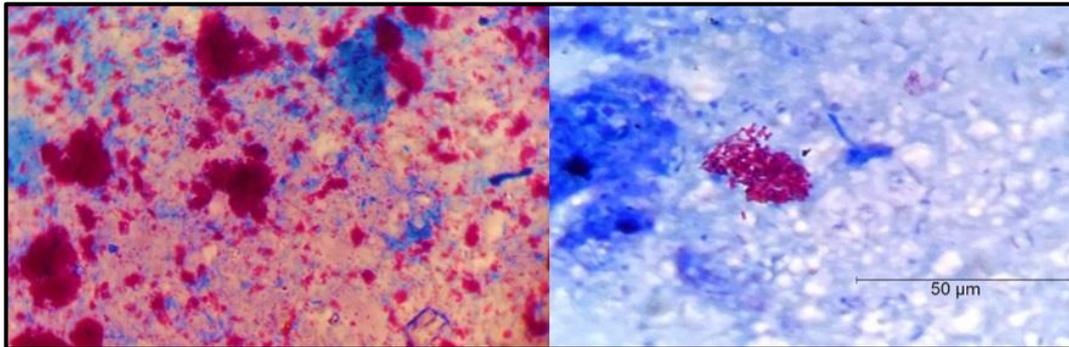


Figura 2. Microfotografías 100X, coloraciones de Ziehl Neelsen realizadas a partir de materia fecal (izquierda) y medio de cultivo líquido M7H9 (derecha) en las cuales se aprecian BAAR de color fucsia y grupos compatibles con *Map*.

### 1.3. Taxonomía

*Map* pertenece al filo *Actinobacteria*, orden *Actinomycetales*, familia *Mycobacteriaceae*, género *Mycobacterium* (*M.*), y dentro de este género pertenece al complejo *M. avium* (*Mac*), que comprende un grupo de micobacterias patógenas para los animales y el hombre ampliamente distribuidas en el medio ambiente, en el cual podemos distinguir dos especies: *M. avium* y *M. intracellulare*. *M. avium* cuenta con 4 subespecies basadas en el análisis de la secuencia de RNA ribosomal 16S-30S que son *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *hominissuis*, *M. avium* subsp. *silvaticum* y *Map* es clasificada a su vez en tipo I (“S” ovina), tipo II (“C” bovina), tipo III (“I” Intermedia) y últimamente “B” Bisón. (whittington y col., 2001a; Rindi y col., 2014).

#### 1.4. Enfermedad en bovinos

Los individuos que presentan la enfermedad clínica diseminan a *Map* en altas cargas a través de materia fecal ( $100\text{-}10^{12}$  UFC/gr de MF) y leche (2-200 UFC/ml de leche) (Giese y Ahrens, 2000; Rademaker y col., 2007). El calostro de las madres infecciosas y clínicas representa un alto riesgo de exposición para los terneros (Nielsen y col., 2008). Se ha descrito la vía de transmisión vertical en hijos de vacas positivas, la cual puede alcanzar un riesgo de infección que va desde el 20% al 40% (Whittington y col., 2009b; Belo Reis y col., 2016). Aproximadamente el 10% de los bovinos infectados desarrollarán una forma progresiva de la enfermedad hasta su muerte (Koets y col., 2015). La categoría de mayor susceptibilidad son los terneros menores a un año de edad, sobre todo en las primeras semanas de vida con una dosis infectante de  $1 \times 10^3$  UFC, dicha susceptibilidad está dada por la gran extensión del tejido linfoide asociado a las mucosas (MALT) representado por las placas de Peyer las cuales contienen numerosas células M, que funcionan como portal de ingreso para *Map*, en combinación con un sistema inmune en desarrollo (Windsor y col., 2010; Bermúdez y col., 2010; Barkema y col., 2017; Rathnaiah y col., 2017). La enfermedad en los bovinos rara vez se evidencia clínicamente antes de los 2 años de adquirida la infección, siendo común la manifestación de su signología entre los 2 a 8 años de edad. Los signos clínicos incluyen diarreas intermitentes que luego se vuelven constantes, sin síndrome febril; edemas en zonas declives, siendo clásico en la región submandibular; caquexia y muerte. A su vez predispone a otras patologías como mastitis, baja calidad de leche, y disminución de la fertilidad (Ozsvari y col., 2020; Bates y col., 2018). El extenso curso subclínico facilita su diseminación en el rodeo, generando un fenómeno conocido como “iceberg”, o “pirámide”, en la cual los animales clínicamente afectados son

la punta y la base está conformada por un mayor número de individuos recientemente infectados, pertenecientes a categorías más jóvenes. En el desarrollo de la EJ podemos distinguir 4 fases bien definidas: fase I o infección silente; fase II, portador inaparente o subclínico; fase III o clínica incipiente y fase IV o clínica avanzada. (Tabla 1).

En animales jóvenes infectados se presentan los estadios de infección silente e infección subclínica, durante los cuales, es complejo identificar la enfermedad con los métodos diagnósticos actuales (Tiwari y col., 2008). Estas fases se caracterizan por la ausencia de signos clínicos, la diseminación de *Map* en las heces es baja e intermitente, comienza aproximadamente unos 18 meses antes de la aparición de signología y las lesiones histopatológicas graves suelen estar ausentes. Por lo cual los individuos que se encuentran en etapas de infección subclínica también son importantes desde el punto de vista epidemiológico. En estos animales el desarrollo de la respuesta inmune celular estimulada por el INF $\gamma$  producido por los linfocitos Th1 es fundamental en la defensa del hospedador para evitar la progresión de la enfermedad, restringiendo la replicación de la bacteria. La respuesta humoral se hace evidente al final de la fase II, si bien los anticuerpos no confieren protección sobre la enfermedad y su progresión, su detección es de utilidad en el diagnóstico serológico. El diagnóstico en las fases III y IV es menos complicado, la presencia de signos clínicos, la diseminación de *Map* en materia fecal es particularmente elevada  $1 \times 10^{6-8}$  UFC/gr (Jørgensen, 1982; Whittington y col., 2000b), si tomamos en cuenta que la dosis infectante en un ternero es  $1 \times 10^3$  UFC, los individuos con signos clínicos serían la principal fuente de contagio. En la bibliografía también se han descrito los animales super eliminadores refiriéndose a aquellos que eliminan 10000 o más micobacterias por gr de materia fecal que las que normalmente excreta un animal con PTBC. Esta condición se

produce a consecuencia del progreso de la enfermedad, es decir, cualquier vaca con eliminación de *Map* en sus heces puede convertirse en súper-eliminador si no se descarta del rodeo (Collins y col., 2005). Los animales clínicamente afectados en esta fase IV de la EJ generalmente sucumben a la infección en cuestión de semanas.

Características	I: Infección silente	II: Portador inaparente	III: Enfermedad clínica	IV: Enfermedad Clínica avanzada
<b>Replicación de <i>Map</i></b>	Lenta proliferación en mucosa yeyunal e ileal, diseminación a los linfonodos regionales	Replicación continua en tejidos infectados	La infección se disemina y <i>Map</i> está presente en tejidos extraintestinales	Proliferación generalizada y replicación de <i>Map</i>
<b>Diseminación</b>	Diseminación en materia fecal intermitente y en bajas cantidades	<i>Map</i> se elimina por materia fecal y posiblemente por leche	Incremento del número de <i>Map</i> en materia fecal y leche	Eliminación de gran cantidad de <i>Map</i> en materia fecal y leche. >10000 UFC/gr. Super eliminadoras
<b>Respuesta inmune celular (RIC)</b>	Th1 RIC iniciada para el control de la infección	Incremento de la RIC con cambio gradual de Th1 Th2.	Puede o no ser detectable	Posible anergia
<b>Respuesta inmune humoral</b>	No detectable	Incremento de respuesta humoral incremento de IgG2, IgG1	Predominio de fuerte respuesta humoral.	Predominio de fuerte respuesta humoral. Podría ser enmascarada en casos de hipoproteïnemia
<b>Signos clínicos</b>	Ausencia	Ausencia	Pérdida de peso gradual y diarrea	Emaciación profunda diarrea, edema en botella, caquexia
<b>Cambios histopatológicos</b>	No detectables	Granulomas detectables en múltiples tejidos examinados	Abundantes linfocitos, macrófagos epitelioides y células gigantes en tejidos infectados.	Abundancia de linfocitos y macrófagos epitelioides.

Tabla 1. Características de las distintas fases de la PTBC durante su progreso al cuadro de EJ.

### 1.5. Inmunopatogenia.

A pesar de que la PTBC fue descrita en 1895 todavía hay aspectos de su patogenia desconocidos. La respuesta de los hospedadores es variable, hay

individuos que enferman, otros en los que persiste en forma latente durante años o incluso toda la vida, y hay animales que la superan (Clarke, 1997; Sweeney, 2011). Los factores que tienen influencia en estos resultados probablemente son: la dosis y vía de infección, la virulencia de la cepa, el estatus inmunológico local y sistémico, los genes de resistencia del hospedador que regulan la presentación antigénica y la respuesta intracelular, también factores medioambientales, entre otros. Describiremos brevemente la inmunopatogenia a fin de comprender sus principales aspectos y su importancia a nivel diagnóstico.

Tras el ingreso por vía oral *Map* es captada por las células M de las placas de Peyer ileales, infecta los macrófagos epitelioides intestinales y linfonodos mesentéricos en menos de 24 horas (Momotani y col., 1988).

Comparadas con las del yeyuno, las placas de Peyer del íleon contienen escasez de células T, y presentan su máximo desarrollo en el rumiante joven, condición que favorece el ingreso de las micobacterias de vida intracelular.

La infección por *Map* parece seguir patrones observados en infecciones por otras micobacterias como: *M. leprae*, *M. bovis* o *M. tuberculosis*. Que implican una respuesta inicial durante la etapa subclínica de tipo Th1 la cual se caracteriza por lesiones incipientes y focales, de tipo “tuberculoide”, que se componen de escasas células epitelioides, macrófagos, linfocitos y una respuesta inmunitaria de perfil celular, con baja presencia de BAAR (Orme., 1993).

Durante la respuesta Th1 se producen INF $\gamma$ , IL-2 y TNF $\alpha$ , citoquinas que median la respuesta inmune mediada por células, necesaria para contener la infección intracelular (Ramakrishnan, 2012; Koets y col., 2015), que puede durar meses o años. Una característica importante de *Map* es su persistencia dentro de las células del sistema fagocítico mononuclear, con escaso desarrollo de lesiones, que progresan a una inflamación granulomatosa (Koets y col., 2015). (Figura 3).

Los macrófagos infectados, liberan IL-8, FNT $\alpha$  e IL-6. La IL-8 actúa como factor quimiotáctico de linfocitos T (Orme y Cooper, 1999; Orme y Basaraba, 2014) que una vez reclutados y activados, mediante la presentación de antígenos, secretan IFN- $\gamma$  para estimular a otros macrófagos adicionales, por lo que juegan un papel principal en la eliminación de las micobacterias (Flesch y Kaufmann, 1988; Gessani y col., 1998; Sica y Mantovani, 2012; Martínez y Gordon, 2014). El TNF- $\alpha$  estimula la salida de nuevos monocitos sanguíneos hacia el foco de infección y junto a la IL-6 la diferenciación posterior de macrófagos a células epitelioides, con una marcada actividad bactericida (Fitzgerald y col., 2014).

Al debilitarse la inmunidad celular, proceso aun no del todo dilucidado, la enfermedad progresa acompañada de un incremento de anticuerpos séricos, preponderantemente del isotipo IgG1, con la aparición de signos clínicos (Nielsen y Toft, 2006; Stabel, 2010; Sweeney, 2011). El hecho de que las respuestas inmune celular y humoral se desarrollen de forma conjunta pone en duda la hipótesis sobre la transición de una respuesta de tipo Th1 a la Th2 (Begg y col., 2011; Vázquez y col., 2013). Los linfocitos Th2 estimulan la producción de citocinas que coordinan una respuesta inmune humoral (IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10). Además, una elevación concomitante de TNF- $\alpha$  contribuye a la emaciación a través de la estimulación del catabolismo tisular (Adams y col., 1995; Alzuherri y col., 1996; Beutler y col., 1980). Se vuelven patentes la pérdida de peso y diarrea intermitente, cuando el sistema inmune se vuelca al efecto Th2, se establecen lesiones menos organizadas de tipo "lepromatoso" (Koets y col., 1990; Stabel y col., 1990), que se corresponderían con lesiones difusas multibacilares, con gran cantidad de macrófagos y células epitelioides que contienen numerosos BAAR y provocan una fuerte respuesta inmunitaria humoral (Tanaka y col., 2005). El infiltrado de células inflamatorias, hace que la pared intestinal se engrose y pierda su función, lo que conduce a una mala absorción y enteropatía perdedora de

proteínas (Patterson y col., 1967; Sweeney, 2011). Existen citocinas encargadas de controlar la acción de los macrófagos ya que podrían causar daño tisular como consecuencia de una respuesta exacerbada. Se considera que la IL-10 ejerce un efecto supresor en la expresión de citocinas Th1, en la inflamación y en la activación inmunitaria (inhibe la activación de linfocitos T) (Weiss y col., 2005), regula negativamente la expresión de CMH II, atenuando la presentación antigénica de los macrófagos (de Silva col., 2011). Los niveles elevados de progesterona, entre otras hormonas asociadas a la preñez, favorecen una respuesta del perfil Th2, los cuales generan citoquinas antiinflamatorias beneficiosas para mantener la gestación, pero que también reducen la respuesta Th1 y la producción de IFN- $\gamma$  favoreciendo el desarrollo del perfil Th2, por lo cual es usual que, en hembras, se asocie la manifestación de EJ durante el post parto. En animales con lesiones graves de PTBC se ha observado un perfil mixto de citocinas Th1 y Th2, junto a una mayor expresión de IL-10 de efectos antiinflamatorios e inmunosupresores (Coussens y col., 2004; Shu y col., 2011). Si bien los efectos de las respuestas inmunes celular y humoral se describen cronológicamente separados, en ocasiones suele haber solapamiento de ambos perfiles, demostrando una variación muy individual en la respuesta (Brown y col., 1998; Clark y col., 1996; Nielsen, 2014; Koets y col., 2015). Por lo que se considera que puede haber una transición gradual conforme progresa la enfermedad hacia formas lesionales más graves (Coussens y col., 2004; Begg y col., 2011; Shu y col., 2011). En esta fase de infección, *Map* puede diseminarse en forma extra intestinal, como lo demuestran las lesiones compuestas de macrófagos infiltrantes llenos de BAAR en el riñón, el hígado, la glándula mamaria, etc. (Pavlik y col., 1990; Antognoli y col., 2008).

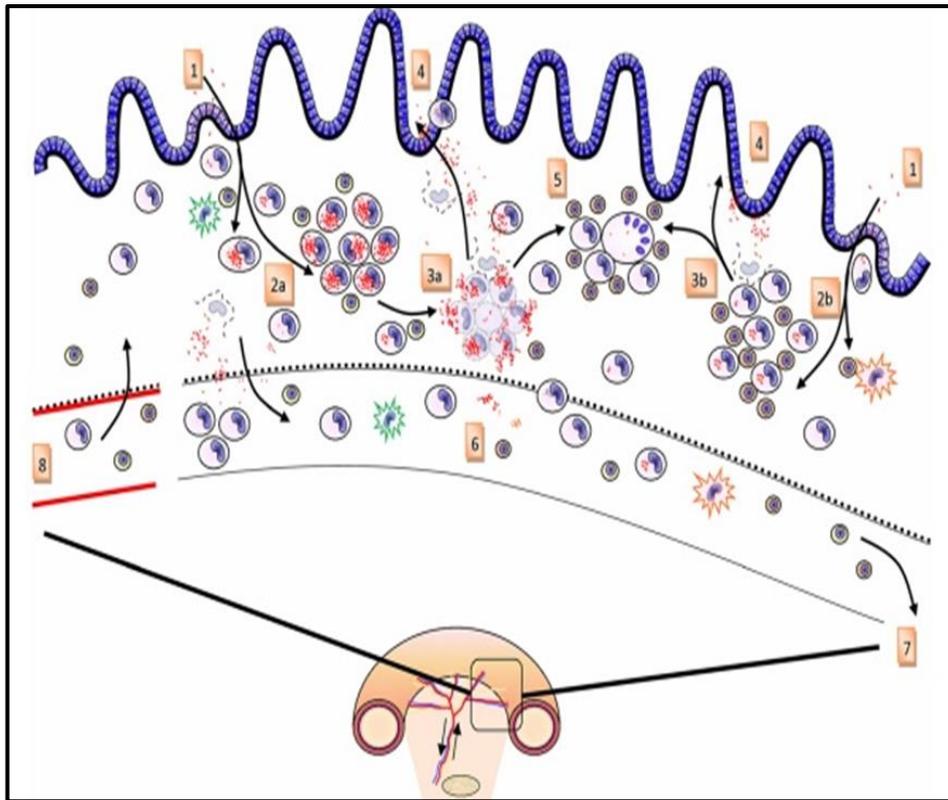


Figura 3. Modelo de la dinámica del granuloma de la PTBC bovina.

*Map* atraviesa el epitelio intestinal (células M y enterocitos) mediante transcitosión (1) y es captado por macrófagos en la lámina propia. Posteriormente, el granuloma se convertirá en una lesión pluribacilar (2a) o paucibacilar (2b), respectivamente. Dependiendo de que se alcance la ruptura debido a la replicación bacteriana (3a) o al final de la vida útil natural de los macrófagos (3b), al morir los macrófagos liberarán *Map* y sus antígenos en la lámina propia. *Map* libre entrará en el lumen intestinal lo que conducirá a la diseminación en las heces (4). Los restos celulares de la lesión se eliminarán dando lugar a la formación de tejido cicatricial caracterizado por células gigantes multinucleadas. *Map* y sus antígenos captados por las células fagocíticas que residen en la lámina propia pueden extenderse a diferentes lugares del intestino y reiniciar formación de una lesión o entrar en la linfa aferente (6) y migrar al ganglio linfático regional, causando lesiones en los mismos o la activación de linfocitos T y B cuando son captadas y procesadas adecuadamente por las células presentadoras de antígenos (7). Posteriormente los linfocitos T activados y los anticuerpos derivados de las células plasmáticas, así como los monocitos entrarán en el intestino a través del lecho capilar arterio-venoso (8). Adaptado de Koets y col., 2015.

## 1.6. Situación en Argentina y en el mundo

En Argentina la PTBC en bovinos fue descrita por primera vez por el Dr. Francisco Conrado Rosenbusch en 1932 (Rosenbusch, 1937). Se ha reportado en rodeos de la provincia de Buenos Aires como una de las principales causas

infecciosas de muerte en bovinos adultos (Costa y col., 2004; Moreira y col., 1994), en cuanto a el estudio de su prevalencia podemos mencionar múltiples autores con estimaciones más bien regionales y en estudios retrospectivos, basados en serologías como se resumen en la tabla 2. En la cuenca del Salado, provincia de Buenos Aires se estimó una seroprevalencia predial del 81% e individual que oscila entre el 5% y el 15,7% (Costa y col., 2004; Moreno y col., 2017; Paolicchi y col., 2003), estimaciones recientes arrojaron una seroprevalencia predial de 78,8% e individual de 13% (Alvarado Pinedo y col., 2019). Las pérdidas por PTBC en la región previamente mencionada fueron estimadas en USD 22 millones en producción de cría y en USD 6,3 millones para las cuencas lecheras de la provincia de Buenos Aires (Passucci y col., 2007). Se ha postulado que ésta sería una de las enfermedades infecciosas más costosas para la industria láctea en USA, provocando pérdidas anuales estimadas en USD 200-250 millones (Ott y col. 1999). La falta de estudios longitudinales que evidencien las pérdidas económicas directas e indirectas que ocasiona la EJ minimiza la problemática a nivel nacional favoreciendo el crecimiento de su prevalencia. En Argentina no contamos con vacunas aprobadas por Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), tampoco con un plan de control oficial, son pocos los laboratorios con la tecnificación suficiente para su diagnóstico temprano, generando la necesidad de desarrollo en producción de reactivos biológicos, para diagnóstico y prevención, en la difusión y transferencia de tecnologías que permitan implementar un plan de control a nivel nacional, con un fuerte criterio consensuado sobre las medidas de manejo en los distintos contextos productivos. Motivados por la posible implicancia zoonótica en nuestro país se han realizado estudios para demostrar la presencia de *Map* en alimentos de origen lácteo, con resultados diversos. Cirone y col. (2007) demostraron que *Map* puede permanecer viable en quesos de origen caprino y bovino hasta 60 y 45 días después de la maduración

respectivamente. Paolicchi y col. (2012) reportaron aislamiento de *Map* en un 2,86% (2) de 70 muestras de leche pasteurizada y ultra pasteurizada estudiadas, lo cual suscita preocupaciones en materia de salud pública. Mundialmente afecta tanto a países subdesarrollados como desarrollados de Europa, Norteamérica, Sudamérica, Asia, Australia y África. En una encuesta realizada en 48 países, se reveló que, en aproximadamente la mitad de los países más del 20% de los rodeos presentaban la enfermedad. Si bien la PTBC es de declaración obligatoria sólo en 22 países se registraron planes de control oficiales y en su mayoría son voluntarios. El 76% de los países que no contaban con un programa oficial de control de PTBC, se encontraban en Asia, África, América del Sur y Central. La reducción de la prevalencia era el principal objetivo en la mayoría de los países, solo Noruega y Suecia pretendían erradicar la enfermedad. Los programas de control fueron considerados exitosos en 16 (73%) de los 22 países. Como conclusión esta encuesta afirmó que en este contexto mundial la PTBC se seguirá propagando (Whittington y col., 2019).

Laboratorio	Autor/año	Seroprevalencia	Región	Explotación	ELISAI
INTA (RAF.) FCV-UNL.	Abdala y col., (2019)	<b>35,6%</b> rodeo. <b>2,1%</b> individual.	Santa Fé (Castellanos)	Tambera	Comercial <sup>1</sup>
INTA (RAF.) FCV-UNL.	Abdala y col., (2019)	<b>66%</b> rodeo. <b>9%</b> individual.	Santa Fé (San Cristóbal)	Cría/Carne	Comercial <sup>1</sup>
INTA (BAL.) INTA (CAS.)	Paolicchi y col., (2005)	<b>26,5%</b> rodeo.	Buenos Aires	Cría/Carne	PPA
INTA (BAL.) INTA (CAS.)	Paolicchi y col., (2005)	<b>56%</b> rodeo.	Buenos Aires	Tambera	PPA
INTA (BAL.) INTA (CAS.)	Paolicchi y col., (2005)	<b>2,4%</b> rodeo.	La Pampa	s/discriminar	PPA
INTA (BAL.) UC Davis, USA.	Becker y col., (2005)	<b>18,8%</b> (tasa de positividad en rodeo).	Pampa Húmeda	Tambera	PPA
INTA (BAL.) UC Davis, USA.	Becker y col., (2005)	<b>6,8%</b> (tasa de positividad en rodeo).	Pampa Húmeda	Cría/Carne	PPA
CEDIVE FCV-UNLP	Alvarado pinedo y col., (2019)	<b>5,5%</b> individual.	Buenos Aires	Cría/Carne	WLA- "in house"
CEDIVE FCV-UNLP	Alvarado pinedo y col., (2019)	<b>13,6%</b> individual.	Buenos Aires	Tambera	WLA- "in house"
CEDIVE FCV-UNLP	Alvarado pinedo y col., (2019)	<b>78,8%</b> rodeo.	Buenos Aires	s/discriminar	WLA- "in house"
INTA (BAL.)	Moreno y col., (2017)	<b>81%</b> rodeo. <b>15,7%</b> individual.	Buenos Aires	Tambera	PPA
FCV-UNRC	Magnano y col., (2002)	<b>5,3%</b> rodeo. <b>0,3%</b> individual	Córdoba (SO)	Cría/Carne	Comercial <sup>2</sup>
INTA (SAL.) INTA (BAL.)	Micheloud y col., (2014)	<b>26%</b> (seropositivos en leche de tanque)	Salta (V. de Lerna)	Tambera	Comercial <sup>3</sup>
FCV-UdeR Uruguay.	Núñez y col., (2003)	<b>70,2%</b> rodeo. <b>5,6%</b> individual.	Cuenca Sur (ROU)	Tambera	Comercial <sup>4</sup>

Tabla 2. Resumen de los trabajos de seroprevalencias realizados en distintas regiones de Argentina y Uruguay.

<sup>1</sup>(ID® VetScreen PTBC Indirect 1653-RD)

<sup>2</sup>( PTBC Verification Ab Test IDEXX®, USA)

<sup>3</sup>(ID® Screen PTBC Indirect, Test de Screening, ID Vet, Francia).

<sup>4</sup>(IDEXX® Lab HerdChek Map)

### 1.7. Estrategias de control

La presencia de *Map* en el rodeo a menudo se reconoce solo después que se ha producido su propagación (Whittington y col., 2001c). Su control depende de las medidas tomadas a nivel población, como la eliminación de los animales que excretan la bacteria en materia fecal, la aplicación de medidas higiénicas y manejo del calostro para evitar el contagio de neonatos/jóvenes. Otra alternativa es la vacunación en los países donde está disponible, este recurso reduce la incidencia y retrasa la excreción fecal de *Map* (van Schaik y col., 1996). Es para destacar que el uso de la vacuna ha sido clave en la reducción de la prevalencia intra rebaño en la industria ovina australiana, islandesa y española (Whittington y col., 2019). Resumiendo, como pilares del control podríamos mencionar tres principios básicos que son: prevenir la exposición de los animales susceptibles; identificar y eliminar los animales infecciosos e infectados por *Map*; y evitar la incorporación de animales infectados (Garry, 2011). Este último punto es el factor de riesgo más corriente para la introducción de la PTBC en el rodeo (Nielsen & Toft, 2011; Garry, 2011). Dicho esto, un plan de control coherente debería preservar los establecimientos con estatus negativo a fin de asegurarnos la reposición, en todo caso trabajar sobre un stock negativo o al menos provenientes de madres sin antecedentes de PTBC, ya que identificar o categorizar a un rodeo como negativo no es tarea sencilla con los métodos diagnósticos actuales. Siguiendo un esquema lógico debemos lograr reducir los animales infecciosos para disminuir la cantidad de infectados. (Figura 4).

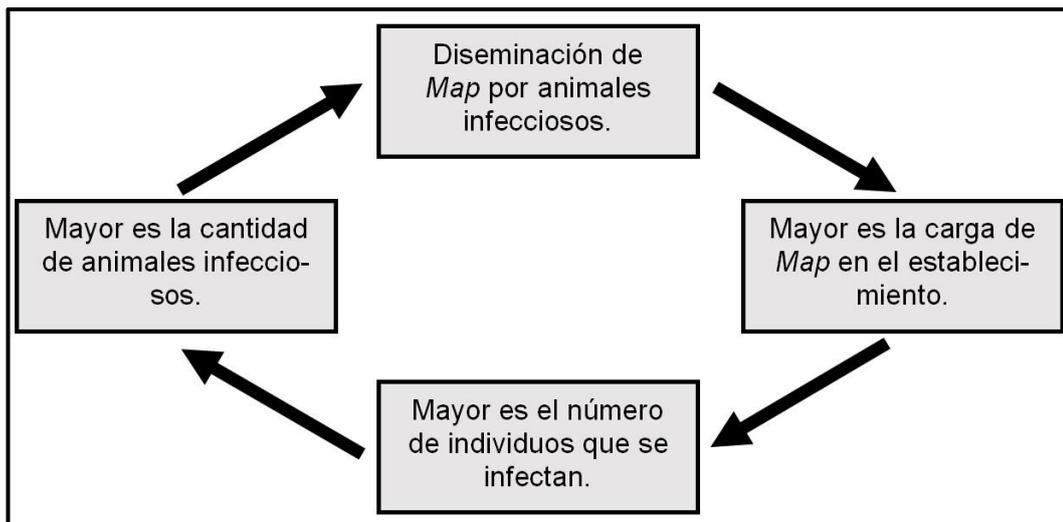


Figura 4. Representación gráfica de la transmisión de la enfermedad en el rodeo cuando no se aplica un plan de control para reducir la cantidad de animales infecciosos.

La conformidad de los productores con respecto a los resultados en el manejo de esta enfermedad puede ser baja si no se plantean claramente los objetivos con mayor factibilidad de lograrse en el tiempo, que son: disminuir la prevalencia y retrasar la aparición de signos clínicos, mediante la identificación y eliminación de animales enfermos y subclínicos ("test-y eliminación"), con planes de entre 5 a 10 años de duración como mínimo (Figura 5). Dentro de los propósitos de las técnicas diagnósticas podemos enumerar: establecimiento de poblaciones con bajo riesgo de infección (*stocks*), reducción del impacto económico en animales enfermos, confirmación de enfermedad clínica, vigilancia, estimación de prevalencia y "erradicación". Como primera acción deberíamos demostrar la presencia de la enfermedad en el rodeo, establecer su seroprevalencia para posteriormente formular un protocolo de trabajo. Para citar un ejemplo el plan de control irlandés propone realizar ELISAI en suero o leche de la totalidad del establecimiento en un primer muestreo para conocer la seroprevalencia. Posteriormente aplica PCR en materia fecal sobre los individuos ELISAI positivos a fin de confirmar, eliminar y reportar al sistema de vigilancia los positivos a la misma y los negativos, estos

últimos pasarían al rodeo nuevamente para testearse al siguiente año al igual que los serológicamente negativos (Gavey y col., 2021). La venta con destino a engorde de la progenie de vacas infectadas-conocidas, también se puede considerar como parte de la estrategia, ya que existe un riesgo alto de que la misma esté afectada. Teniendo en cuenta la supervivencia ambiental finita de *Map*, el manejo de pastoreo se puede utilizar para reducir la exposición de terneros en sistemas extensivos; en explotaciones tamberas el control del banco de calostro, el cual debería estar formado por donantes negativas, la pasteurización de la leche o uso de sustituto lácteo en la crianza artificial son algunas de las prácticas que tienden a disminuir la tasa de contagio.

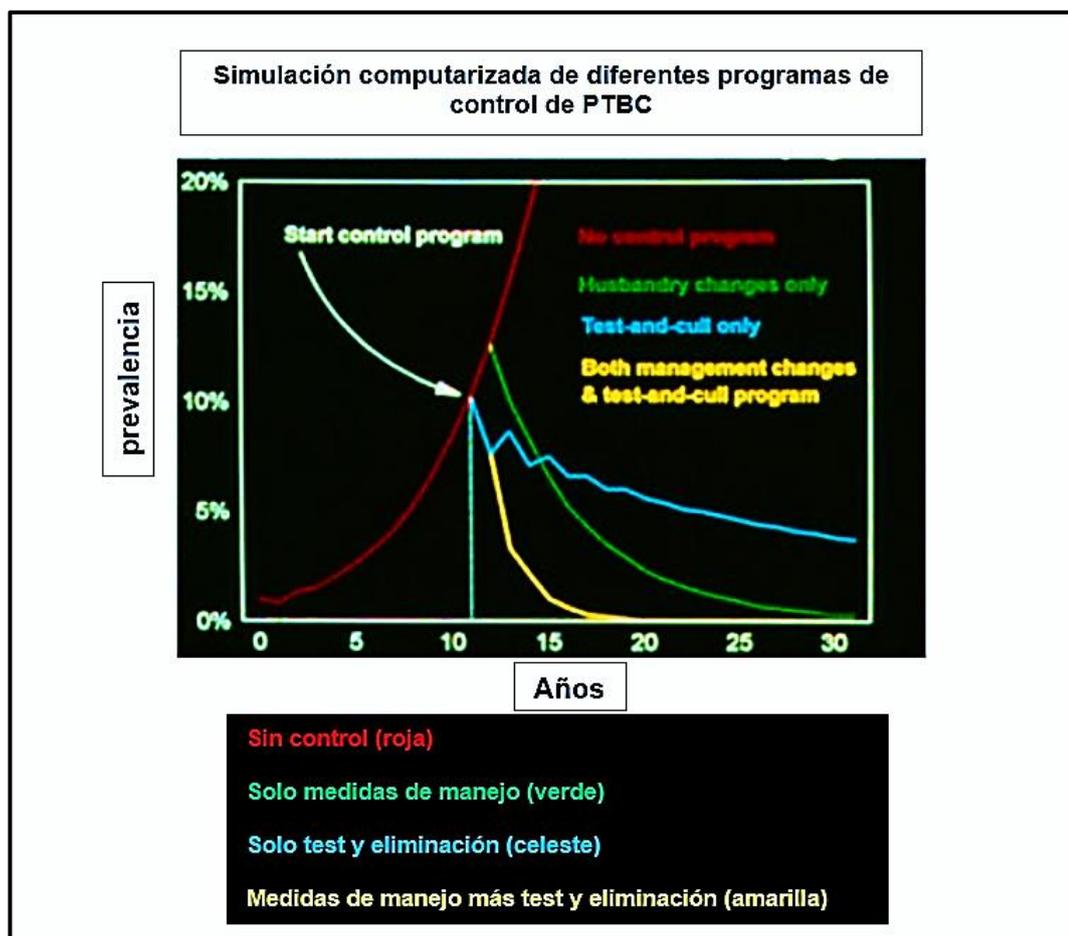


Figura 5. Progresión temporal en años de la prevalencia de la PTBC con diferentes estrategias de control. Simulación computarizada realizada por Collins & Morgan (1992) donde podemos observar que en el punto de partida con una prevalencia del 10% aplicando test y eliminación más medidas de manejo (línea amarilla) se logra disminuir la

prevalencia en menor cantidad de años que si se aplican estas medidas en forma independiente. Extraído de: Control – Johne's information Center – UW–Madison (johnes.org).

## **1.8. Diagnóstico**

En cuanto a su diagnóstico en rodeos de cría de la Argentina, sobre todo en cabañas hay una tendencia a adoptar el test de ELISA indirecto en suero (ELISAI-S) de PTBC combinando con el uso de intradermorreacción con PPD Aviar con el propósito de identificar a los reactantes, la formación de rodeos sanitarios, utilización de un resultado negativo al test de ELISAI en la preventa de reproductores con el fin de disminuir la probabilidad de vender individuos enfermos, entre otras. En lo que respecta al sector tambero las seroprevalencias descriptas son mayores que en explotaciones de cría, debido a que su grado de intensificación favorece la exposición y presencia de factores de riesgo asociados a la transmisión de la PTBC. Se suman a las alternativas diagnósticas ya mencionadas en cría, el uso de ELISAI en leche (ELISAI-L). El muestreo en leche tiene menor impacto en el bienestar animal al no implicar alteraciones en la rutina de ordeño, la extracción no genera dolor, no requiere de un encierro extra. Su acceso estaría facilitado en los establecimientos que realizan control lechero oficial, permitiéndonos coleccionar la muestra e información adicional de variables como producción en litros, días en lactancia, composición de la leche, que serían de interés en el análisis e interpretación de los resultados del ELISAI-L y en la evaluación del impacto en la producción de aquellos individuos afectados por PTBC.

A continuación, se desarrollarán las distintas alternativas diagnósticas haciendo énfasis en las aplicadas en este trabajo de Tesis.

### **1.8.1. Métodos de diagnósticos de la PTBC en bovinos**

El diagnóstico de PTBC en forma precoz es fundamental para su control a nivel rodeo, la identificación y segregación de los reactantes, junto con medidas para prevenir el contagio de los terneros, son en general las herramientas básicas con las que contamos para disminuir su prevalencia (Gilardoni y col., 2012b; Paolicchi y col. 2003; Alvarado Pinedo, 2015; Chaubey y col., 2017; Gavey y col., 2021).

Podemos clasificar a los test diagnósticos como “directos” e “indirectos” (Chaubey y col., 2017; Rathnaiah y col., 2017), los primeros son aquellos que detectan la presencia del microorganismo, incluyen el cultivo de materia fecal y técnicas moleculares para la detección de ácido nucleico como PCR, LAMP, qPCR, hibridación, entre otros. (McFadden y col., 1987; Sange y col., 2019; Yashiki y col., 2019). Y los indirectos son aquellos que evidencian la respuesta inmune generada por el hospedador contra *Map*, dentro de ellos tenemos técnicas que revelan en forma temprana la inmunidad celular como el test del INF $\gamma$  y la intradermorreacción con PPD Aviar, y test serológicos que detectan la inmunidad humoral como el ELISAI y la prueba de AGID.

#### **1.8.1.1. Métodos directos**

El aislamiento bacteriológico a partir de las heces es considerado la prueba de oro, y tiene como ventaja sobre las técnicas moleculares demostrar tanto presencia como viabilidad de *Map*, posee entre sus limitantes prolongados períodos de incubación de hasta 6 meses en medios de cultivo sólidos (Deb & Goswami 2011), 2 meses en medios de cultivo líquidos (Whittington y col., 2013; Romero y col., 2018), necesita de suplementación con micobactina, la cual, por falta de disponibilidad en el país y sus altos costos de importación, encarece el valor del cultivo (Romero y col., 2018). El tiempo de desarrollo de *Map*, sumado a

que las muestras de heces, leche y tejidos suelen estar muy contaminadas, hacen que previo a la siembra sea necesario aplicar técnicas de descontaminación, que incluyen antimicrobianos, para eliminar las bacterias y los hongos competitivos de rápido crecimiento (Whittington, 2010; Chaubey y col., 2017).

En cuanto a las características operativas la especificidad (Sp) del cultivo fecal es aproximadamente del 100% (Nielsen y Toft, 2008), mientras que la sensibilidad (Se) es del 26% para los individuos subclínicos y entre el 50% al 82% para las vacas con enfermedad clínica (McKenna y col., 2005; Tiwari y col., 2006; Whitlock y col., 2010). Muestras de leche, calostro y tejidos, estos últimos principalmente para la detección *post mortem*, son también cultivadas para aislar a *Map* (Antognoli y col., 2008; Slana y col., 2008; Stabel y col., 2014). El medio de cultivo sólido más utilizado es el de Herrold con yema de huevo (HEYM) suplementado con micobactina J. Los medios sólidos a diferencia de los líquidos nos permiten evidenciar en forma directa las colonias y realizar su conteo. En los medios de cultivo líquidos el desarrollo es más rápido que en los sólidos, pero para demostrarlo es necesario un método extra. Pueden ser teñidos o en el caso de algunos medios comerciales incluyen detección radiométrica (Bactec 460), detección por fluorescencia (Bactec MGIT 960), entre otras (Whittington, 2010).

Para reducir costos de cultivo, se puede utilizar muestras fecales ambientales y/o grupos de muestras individuales a modo de realizar un tamiz, con posterior procesamiento individual de los pools que resulten positivos (Whittington y col., 2000a; Lavers y col., 2013; Wichert y col., 2021).

Las técnicas de cultivo requieren de confirmación de *Map* con tinción de Ziehl Neelsen positiva y por métodos moleculares. Una buena práctica es la siembra del inóculo por duplicado en medios con y sin micobactina, en estos últimos *Map* rara vez desarrolla, lo cual es una característica específica de especie (Juste y col., 1991; Stevenson, 2015).

En muestras de leche y calostro la carga de *Map* es mucho menor que en las heces, por lo tanto, la sedimentación, centrifugación y filtración son pasos adicionales que pueden añadirse a los protocolos de cultivo a fin de favorecer su aislamiento (Bradner y col, 2013; Dundee y col., 2001).

Por otro lado, la probabilidad de aislamientos de *Map* en leche individual, calostro y leche de tanque a granel sería menor que para las heces, ya que la proporción de vacas con excreción fecal y concomitante diseminación a través de sus glándulas mamarias es baja (Slana y col., 2008; Jayarao y col., 2004; Streeter y col., 1995). Además, los aislamientos *Map* positivos a partir de leche deben interpretarse con cautela, por el posible riesgo de contaminación fecal durante el muestreo (Barkema y col., 2010).

Como alternativa al aislamiento e identificación de *Map*, contamos con técnicas moleculares. Se han desarrollado métodos de PCR para darle identidad a los aislamientos, y para la detección de marcadores especie específicos de *Map* en muestras clínicas de heces, leche, calostro y tejidos. La PCR, tiene como ventajas la obtención de resultados en menor tiempo que el cultivo, no requiere de técnicas de descontaminación, lo que evita la consiguiente reducción de la carga de *Map* dentro de la muestra, si bien no distingue viabilidad, detecta bacterias muertas, muy útil cuando las muestras no pueden procesarse de inmediato (Bölske y Herthnek, 2010).

El elemento de inserción IS900 es la secuencia diana de uso habitual, la PCR IS900 tiene mayor Se que el cultivo y puede detectar 10-100 UFC/ml en muestras de leche (Giese & Ahrens 2000). Sin embargo, la presencia de reacciones cruzadas con otras micobacterias que albergan secuencias de inserción similares ha impulsado el uso de otras secuencias dianas específicas de *Map*, a pesar de tener un menor número de copias dentro de su genoma (Bölske y Herthnek, 2010). Estas son hspX, F57, ISMAV2 e ISMAP02, entre otras (Ellingson y col., 1998;

Pithua y col., 2011; Hanifian y col., 2013), lo que permite que la Sp sea similar a las técnicas de cultivo (Leite y col., 2013).

Otro importante factor que puede afectar la Se y la Sp del ensayo es el número de copias de la secuencia génica seleccionada, ya que la Se aumenta con un mayor número de copias. Una desventaja de la eficacia de la PCR para la PTBC es el reto que supone la extracción de ADN de *Map*, las dificultades incluyen los inhibidores presentes en la muestra fecal, como el ácido fítico y polisacáridos complejos (Thornton y Passen, 2004; Leite y col., 2013; Hansen y col., 2019). Además, la gruesa pared celular de *Map*, que requiere técnicas de lisis más intensas, como la lisis mecánica con perlas de vidrio o sílice, u otras estrategias como el uso de perlas inmuno- magnéticas, para aumentar el éxito en la extracción de su ADN (Collins, 1993; Leite y col., 2013; Gamberale y col., 2019; Hansen y col., 2019).

La Se del método molecular dependerá de la técnica y el kit de extracción de ADN utilizados, el gen identificado, el estándar de referencia, la carga bacteriana de la muestra y la pérdida de bacterias durante el procesamiento o el almacenamiento (Bölske y Herthnek, 2010; Leite y col., 2013).

#### **1.8.1.2. Métodos indirectos**

La prueba de reacción intradérmica a la PPD Aviar y con Johnina (PPD derivado de *Map*) se utilizan de forma indistinta debido a que presentan las mismas aptitudes diagnósticas gracias a que *Map* y *M. avium* subsp. *avium* comparten el 99% del genoma, encontrándose muy relacionadas antigénicamente (Chiodini, 1984; Körmendy, 1988). La inoculación intradérmica se puede aplicar a nivel del tercio medio de la tabla del cuello o en el pliegue ano caudal interno, es importante verificar la formación del habón en el punto de inoculación como se muestra en la

Figura 6; el engrosamiento de la piel se mide con un calibre antes de la inoculación y en el momento de la lectura a las 72 horas post inoculación, la reacción se reconoce por una tumefacción en el sitio de aplicación. Se ha estimado una Se del 54% y una Sp del 79% (Ayele y col., 2001; Kalis y col., 2003), un valor predictivo positivo (VPP) bajo (22%) y un valor predictivo negativo (VPN) bueno (95%) (Cicuta, 1999; Kalis y col., 2003). Trabajos de tesis realizados en nuestro país han evidenciado una Se del 69% y una Sp del 86,2%; un VPP de 42,5% y un VPN de 91,6% (Alvarado Pinedo, 2015).

Sin embargo, esta técnica solo indica sensibilización de los animales a *Map* o al *Mac*, por lo que se sugiere aplicarla como un test preliminar a la iniciación de un programa de control (Bernardelli, 2000). La prueba de INF $\gamma$  equivale a la prueba intradérmica, pero *in vitro*. Se realiza a partir de muestras de sangre heparinizada, las cuales son enfrentadas a la PPD Aviar y PPD Bovina, siendo incubadas a 37°C durante 24 horas para posteriormente medir la cantidad de IFN- $\gamma$  producido por los linfocitos T específicos presentes en cada muestra. Como se basa en la detección del IFN- $\gamma$  el cual se secreta en las primeras fases de la enfermedad es considerada una técnica de diagnóstico precoz, la cual es importante. Como desventaja es casi impracticable en forma masiva y a campo por requerir de células vivas siendo exigente en la preservación de la muestra y en su rápido procesamiento (Stabel, 1996), el costo es elevado y su Se es baja.



Figura 6. Inoculación intradérmica en pliegue ano-caudal interno y formación del habón correspondiente (flecha roja).

La prueba de ELISAI es la técnica con mayor Se y Sp para la detección de anticuerpos contra *Map* (Cox y col., 1991; Manning y Collins, 2001; Nielsen, 2014; Yokomizo y col., 1985), una de sus ventajas es la masividad de muestras que se pueden procesar, de una forma relativamente rápida. El resultado obtenido luego de su ejecución es una densidad óptica (DO) que se correlaciona con la cantidad de anticuerpos *Map*-específicos en muestras de suero o leche (Nielsen, 2010; Hendrix y col., 2005; Sweeney y col., 1994). La Se del ELISAI generalmente es pobre, pero varía dependiendo de la prueba de oro de referencia, la condición del objetivo, la prevalencia de PTBC en el rodeo, el kit utilizado y la metodología (Nielsen y col., 2002a; Collins y col., 2005; Lombard y col., 2006; Nielsen y Toft, 2006). También varía con el nivel de excreción de *Map* en las heces y la edad de los animales, suele ser baja en los estadios iniciales, y aumenta al progresar la enfermedad (Carpenter y col., 2004; Koets y col., 2015; Nielsen, 2014). En el ganado vacuno, la Se del ELISAI está en el rango de 7-94%, y la Sp se encuentra entre 40-100% (Nielsen y Toft, 2008). Se ha demostrado que la Sp para ELISAI es inferior al 100% (McKenna y col., 2005; Nielsen y Toft, 2008). Por lo tanto, los resultados deben ser evaluados en base al propósito de la prueba, es decir si es utilizada para la detección o como tamiz (Nielsen y Toft, 2006), y por lo tanto los

reactantes deben ser seguidos con métodos de detección directa para la confirmación absoluta (Collins, 2011).

La técnica de AGID es indicada para la confirmación de la EJ en animales con presencia de signos clínicos (Sherman y col., 1984; Ferreira y col., 2002a). Se basa en la detección de anticuerpos, como la Sp de la prueba es del 100%, es una prueba fiable para detectar los anticuerpos contra *Map* (Chaubey y col., 2017). La aplicación de este ensayo en el diagnóstico de animales subclínicos es reducida (Sherman y col., 1990; Ferreira y col., 2002a). A diferencia de ELISAI, su aplicación masiva a nivel rodeo es algo limitada, utiliza en su ejecución volúmenes de reactivos mayores y por lo tanto posee menor Se analítica. La AGID ha demostrado una mayor Se y Sp que los ELISAI en pequeños rumiantes de Nueva Zelanda y Australia (Gwozdz y col., 2000; Sergeant y col., 2003).

La cronicidad de la PTBC vuelve el diagnóstico un desafío, en el cual para optimizar el uso y combinación de los test diagnósticos disponibles se debe tener en cuenta la existencia de los 4 estadios de la enfermedad descritos en el apartado 1.4 de este trabajo de tesis. La aplicación de cada uno de los test mencionados con mayor o menor capacidad diagnóstica está íntimamente relacionada con el desarrollo de la inmunopatogenia de la PTBC. (Tabla 3).

Test	Propósito	Características	Notas y precauciones
<b>ELISAI-S y ELISAI-L.</b>	Detección de fase subclínica.	Baja Se, no detecta estadios tempranos. La Sp ronda e/ 95 a 98%.	Se han publicado muchas evaluaciones de pruebas dudosas.
	Detección de animales con clínica incipiente y avanzada.	Alta Se, sin diferencia real entre el uso de suero o leche.	Los resultados pueden ser no específicos ya que la igGs pueden existir antes de la eliminación de <i>Map</i> en materia fecal.
<b>Cultivo en materia fecal.</b>	Detección de infección con <i>Map</i> .	Baja Se. Raramente detecta en etapas tempranas	Se comparable al ELISAI. Posibles resultados no específicos en rodeos de alta prevalencia.
	Detección de infecciosos o con progreso de la enfermedad.	Alta Se, Sp potencialmente baja.	Animales que eliminan bajas cantidades <i>Map</i> pueden ser no infecciosos y en ellos la enfermedad no progresara.
<b>PCR en materia fecal.</b>	detección de infección con <i>Map</i> .	Baja Se. Raramente detecta etapas tempranas	Se comparable a la de un ELISAI
	Detección de infección en fase clínica incipiente y avanzada.	Alta Se y Sp.	Posibles FN por inhibidores presentes en la muestra.
<b>Interferón γ / PPD-A.</b>	Detección de animales expuestos a <i>Map</i> .	Antígeno-dependientes.	Puede detectar animales curados, es decir solo indica exposición no enfermedad en curso.

Tabla 3. Se resumen las características operativas de las técnicas diagnósticas en base a su propósito. Adaptada de Nielsen, (2014).

### 1.9. Características del ELISAI-L.

Existen varias pruebas de ELISAI-L para diagnóstico de PTBC, tanto en forma de kits comerciales como ELISAs internos o “*in house*”. Los mismos pueden diferir significativamente entre sí, debido a los reactivos que emplean o simplemente pueden estar puestos a punto con diferentes objetivos (Slana y col., 2008). Por lo tanto, es importante conocer las características operativas y estimaciones de precisión de la prueba concreta a emplearse en la práctica (Nielsen, 2009). En cuanto al uso de suero sanguíneo o leche para la detección de anticuerpos *Map* específicos parece haber diferencias limitadas entre ambos ELISAs (Lombard y col., 2006; Nielsen y col., 2002a; Sweeney y col., 1995), varios autores evidencian una correlación positiva entre los resultados obtenidos a partir muestras de suero y de leche (Eisenberg y col., 2015; Lombard y col., 2006; Hendrick y col., 2005) pero con algunas consideraciones a tener en cuenta para optimizar la interpretación de los resultados del ELISAI-L. Por ejemplo, el momento de muestreo es importante para realizar una correcta elección de la matriz diagnóstica (Nielsen y col., 2002b; Nielsen & Toft, 2012), dicha elección también va a depender de la logística. Es decir, el muestreo en leche es menos invasivo respecto al suero, sobre todo si el establecimiento realiza controles lecheros mensuales, permitiéndonos muestrear en varios momentos del año. Como desventaja, las muestras de leche no pueden obtenerse de las vacas secas, ni en categorías jóvenes y tampoco de vacas en los primeros 3-5 días de lactancia, en las cuales la transición de calostro a leche aumenta la probabilidad de obtener resultados falsos positivos (FP) (Nielsen & Toft, 2012).

En lo que respecta a la detección de anticuerpos contra *Map* en leche, hasta el momento el ELISAI es la única prueba utilizada con dicha finalidad. Sweeney y col. (1994) fueron los primeros en utilizar LAM como antígeno en un ELISAI-L “*in*

*house*”, obteniendo una Se del 60% y una Sp del 83%. Collins y col. (2005) analizaron kits comerciales de ELISAI-L disponibles, evidenciando altos niveles de Sp en tres laboratorios independientes (>99%) pero bajos niveles de Se (28%). Las ventajas del ELISAI son su mayor eficiencia en cuanto a tiempo, capacidad de rendimiento, número de muestras a procesar y costos relativamente bajos, que rondan entre el 10% y el 20% del valor de los métodos de detección directa (Sergeant y col., 2008; Nielsen, 2014). La identificación oportuna de vacas infecciosas depende de la frecuencia de las pruebas, la combinación de las mismas, pero también de las características operativas del test de ELISAI empleado. Si bien para algunos autores la presencia de anticuerpos puede predecir un mayor riesgo de diseminación fecal de *Map* (Nielsen, 2008; Lavers y col., 2014), las IgGs específicas de *Map* normalmente suelen aparecer antes de la excreción significativa de la micobacteria en las heces (Nielsen, 2008), también hay que mencionar el hecho de que, aunque los animales puedan eliminar *Map* en la leche, no significa necesariamente que vayan a producir anticuerpos (Streeter y col., 1995). Como se mencionó previamente su Se generalmente es pobre (29% a 61%), con una Sp que ronda entre 83% y 100% (Nielsen y Toft, 2008). Pero debería mejorar con el aumento de la edad o la paridad, ya que esto coincide con un incremento en la diseminación de *Map* y progresión de los signos clínicos (Toft y col., 2005; Nielsen y col., 2013). Nielsen y col. (2002b) encontraron un aumento en la Se para el ELISAI-L al inicio de la lactancia, el cual debe ser interpretado cuidadosamente ya que puede estar provocado por la presencia de anticuerpos calostrales. A su vez los efectos de dilución de anticuerpos en leche durante el pico de lactancia pueden dar lugar a una reducción de la positividad (Nielsen y Toft, 2012). Los ELISAI comerciales actuales no son 100% específicos, en parte debido a la exposición de algunos bovinos a micobacterias ambientales o no tuberculosas (Osterstock y col., 2007), dicha exposición es mayor en

sistemas de producción extensiva, donde se utilizan pasturas *versus* sistemas más intensivos, con tendencia a la estabulación, donde el ambiente es más controlado, por lo tanto, a la hora de evaluar la Sp de un mismo ELISAI en diferentes regiones geográficas habrá variabilidad en los resultados. Otra razón influyente sobre los cálculos de Sp es la naturaleza crónica de la PTBC y el uso del aislamiento en materia fecal como prueba de oro, ya que existe la probabilidad de obtener un resultado negativo al cultivo estando el animal realmente infectado (Whitlock y col., 1996). El ELISAI es menos sensible para la detección de excretores intermitentes, lo que se espera de acuerdo con la patogénesis. Sin embargo, debido a que la aparición de la IgG *Map* específica suele estar relacionada con la progresión de la infección hasta la fase en la que las pérdidas en producción y la infectividad se hacen patentes, entonces las pruebas ELISAI pueden tener un potencial de diagnóstico útil como predictor de la progresión de la enfermedad. Como mencionamos previamente la concentración de inmunoglobulina G en la leche varía a lo largo de la lactancia (Eisenberg y col., 2015; Nielsen & Toft, 2012), aproximadamente el 85% de los anticuerpos se transportan desde la sangre a la glándula mamaria durante el último mes de gestación (Norcross, 1982). Además, el tipo de IgG detectado depende de la muestra. Por ejemplo, la IgG1, se detecta principalmente en la leche y el calostro, sólo representa a aproximadamente la mitad de las IgGs presentes en el suero. En leche el isotipo IgG1 es el preponderante. IgG1 *Map*-específica se asocia con la respuesta inmune humoral dominada por linfocitos Th2 (Koets y col., 2015; Nielsen, 2014) que se manifiesta cuando el hospedador pierde el control sobre la infección, por lo tanto, se espera que el ELISAI-L sea relativamente más específico al comenzar la diseminación de *Map* en materia fecal, mientras que en general no son útiles en etapas tempranas (Klausen y col., 2003; Nielsen y col., 2012). Esto también se ejemplifica con la incapacidad de detectar animales con lesiones

focales, mientras que los animales con lesiones difusas son más fáciles de detectar (Vázquez y col., 2013). En resumen, los resultados de los ELISAI-S y ELISAI-L son menos eficientes para la detección de la infección temprana.

Dentro de las alternativas de procesamiento a través del ELISAI-L podemos mencionar el uso de calostro como muestra individual, dicha muestra según la bibliografía podría tener mayor Se analítica que el ELISAI-S sobre todo en fase subclínica, donde el ELISAI-S tiene menor Se. (Jenvey y col., 2016), es decir, a mayor dilución, la muestra de calostro detectaría un mayor número de seropositivos que el suero. Sin embargo, la probabilidad de FP es muy elevada, lo cual lo invalidaría como muestra para el diagnóstico serológico individual de PTBC, siendo útil solamente como indicador de exposición a *Map* (Nielsen & Toft, 2012; Zervens y col., 2013; Jenvey y col., 2016). Otra opción son pooles de leche, tanto con el propósito de inferir prevalencia predial (Krieger y col., 2021; Köhler y col., 2017), o con propósito diagnóstico mediante el agrupamiento de menos muestras por pool y posterior procesamiento en forma individual de los pooles positivos (Lavers y col., 2014; Græsbøll y col., 2017; Köhler y col., 2017). La muestra de leche de tanque se ha procesado mediante ELISAI-L por diversos autores con la finalidad de realizar vigilancia epidemiológica y para estimar prevalencia predial (Nielsen y col., 2000; Delafosse y col., 2019; Pesqueira y col., 2017; Wilson y col., 2010; Bauman y col., 2019), calculado la correlación entre la seroprevalencia individual de PTBC en distintos establecimientos con el nivel de anticuerpos contra *Map* obtenido en leche de tanque, con limitaciones por baja especificidad (Pesqueira y col., 2017), no obstante otros autores evidenciaron un alto VPP para el ELISAI-L de tanque con la finalidad de clasificar al establecimiento como verdaderamente positivo a PTBC (Bauman y col., 2019).

Si bien el uso de leche como matriz diagnóstica de PTBC esta descrito en la bibliografía, su implementación no es usual en países de Sudamérica, por lo cual el desarrollo y aplicación de un ELISAI-L seria relevante para la región.

## **1.10. Objetivos del plan de tesis**

### **1.10.1. Objetivos generales**

Desarrollar y evaluar la aplicación de diferentes métodos de diagnóstico de PTBC bovina en leche, calostro, suero y materia fecal.

### **1.10.2. Objetivos particulares**

Detectar anticuerpos contra PTBC en calostro, leche y suero con la prueba de ELISAI.

Comprobar la presencia de *Map* en calostro, leche y materia fecal mediante el cultivo en medios líquidos y sólidos.

Determinar la presencia de material genético perteneciente a *Map* en calostro, leche y materia fecal con pruebas moleculares de PCR.

## **1.11. Hipótesis**

- La identificación de anticuerpos en calostro permite diagnosticar la enfermedad con una mayor sensibilidad analítica comparada con la del suero.
- Mediante la determinación de anticuerpos en leche se puede diagnosticar la enfermedad en forma individual y no invasiva, reemplazando la muestra sanguínea.
- La detección de anticuerpos en muestras derivadas de tanque de leche permite realizar una vigilancia epidemiológica.
- La detección de material genético y formas viables de *Map* en la leche y el calostro, pueden mejorar las medidas de bioseguridad tendientes a disminuir el riesgo de infección en los terneros y su introducción en la cadena comercial.

## **CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS**

En este capítulo se describen los materiales y métodos utilizados en la presente tesis.

### **2.1. Rodeos**

Se trabajó con dos rodeos lecheros de bovinos, raza Holando-Argentino, naturalmente infectados, en los cuales la PTBC se presenta en forma endémica, y un tercer establecimiento con prevalencia baja, incluyendo en las experiencias también muestras puntuales provenientes de otros establecimientos tamberos, los muestreos fueron realizados sobre la categoría vaca en lactancia, cada 4 a 6 meses aproximadamente. El establecimiento 1 se encuentra ubicado en el Partido de Chascomús, provincia de Buenos Aires Argentina, consta de 700 hectáreas (has) de las cuales 200 has están dedicadas a la actividad tambera con un total de 270 vacas, de las cuales 180 aproximadamente se encuentran en ordeño con una producción promedio de 26 L diarios. Con respecto a la PTBC se cuenta con estimaciones previas de prevalencia real que rondan el 8% (Alvarado Pinedo, 2015). En cuanto al plan sanitario se aplican vacunas obligatorias, triple clostridial, diarrea neonatal y neumonía.

El establecimiento 2 se encuentra en el partido de Tandil, provincia de Buenos Aires, Argentina, el mismo cuenta con una superficie total de 527 Has, con una cantidad total de 300 bovinos, de los cuales 160 aproximadamente se encuentran en la línea de producción, generando 17 L diarios de leche, promedio. Con estimaciones previas de prevalencia real de PTBC que rondan el 30% (Alvarado-Pinedo, 2015). En cuanto al plan sanitario se aplican vacunas obligatorias, triple clostridial, diarrea neonatal y neumonía.

El establecimiento 3 se encuentra situado en el partido de Castelli, provincia de Buenos Aires, el mismo tiene una superficie de 500 Has y un total de 281 vacas en ordeño con un promedio de producción de 24 L diarios. Como característica relevante en sanidad es un rodeo cerrado de unos 50 años de antigüedad, aplica solo las vacunas de carácter obligatorio de brucelosis, aftosa y carbunco. Los tres rodeos son libres de TBC y brucelosis. La utilización de los protocolos de trabajo en estos rodeos fue aprobada ante CICUAL protocolo: 83-4-18T.

### **2.1.1. Muestras recolectadas**

Las muestras recolectadas fueron, sangre entera, leche individual y leche de tanque, calostro y materia fecal.

#### **2.1.1.1. Muestra de sangre entera**

Se trabajó en una manga, la extracción de sangre se realizó con una jeringa de 5 o 10 mL, con una aguja 18G estéril por animal, mediante venopunción de la vena coccígea media, extrayendo un volumen de 4-6 mL, al retirar la aguja, se realizó una ligera presión en el punto de extracción para lograr la hemostasia, y se depositó la sangre en tubos identificados de forma individual.

#### **2.1.1.2. Muestra de materia fecal**

La muestra de materia fecal, se tomó del recto, una cantidad aproximada de 10 gramos, utilizando un guante de tacto o bolsa de nylon por animal, y se conservaron refrigeradas hasta su procesamiento, por menos de 24 horas.

#### **2.1.1.3. Muestra de leche individual**

La obtención de leche se realizó después del despunte durante la rutina de ordeño, en colectores tipo Falcon, un volumen total de 50 mL de los 4 cuartos, para el caso del cultivo y PCR, se obtuvieron en forma aséptica 50 mL totales, previo pre-sellado, secado y desinfección del pezón con alcohol al 70%, posterior al muestreo se sellaron los pezones con solución iodada.

#### **2.1.1.4. Muestra de leche de tanque**

Se realizó luego de finalizado el ordeño, posterior a 10–15 minutos de agitación con las paletas del enfriador para obtener una muestra homogénea, con un colector estéril y bastón muestreador, colectando desde la superficie, se refrigeró de inmediato a fin de mantener la integridad de la misma.

#### **2.1.1.5. Muestra de calostro**

Para la obtención de calostro se colectaron muestras entre 0 y 3 días posparto, con igual metodología que en el muestreo de leche individual. Se conservaron refrigeradas hasta su procesamiento. En la medida de coincidir la visita al establecimiento con el evento parto. Se obtuvieron calostros de vacas positivas y negativas al cultivo *Map* en materia fecal.

#### **2.1.1.6. Diseño muestral**

Se realizaron muestreos transversales y longitudinales de los animales en lactancia, para el caso de los muestreos individuales la  $n$  muestral fue obtenida utilizando el software ProMesa 1.3 (León y Duffy, 2010), para dicho cálculo por establecimiento se utilizaron las prevalencias previamente calculadas (Alvarado Pinedo, 2015) de 8 y 30 %, el número de existencias, un error relativo del 20%

(error absoluto de 1,6% y 6% para ambas prevalencias respectivamente), con un nivel de confianza del 95% arroja un total de 217 muestras para el establecimiento 1 y 143 en el establecimiento 2.

Para calcular la  $n$  muestral se tuvo en cuenta el capítulo “principios y métodos de validación de pruebas diagnósticas de las enfermedades infecciosas” del manual terrestre de la OIE, la cantidad teórica de muestras necesarias procedentes de animales cuyo estado de infección es conocido para establecer la estimación de la  $Se$  y  $Sp$  diagnósticas con un nivel de confianza del 95% y un error permitido del 5% es de 73-113 para una  $Sp$  95% y 92% respectivamente. Si bien se realizaron cálculos de  $n$  muestral necesaria en base a los parámetros expresados previamente, en las ocasiones que se muestreó leche se realizó sobre la totalidad de las vacas en ordeño, también se utilizaron muestras derivadas del control lechero oficial, en el caso de la sangre entera además de muestreos parciales a la par de las muestras de leche, se utilizaron muestras provenientes del control de brucelosis de los tres establecimientos que incluyeron la totalidad de los animales.

## **2.2. Producción de antígeno**

El antígeno WLA (*whole cell lysate* de *M. avium* subsp *avium*, CEDIVE) utilizado en las pruebas de ELISAI, y AGID se obtuvo a partir de una cepa de *M. avium* subsp. *avium*, la cepa bacteriana D4ER cedida por SENASA. Para su mantenimiento y desarrollo se utilizó caldo glicerinado y una versión sólida del mismo (ver fórmula en anexo I) fraccionado en botellas de cultivo tipo Roux y tubos de vidrio estériles, se incubó el material durante aproximadamente 2-3 meses para obtener una capa superficial de biomasa aproximadamente de 0,5 centímetros de espesor. Posteriormente se cosechó cada botella, el caldo fue filtrado y el cultivo sólido en forma mecánica con asa y las micobacterias inactivadas por radiación gamma (25 kGry). Luego de este proceso se rompieron las células mediante un

disruptor celular Constant Systems® a una presión de 40 kpsi, el lisado es centrifugado por 30 minutos a 10000 rpm y el sobrenadante usado como antígeno.

### **2.3. Caracterización del antígeno/ comparación con PPA y SDS-PAGE.**

Se cuantificó la cantidad de proteínas utilizando el reactivo de Bradford y se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE, comparándolo con otros antígenos como se describe en el anexo I.

### **2.4. ELISAi en suero**

La prueba de ELISA que se implementó es una modificación del protocolo desarrollado previamente por Travería (2003), al cual se le suma la utilización de urea como agente caotrópico. Para su ejecución el día previo al ensayo se inmovilizó en microplacas de poliestireno de 96 pocillos 100 µL/pocillo (Greiner Microlon® F-Botton clear, High Binding) el antígeno WLA a una concentración 1:486 v/v en buffer carbonato-bicarbonato, pH 9,5. Las placas ya sensibilizadas se almacenaron en heladera a 4-6°C durante toda la noche. Los sueros se diluyeron 1:180, en PBS-T20 (tween 20), posteriormente se lavó la placa 3 veces y se incubaron las muestras ya diluidas durante 30 minutos a 18-20°C, se adicionó solución de urea 8M durante 4 minutos, la misma funciona eliminando las uniones antígeno anticuerpo inespecíficas. Como conjugado se utilizó anti IgG bovina-HRPO Sigma Aldrich®, diluido en PBS-T20 1:5000, se incubó a 18-20°C durante 30 minutos. Entre cada paso se efectuaron tres lavados con PBS-T20. Se reveló utilizando como solución de revelado el buffer citrato-ácido cítrico (pH 5), como cromógeno se utilizó ABTS y como sustrato H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, luego de 30 minutos se efectuó la lectura con el lector de ELISA (LabSystem Multiskan®) con filtro 405 nm. Se consideraron como positivos a aquellos valores de DO iguales o superiores al 70% con respecto al control positivo.

## **2.5. ELISAI en leche**

Las muestras de leche se centrifugaron a 2500 rpm 30 minutos, se retiró la capa de crema, para usar la fase acuosa. La puesta a punto de este ELISAI-L se realizó utilizando como guía el ELISA guidebook, de acuerdo al método de tablero de ajedrez (Crowther 2002). Las diluciones de trabajo determinadas fueron 1:10 para las muestras, 1:960 para el antígeno y 1:5000 para el conjugado. Utilizando los mismos reactivos y procedimientos que en el apartado 2.4. Como control positivo se utilizó leche proveniente de un individuo con serologías y cultivo positivo. Se consideraron positivas aquellas DO con un porcentaje de positividad superior al 70% con respecto al control positivo. (Figura 7).

Las soluciones utilizadas en el apartado 2.4 y 2.5 se describen en el anexo II.

### **2.5.1. Titulación de reactivos en ELISAI-L.**

En microplacas de 96 pocillos se titularon los reactivos a utilizar en el desarrollo de la prueba de ELISAI aplicada en esta tesis, se buscó establecer la dilución de trabajo del antígeno, anticuerpos (muestra) y el conjugado anti-especie. En primer lugar, se tituló el antígeno y el suero problema, procurando de esta manera que no haya un exceso de antígeno y que sea suficiente para la cobertura del pocillo favoreciendo la unión de los anticuerpos contra *Map* a detectar en la muestra, utilizando el conjugado en la proporción indicada por el fabricante.

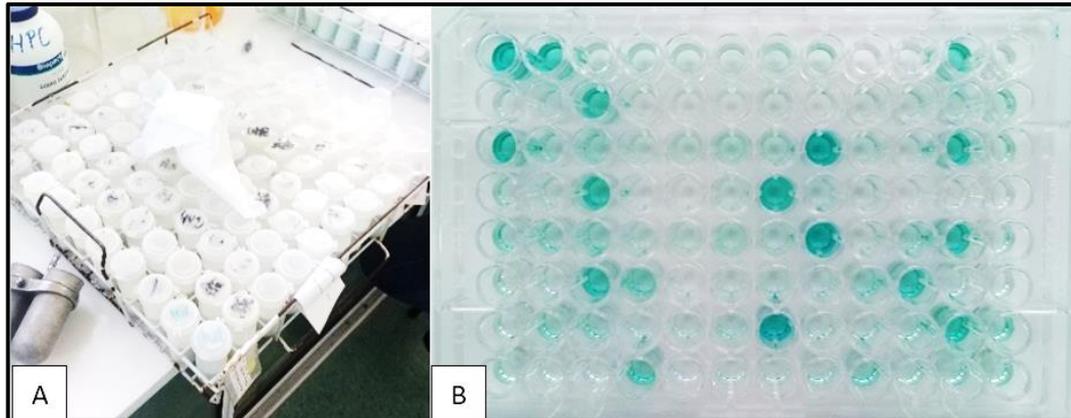


Figura 7. Podemos observar en la fotografía "A" un muestreo de control lechero oficial. En la fotografía "B" la vista final de una placa de ELISAi-L.

En segundo lugar, se trabajó con el conjugado, para no dar fondos inespecíficos. En la realización de la titulación se utilizaron leches de animales positivos a PTBC y de individuos negativos, utilizando la placa de microtitulación se practicaron diluciones en base 2 para el antígeno partiendo de 1:240 a 1:30720 (filas A-H), la leche positiva (columnas 1-6) y negativa (columnas 7-12) se probaron puras, 1:2, 1:4, 1:10, 1:20 y 1:50. (Figura 8, A). Para identificar las condiciones de trabajo se establecieron las relaciones entre iguales diluciones en suero positivo y negativo, tomando como la óptima a aquella que marca mayor diferencia entre ambos, para el caso de la muestra de leche fue 1:10 y para el antígeno 1:960. Posteriormente se probaron las siguientes diluciones para el conjugado: 1:625, 1:1250, 1:2500, 1:5000, 1:10000, 1:20000, 1:40000 y 1:80000 (A-H, filas). Se utilizaron un total de 11 muestras, para obtener la condición de trabajo se estableció la relación entre la muestra de mayor DO y las demás, de esta forma se estableció 1:5000 como dilución de trabajo para el conjugado. (Figura 8, B). Se realizó otra experiencia con un total de 12 leches en dilución 1:4; 1:10 y 1:20, con el conjugado ya fijo en 1:5000, mediante la cual confirmaron como condiciones óptimas de trabajo 1:10 para la muestra y 1:960 para el antígeno. (Figura 8, C).

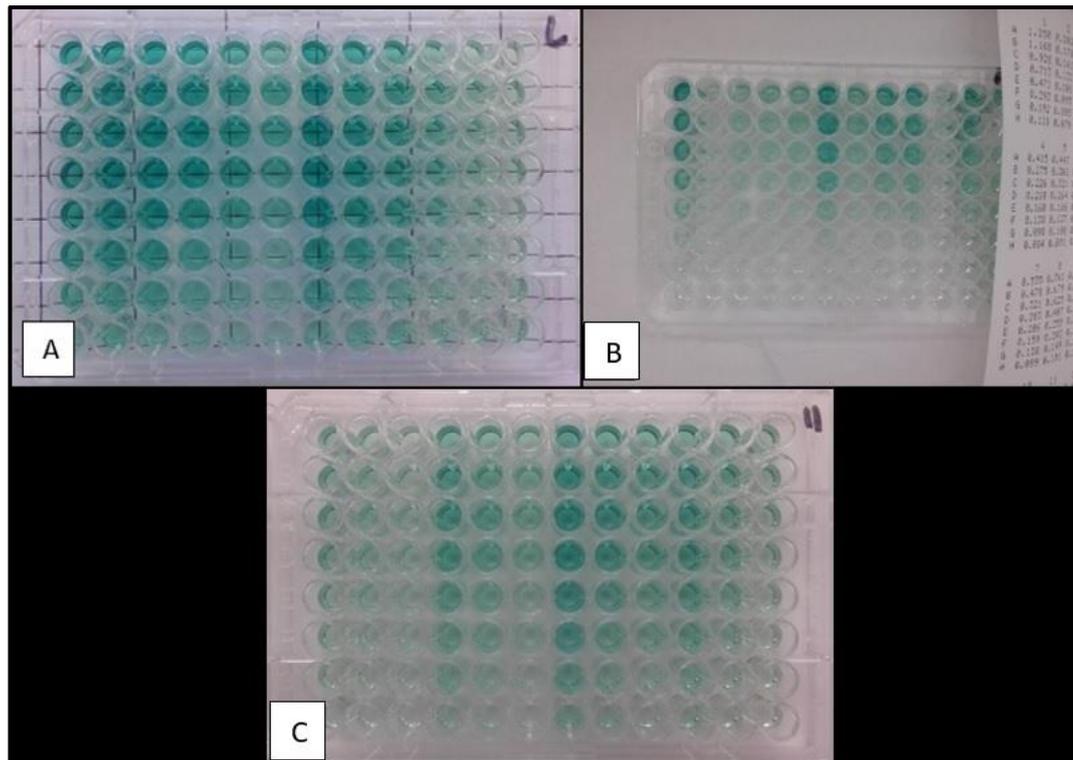


Figura 8. Se puede apreciar la titulación de los reactivos para el ELISAI-L explicada en el apartado 2.5.1.

### 2.5.2. Implementación de ELISAI en pooles de leche.

Se trabajó con un total de 167 muestras de materia fecal y leche individuales. Las mismas fueron procesadas como se describe en el apartado 2.5 y 2.8 de esta tesis. Conociendo los resultados del ELISAI-L individual y de los aislamientos de *Map* en materia fecal, se conformaron los pooles como se describe en la figura 9. Se utilizaron 100  $\mu$ L de cada muestra individual para confeccionar los pooles. El número de muestras por pool se determinó utilizando la siguiente fórmula extraída de Williams (2010):  $P_1 = 1 - (1 - P_0)^{S_1}$ , siendo  $P_1$  la probabilidad de pooles que teóricamente resultarían positivos (pool prevalencia) al ELISAip-L (ELISAI en pooles de leche),  $P_0$  la prevalencia en muestras individuales y  $S_1$  número de muestras por pool, se realizaron los cálculos para 2, 3, 4, y 5 muestras por pool ( $S_1$ ), seleccionando 4  $S_1$ , siendo el tamaño que permitiría procesar la menor cantidad de muestras. Se conformaron pooles de manera aleatoria, utilizando

Microsoft Excel (Microsoft office® profesional plus 2019), mediante las funciones “aleatorio”, “jerarquía” y “buscar”.

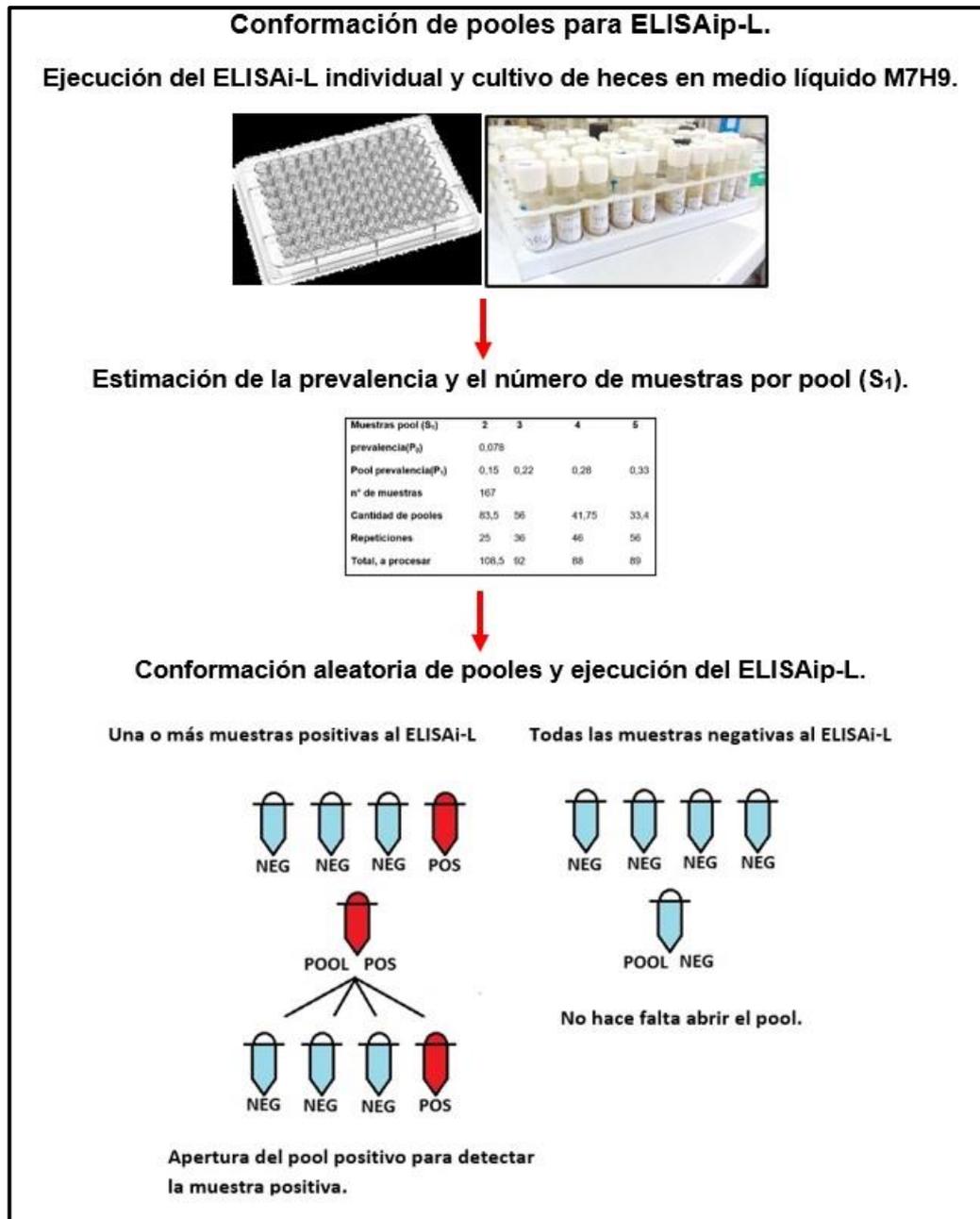


Figura 9. Conformación de pools para el ELISAip-L. Resumen de esta experiencia, preliminarmente se necesitaron los resultados individuales para la posterior confección y procesamiento mediante ELISAip-L para el diagnóstico de PTBC.

### **2.5.3. ELISAI en leche de tanque**

La metodología utilizada en su ejecución fue la misma que la del ELISAI-L, como fue descrita en el apartado 2.5.

### **2.5.4. ELISAI en calostro**

Para obtener la titulación de los reactivos para el ELISAI en calostro (ELISAI-C) se realizó al igual que en el ELISAI-L el método de tablero de ajedrez. Quedando definidas las siguientes condiciones de trabajo de los distintos reactivos, el antígeno 1:480, el conjugado 1:5000 y para el calostro 1:640, fueron diluciones que mayor diferencia arrojaron entre un calostro proveniente de un animal PTBC positivo y uno negativo.

### **2.6. Intradermorreacción con PPD Aviar**

Se realizó la prueba de la intradermorreacción, con PPD Aviar (derivados del crecimiento y lisis de *M. avium* subespecie *avium* cepa D4ER), el SENASA produce PPD Aviar que contiene 25.000 UI por mL y una concentración de proteína de 0,5 mg/mL. La inoculación se realiza en el pliegue ano-caudal interno y el volumen a inocular es de 0,1 mL. para determinar la reacción de hipersensibilidad de tipo retardada en el pliegue ano-caudal interno. Previamente a la inoculación se realiza la medida del pliegue cutáneo con un calibre y luego de 72 hs de la inoculación, se calculó la diferencia del grosor de la piel. La aplicación intradérmica se efectuó con una jeringa semiautomática McLintock®, la misma está diseñada para cargar hasta 20 dosis, cada una de un volumen de 0,1 mL. Se registraron todas las diferencias observadas en los pliegues cutáneos, los animales con incremento en el pliegue cutáneo fueron considerados como reaccionantes a la prueba.

## **2.7. Tinción de Ziehl Neelsen**

La tinción de Ziehl-Neelsen fue utilizada para la coloración directa de materia fecal y la coloración semanal de los cultivos en medio líquido con la finalidad de observar las micobacterias. Esta técnica implica el uso de fucsina de Ziehl como colorante principal y azul de metileno como contraste, su fundamento se basa en la resistencia a la decoloración con alcohol ácido que presentan las micobacterias, característica otorgada por la presencia de ácido micólico en la composición de su pared. El compuesto fenólico carbol fucsina, interacciona con los ácidos micólicos favorecido por la acción del calor, debido a que la cera se vuelve menos densa, más permeable con la temperatura y las moléculas de colorante se mueven con mayor facilidad hacia el interior de la pared celular. Posterior al colorante primario se usa alcohol-ácido para decolorar las bacterias que no fueron teñidas porque su pared no era lo suficientemente afín, por lo tanto, la fuerza del decolorante ácido es capaz de eliminar la fucsina. Después de la decoloración se realiza el contraste con el colorante secundario que tiñe el material de fondo y toda célula que haya sido decolorada toma color azul, mientras que las micobacterias ácido-resistentes conservan el color rojo.

## **2.8. Descontaminación y cultivo en materia fecal**

Para la descontaminación de materia fecal se utilizó el método de la doble incubación. Se diluyeron 2 gr de heces en 35 mL de H<sub>2</sub>O destilada estéril en un tubo tipo Falcon de 50 mL. Se agitó vigorosamente y se dejó reposar a temperatura ambiente por 30 minutos con la finalidad de que decante la fibra y el material grosero, posteriormente se transfirieron 5 mL de sobrenadante a un segundo tubo con 25 mL de cloruro de hexadecyl pyridinium (HPC) al 0,9% en caldo cerebro corazón (CCC) a una concentración de 1,85%, se incubó en estufa a 37°C por 18 horas. Al día siguiente se centrifugó por 30 minutos a 1000 g, se

descartó el sobrenadante dentro de la cabina de flujo laminar (CFL) y se adicionó 1 mL de mezcla de antibióticos, se agitó y se incubó durante toda la noche a 37°C. (Figura 10). La utilización del HPC al 0,75% permite inhibir el desarrollo no solo de los microorganismos contaminantes comunes, también micobacterias atípicas si se cumplen con los tiempos de incubación. Finalmente se inocularon 100 µL del pellet en tubos con medio líquido M7H9C, con y sin micobactina, con el agregado de Casitone, albumina, dextrosa, catalasa, yema de huevo y una mezcla de antibióticos. Ver fórmulas en anexo II. Se incubaron a 37°C durante un periodo no menor a 3 meses, realizando la coloración en forma semanal, en la búsqueda de la morfología de grupos o nidos de BAAR característicos de *Map*. Al ser detectados como BAAR+ se realizaron repiques en medio de Herrold suplementado con un extracto obtenido a partir de *Mycobacterium smegmatis* (*Ms*), el cual describiremos en el apartado 2.9. Estos repiques fueron realizados para facilitar la posterior extracción de ADN y confirmación por PCR IS900.



Figura 10. Resumen de los pasos de la descontaminación en materia fecal. A) Orden de las muestras para su dilución en agua destilada estéril. B) Posterior a un reposo de 30 minutos se trasvasan al HPC 5 mL de sobrenadante. C) Luego de incubar toda la noche a 37°C y centrifugado se resuspende el pellet en mezcla de antibióticos.

## 2.9. Producción de micobactina a partir de micobacterias

Las micobacterias se cultivaron en caldo glicerinado (anexo I), para producir biomasa. Se colectaron en tubos tipo Falcon de 50 mL luego de 1 mes de incubación a 37°C. Se inactivaron 30 gramos de soma de cada cepa en autoclave y se realizó la extracción descrita por Hall, (1982) con modificaciones como el lisado previo a 40 kpsi en disruptor celular (Constant Systems cell®). Durante la disrupción como vehículo y extractor se fue adicionando alcohol etílico, se agitó con agitador magnético por 3 horas y se centrifugo a 1500 rpm por 5 minutos con la finalidad de recuperar el alcohol libre de soma, sobre este último se efectuó una segunda extracción con etanol como se describió anteriormente, y determinado el volumen de alcohol total se adicionó FeCl<sub>3</sub> saturado hasta notar un cambio de color (aproximadamente 200 µL), igual volumen de cloroformo y de agua, se dejó reposar a 4°C un día obteniendo la formación de tres fases, polar-lipídica y apolar. Se retiró el sobrenadante (fase polar), la fase lipídica, recuperando la fracción apolar la cual se evaporó con el fin de eliminar el cloroformo y obtener la micobactina, como se muestra en el anexo III. La fase polar también se concentró para probarla como factor de crecimiento.

En una prueba preliminar se procedió a realizar un extracto elaborado a partir de *Ms* de manera similar a lo anteriormente descrito. Al desconocer la concentración de dicho extracto se usó un volumen equivalente al total obtenido en 1 L. de medio de cultivo. Estos medios fueron utilizados en este trabajo de tesis tanto para repiques de cultivos BAAR+ y con inóculos de muestras clínicas de materia fecal obteniendo desarrollo de colonias compatibles con *Map*. (Figura 11).

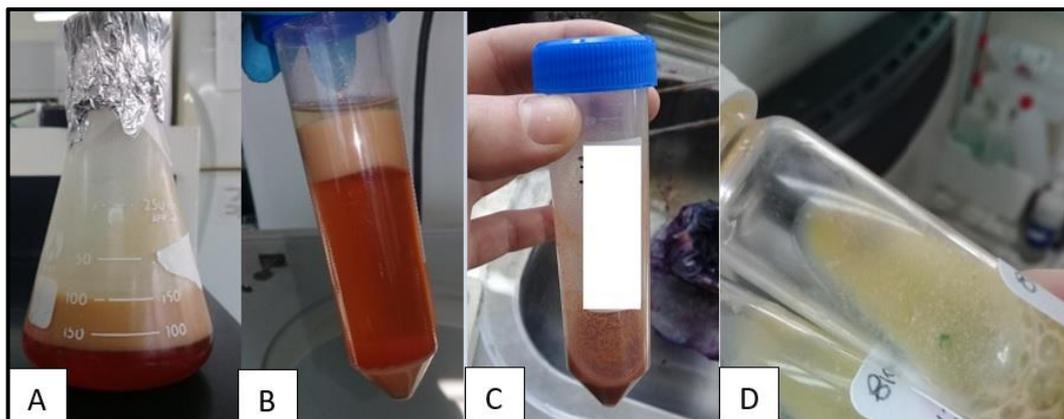


Figura 11. Descripción de la producción del extracto de *Ms*, y el posterior desarrollo de colonias compatibles con *Map*. En el medio de Herrold suplementado con el mismo. A) *Ms* estacionado en alcohol etílico y cloroformo en iguales volúmenes posterior a su lisado. B) fases obtenidas por centrifugación 5 minutos a 1500 rpm. C) eliminada la masa de *Ms*, se procedió a evaporar la fracción del cloroformo y el extracto obtenido se utilizó para suplementar el medio Herrold. D) desarrollo de *Map*, a partir de muestras clínicas de materia fecal en medio Herrold suplementado con extracto de *Ms*.

## 2.10. Cultivo en leche

A partir de 50 mL de leche obtenida en forma aséptica, se procesó antes de las 24 horas posteriores a su colecta, para disminuir la probabilidad de contaminación. Se centrifugó durante 30 minutos a 3000 rpm a 18-20°C. Dentro de la CFL, se removió la capa de grasa con una varilla de vidrio estéril, y con pipeta de vidrio estéril se decantó la leche dejando el pellet o sedimento de células en el fondo del tubo. Se reconstituyó el pellet en 25 mL de HPC 0,75%, se agitó en vortex tres veces por 10 segundos, de formarse un coagulo en el fondo se disgregó con una varilla estéril y se pasó por el vortex nuevamente, se incubó durante 6 horas a temperatura ambiente. Se centrifugó a 3000 rpm durante 30 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 mL de mezcla de antibióticos para posteriormente incubarse durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente se inoculó del mismo modo que en el apartado 2.8.

### **2.11. Extracción de ADN a partir de cultivos BAAR+**

Los cultivos BAAR+ en medio líquido se repicaron en medio Herrold como se describe en el apartado 2.8. Posteriormente en tubos Eppendorf de 1,5 mL se colocaron 200 µL de agua ultrapura, libre de ADNasa/ARNasa, se identificó el tubo, y con un ansa estéril se disolvió una colonia, en los casos donde no se visualizaron colonias se tomó una ansada de la superficie de siembra y se realizó la extracción mediante 3 ciclos de ebullición/congelamiento. Las extracciones se reservaron a -20°C hasta su procesamiento.

### **2.12. Extracción de ADN de materia fecal**

La extracción de ADN a partir de materia fecal se encuentra limitada por la presencia de inhibidores como se describió en el apartado 1.8.1.1, en este apartado se describirán el kit de extracción comercial y la extracción de ADN por solventes utilizadas en esta tesis.

#### **2.12.1. Extracción de ADN mediante kit comercial**

Las muestras de materia fecal se acondicionaron en tubos Eppendorf de 1,5 mL. Rotulados en forma individual y almacenados a -20°C para su posterior procesamiento. La extracción de ADN se realizó mediante la utilización del Kit de extracción Quick-DNA Fecal (Zymo Research® (ZR) Fecal DNA Mini Prep™, Catalogo N°D6010, The Epigenetic Company, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante.

A continuación, se describirá en mayor detalle los pasos de dicho protocolo.

Se colocaron 150 mg de heces en un tubo “ZR Bashing Bead”, más 750 µL de buffer de lisis. Para su posterior lisis mecánica se colocó en un disruptor favoreciendo la ruptura de la pared bacteriana.

Se centrifugó el tubo del paso anterior a 10000 g 1 minuto y se transfirió 400  $\mu$ L del sobrenadante a un tubo "Zymo-Spin IV", se calzó en un tubo de descarte, se centrifugó a 7000 g 1 minuto.

Se añadió 1200  $\mu$ L de buffer de ADN en heces para el filtrado en el tubo de descarte, y se transfirió 800  $\mu$ L de la mezcla del paso anterior a una columna "Zymo-Spin C II", nuevamente se colocó en un tubo de descarte y se centrifugó a 10000 g durante 1 minuto. Se descartó el flujo a través del tubo de descarte y se repitió el paso anterior. Se añadió 200  $\mu$ L de ADN buffer de prelavado a la columna "Zymo-Spin II" en un nuevo tubo de descarte y se centrifugó. Posteriormente se añadió 500  $\mu$ L de ADN en tampón de lavado de heces a la columna y nuevamente se centrifugó. Se transfirió la columna "Zymo-Spin II" a un tubo de micro centrifuga de 1,5 mL y se añadió el buffer de elusión (100  $\mu$ L) directamente a la columna. Se centrifugó a 10000 g durante 30 segundos para recuperar el ADN. Por último, se transfirió el ADN eludido a un tubo Zymo-Spin IV-HRC en un tubo de microcentrifuga durante 1 minuto. El ADN filtrado es adecuado para PCR.

### **2.12.2 Extracción de ADN en materia fecal mediante solventes.**

Se disolvieron 5 gr de materia fecal en 40 mL de agua destilada estéril. Se agitó suavemente por 15 minutos y se dejó decantar 30 minutos. Se recuperó 1 mL de sobrenadante y se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Se agitó con vortex por 10 segundos y se dejó en reposo por 10 minutos. A partir de 800  $\mu$ L de sobrenadante en tubos de 1,5 mL, se centrifugó a 14000 g 20 minutos. Se removió el sobrenadante y adicionó 500  $\mu$ L de buffer TE (0,35 M TRIS pH 8, 10mM EDTA). En un tubo con sílice se agitó en forma horizontal en vortex por 10 minutos. Se adicionaron 250  $\mu$ L de buffer lisis (10mM TRIS HCl pH 8, 2mM EDTA, 400 mM NaCl, 1% SDS), 20  $\mu$ L de proteinasa k (Promega®, Madison, USA) y se incubó 40 minutos a  $65^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se realizaron dos extracciones (F/CL/I) 25:24:1,

10 min a 10000 g. Se recuperó la fase acuosa y se realizó una nueva extracción cloroformo-isoamílico (24:1) para eliminar restos de fenol. La precipitación se realizó con acetato de sodio 10 M y 2 vol. de etanol 100% frío, durante 2 horas a -20°C. Se centrifugó a 10000 g 30 minutos, y se lavó con etanol 70%. El pellet de ADN se resuspendió en 50 µL de buffer TE 1X y se conservó a -20°C hasta su uso.

### **2.13. Extracción de ADN a partir de calostro y leche.**

Se centrifugó 50 mL de leche a 4000 rpm durante 20 minutos, se eliminó la capa lipídica y el sobrenadante, obteniendo el pellet de células que se resuspendió en 1,6 mL de Buffer TE 1X. Se tomaron 800 µL del paso anterior y se centrifugaron a 12000 rpm 2 minutos, se eliminó el sobrenadante y se adicionó 500-750 µL de buffer TE (0,35M Tris pH 8, 10 mM EDTA) previamente templado a 65°C. Se agregaron 250 µL de buffer de lisis-100 µL de SDS 10% y 20 µL de proteinasa K (20mg/mL) (Promega®, Madison, USA) y se incubó durante 40 minutos a 56°C. Posteriormente se realizaron dos extracciones, primero con fenol-cloroformo-isoamílico 24:24:1 y otra con cloroformo-isoamílico 24:1. En cada extracción se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos y se recuperó la fase acuosa. A la cual se le adicionó 100 µL de ClNa 5 M y 0,6 vol. de alcohol isopropílico, se incubó durante toda la noche a -20°C con la finalidad de que se produzca la precipitación de ADN, se centrifugó a 12000 rpm. Descartamos el sobrenadante y realizamos dos lavados con etanol al 70% frío, se centrifugó 10 segundos, se eliminó el alcohol y dejó secar, finalmente se resuspendió el ADN con 20 µL de agua ultrapura o de buffer TE 1X. y se conservó a -20°C hasta su utilización.

Nota: para el caso del calostro inicialmente a 35 mL del mismo se le agregó 15 mL de PBS estéril para disminuir su densidad y se prosiguió de igual forma que para las muestras de leche.

#### 2.14. Protocolo de PCR IS900

Se realizó PCR punto final, tomando como diana el segmento de inserción IS900 mediante el protocolo descrito por Collins y col. (1993), para darle identidad a los aislamientos en materia fecal, en leche y posterior a la extracción de ADN directamente sobre dichas muestras clínicas. Los primers utilizados fueron: (F) 5'-GATCGGAACGTCGGCTGGTCAGG-3', (posición en IS900 662-640 pb); (R) 5'-GATCGCCTTGCTCATCGCTGCCG-3' (posición en IS900 445-467 pb) dando un producto de PCR de 217 pb; la DNA Polimerasa BIOLINE® (Londres, Reino Unido) y el termociclador Evo MPI M<sub>02</sub>® (La Plata, Argentina).

Condiciones de amplificación:

	Desnaturalización inicial a 94°C 3 minutos.	
30 ciclos	{	Desnaturalización a 94°C 1 minuto.
		Hibridación a 62°C 1 minuto.
		Extensión a 72°C 1 minuto.
		Extensión Final a 72°C 8 minutos.

#### 2.15. Protocolo de LAMP IS900.

La técnica de LAMP se aplicó sobre extracciones de ADN realizadas en heces, siendo IS900 el segmento diana, siguiendo como lineamiento el protocolo descrito por Enosawa y col. (2003). Para un volumen final de 25 µL por muestra procesada se utilizaron: 2 µL de ADN, 12,5 µL de enzima colorimétrica WarmStart® master mix

(Biolabs®, New England, USA), 1 µL de cada uno de los cuatro primers y 6,5 µL agua ultrapura. La master mix previamente mencionada posee como característica de virar de color con el cambio de pH que se produce como resultado de la reacción. El programa de ciclado fue acorde a la temperatura de hibridación de cada primer. A continuación, se detallan los primers utilizados.

<b>Primers</b>	<b>Secuencia 5'-3'</b>
<b>F3</b>	CGA TCA TCG CCG ATC AG
<b>B3</b>	GCC AGT AAG CAG GAT CAG C
<b>FIP</b>	GTCAGG ATG CGC AGC TCG ACC ACG ACT TGC AGC CTC TG
<b>BIP</b>	CGA TCG AAC CGA ATG CGC GGG CTC TTG TTG TAG TCG AAG G

Condiciones de amplificación:

	65°C 1 minuto	–Desnaturalización inicial	
1 ciclo	{	65°C 10 minutos	–Desnaturalización
		65°C 10 minutos	–Hibridación
		65°C 10 minutos	–Extensión
		95°C 1 minuto	–Extensión Final

## 2.16. Métodos estadísticos

Las pruebas estadísticas utilizadas pertenecen a la estadística frecuentista y también se recurrieron a pruebas probabilísticas de la estadística Bayesiana. A continuación, se mencionan dichas pruebas haciendo una breve descripción de las más relevantes.

**Prueba de Shapiro Wilk**

La prueba de Shapiro Wilk se usa para contrastar la normalidad de un conjunto de datos, nos permite tomar una decisión sobre su distribución de probabilidad y es recomendada para variables continuas con gran número de datos. La hipótesis nula es que la distribución analizada tiene distribución normal. Si  $p$  es  $<0,05$  no tiene distribución normal, si  $p$  es  $\geq 0,05$  se aceptaría que los datos analizados presentan distribución normal.

**Test no paramétrico de Wilcoxon**

Es una prueba no paramétrica para comparar el rango medio de dos muestras relacionadas, determinar si existen diferencias entre ellas, y si las hay si son debidas al azar o si son estadísticamente significativas. Se utiliza como alternativa a la prueba  $t$  de Student cuando no se puede suponer la normalidad de dichas muestras. Es una prueba no paramétrica de comparación de dos muestras relacionadas y por lo tanto no necesita una distribución específica.

**Test de Correlación.**

Nos permite comprobar si una variable se correlaciona con otra, es decir si cuando una aumenta de valor la otra aumenta (relación positiva) o disminuye (relación inversa) de manera sistemática. El análisis de correlación permite hallar un estadístico que es el coeficiente de correlación ( $r$ ) el cual se halla entre  $-1$  y  $1$ . Cuanto más cercano sea a  $1$  indica una fuerte relación positiva entre las variables estudiadas, es decir cuando una aumenta, la otra también lo hace. Por su parte un valor de  $r$  cercano a  $-1$  también muestra una gran correlación entre las variables, pero de manera inversa. Un valor cercano a  $0$ , nos indica falta de relación entre las variables. El coeficiente de correlación ( $r$ ) elevado al cuadrado ( $r^2$ ) se conoce como coeficiente de determinación y nos indica que porcentaje de

una variable es explicado por la variación de la otra. También en una correlación tendremos un valor de p-value si el mismo es  $p < 0,05$  nos indicara que las variables están correlacionadas si es  $> 0,05$  indicará falta de correlación.

### **Regresión lineal**

La regresión entre dos variables correlacionadas nos permite hallar una función o modelo matemático que ajuste y relacione los valores de una variable dependiente con la otra variable independiente a través de fórmulas matemáticas. Cuando se trata de una regresión lineal la función de ajuste y la representación gráfica se basa en una recta y la ecuación de la misma. Este método es aplicable en muchas situaciones en las que se estudia la relación entre dos o más variables o predecir un comportamiento.

### **Concordancia entre pruebas-Índice Kappa**

El coeficiente *kappa* fue propuesto originalmente por Cohen (1960) para el caso de dos evaluadores o dos métodos. Expresa la proporción de concordancia más allá del azar, de forma que un valor de *kappa* igual a 0 indica que no existe ninguna concordancia una vez descontada el factor azar, mientras si el valor de *kappa* es igual a 1 nos indica una concordancia total. Según los valores obtenidos el grado de concordancia variará desde: 0 o menor a 0 no acuerdo; 0-0,2 Insignificante; 0,2-0,4 Bajo; 0,4-0,6 Moderado; 0,6-0,8 Bueno; 0,8-1 Muy Bueno. Debe recalarse que el valor de *kappa* no indica cual es el método que proporciona los mejores resultados en términos del número de animales sanos o enfermos correctamente diagnosticados, ni si ambas poseen la misma Se y Sp, y tampoco sirve como medida de estos valores.

## **Análisis ROC**

El análisis de las características operativas del receptor (ROC) se desarrolló en los años cincuenta como herramienta para el estudio de detección e interpretación de señales de radar su objetivo era discriminar las verdaderas señales del ruido de fondo (Lusted, 1971). De la misma forma que en el receptor de radar se produce un solapamiento entre las verdaderas señales y el ruido, al realizar pruebas diagnósticas existe un solapamiento entre los resultados de los pacientes enfermos y aquellos no enfermos es decir sanos. Por este motivo, las aplicaciones de las curvas ROC se extendieron a múltiples sistemas diagnósticos, incluidas las pruebas de laboratorio (Zweig y col., 1993). Al utilizar este análisis se elabora un gráfico o curva que representa la Se y la Sp de una prueba diagnóstica. Se debe recordar que la Se de una prueba diagnóstica es la probabilidad de obtener un resultado positivo cuando el individuo tiene la enfermedad. La Sp de un test indica la probabilidad de obtener un resultado negativo cuando el individuo no tiene la enfermedad, por lo tanto, mide su capacidad para descartar la enfermedad cuando ésta no se encuentra presente. Entre las ventajas de este método de análisis se puede mencionar que puede ser aplicado a cualquier distribución del valor, utiliza los datos clínicos reales para el desarrollo del valor de corte, analiza tanto la información sobre la población enferma como la de la no-enferma y puede ser ajustado según los objetivos particulares de diagnóstico. La desventaja del método es que requiere contar con una prueba de referencia de la enfermedad en la población a estudiar (Pfeiffer, 2002). En el eje y de ordenadas se sitúa la Se o fracción de VP. En el eje x de abscisas se ubica la fracción de FP o 1-Sp. Las curvas de ROC explican el análisis de una prueba diagnóstica en función de su Se y Sp expresada en porcentaje. Idealmente, una prueba de diagnóstico posee un 100% de Se y un 100% de Sp, o valor 1 (sector superior izquierdo del gráfico), lo cual se conoce como área bajo la curva (AUC). Si una prueba realiza el

diagnóstico de manera aleatoria, se dice que carece de valor predictivo, o de capacidad para discriminar entre el positivo y el negativo, y la relación entre la Se y Sp es lineal; por lo tanto, siguiendo esa línea, al querer aumentar la Se o mayor número de positivos, proporcionalmente disminuirá la Sp. Si el AUC es de 0,5 la discriminación entre enfermos y sanos es como lanzar una moneda y sería considerado Test malo; entre 0,6-0,75 Test regular; 0,75-0,9 Test bueno; 0,9-0,97 Test muy bueno; y 0,97-1 Test excelente.

### **Estadística Bayesiana**

La estadística Bayesiana a diferencia de la estadística frecuentista, permite priorizar el muestreo a la “diferencia significativa” o “p-value”. Es decir, partiendo de la muestra como centro tratamos de ajustar a la misma los parámetros, invirtiendo así el mecanismo frecuentista, esto nos permite iniciar el análisis desde la muestra que no es una teoría sino de lo más cercano a la realidad. La metodología bayesiana propone especificar un modelo de probabilidad que incluya algún tipo de conocimiento previo (*a priori*) sobre los parámetros del modelo dado. De esta manera, la inducción bayesiana consiste en usar recursos probabilísticos para actualizar o cambiar nuestra asignación probabilística inicial o previa, haya sido ésta “objetiva” o “subjetivamente establecida”, a la luz de nuevas observaciones. Produce una probabilidad conformada a partir de dos componentes: una que con frecuencia se delimita subjetivamente, conocida como “probabilidad *a priori*”, y otra objetiva, la llamada Verosimilitud o *likelihood*, basada exclusivamente en los datos. Esta probabilidad *a priori*, una vez incorporada la evidencia que aportan los datos, se transforma así en una probabilidad *a posteriori*.

### **Análisis de pruebas diagnósticas mediante estadística Bayesiana.**

Es una de las aplicaciones más comprensibles de la estadística Bayesiana ya que partimos de una prevalencia o valencia anterior a la prueba, se aplica el teorema de Bayes y se obtiene una probabilidad posterior al test. Para ejecutar este análisis estadístico se empleó el software R Core Team versión 4.0.2 (2020). Mediante la metodología y Script descrita por Risso y Risso, 2017. Obteniendo los siguientes resultados.

$$Se = VP/(VP+FN) \text{ o } a/(a+b)$$

Es la probabilidad condicional  $P(+/E)$  de dar un resultado positivo (+) cuando existe el evento enfermedad (E).

$$FN = FN/VP+FN) \text{ o } b/(a+b)$$

Es la probabilidad condicional  $P(-/E)$  de dar un resultado negativo (-) cuando existe el evento enfermedad (E). Es llamado Error tipo II o  $\beta$ .

$$Sp = VN/FP+VN) \text{ o } d/(d+c)$$

Es la probabilidad condicional  $P(-/E)$  de dar un resultado negativo (-) cuando NO existe el evento enfermedad (E).

$$FP = FP/(FP+VN) \text{ o } c/(c+d)$$

Es la probabilidad condicional  $P(+/NE)$  de dar un resultado positivo (+) cuando no existe el evento enfermedad (E). Es llamado Error tipo I o  $\alpha$ . Los siguientes son parámetros “*a posteriori*”:

$$VPP = VP/(FP+VP) \text{ o } a/(a+c)$$

Es la probabilidad condicional  $P(E/+)$  de estar enfermo (E) cuando se da un resultado positivo (+) con la prueba diagnóstica.

$$VPN = VN/FN+VN) \text{ o } d/(b+d)$$

Es la probabilidad condicional  $P(NE/-)$  de No estar enfermo cuando primero se da un resultado negativo (-) con la prueba diagnóstica.

Razón de Verosimilitud (LR).

La finalidad del uso de una prueba diagnóstica es influir en la opinión del médico acerca de si el animal tiene la enfermedad o no. A tal efecto, presentar el resultado como positivo o negativo no es útil por lo revisado previamente, ya que ese resultado que podría ser un FP o FN. Por lo tanto, es necesario un valor que evidencie al médico cuán posible podría ser que el resultado de la prueba fuese producido por un enfermo en comparación con un no enfermo. Esto es posible con la LR ó Cociente de probabilidad. Puede calcularse tanto para los resultados positivos “razón de verosimilitud positiva” (LRp), como para los negativos (LRn).  
 $LRp = [a/(a+b)] / [c/(c+d)]$  o  $LRp = \text{Sensibilidad}/(1-\text{Especificidad})$  o  $LR+ = P(+/E) / P(+/NE)$ .

Si el resultado de la prueba diagnóstica es (+) hay X (valor de LR+) /1 posibilidades estar enfermo. Indica cuántas veces aumenta la posibilidad de estar enfermo, que no estar enfermo, ante un resultado (+).

$LRn = [b/(a+b)] / [d/(c+d)]$  o  $LRn = (1-\text{Sensibilidad}) / \text{Especificidad}$  o  $LRn = P(-/E) / P(-/NE)$ .

Si el resultado de la prueba diagnóstica es (-) se tiene X (valor de LR-) /1 posibilidades de estar enfermo. Se utiliza con menos frecuencia que el LR+. Indica cuántas veces aumenta la posibilidad de estar enfermo, que no estar enfermo ante un resultado (-).

Prevalencia real=  $(a+b) / (N)$

Es la probabilidad de estar enfermo  $P(E) = E/N$

1-Prevalencia=  $(c+d) / (N)$

Es la probabilidad de no estar enfermo  $P(NE) = NE/N$ .

El LR no depende de la prevalencia y proporciona una medida cuantitativa de la información diagnóstica producida por el resultado de una prueba en particular. Si se usa en combinación con la expectativa inicial de la probabilidad que un animal tenga una cierta condición (probabilidad pre prueba) se puede calcular una

estimación revisada de la probabilidad general de la condición (probabilidad pos prueba). Con el fin de realizar la revisión de la probabilidad pre prueba, tiene que convertirse en una “odds” pre prueba (*a priori*).

*Odds a priori* = Prevalencia / (1-Prevalencia) Es la razón entre la  $P(E)/(1-P(E))$ . Si el resultado se multiplica por el LR+ se puede estimar las probabilidades “odds” pos prueba (*a posteriori*) +.

*Odds a posteriori* + = *Odds a priori* x LR+

Es la posibilidad de estar enfermo si el resultado es positivo (+), mientras que el *Odds a posteriori* – (= *Odds a priori* x LR-) es la posibilidad de estar enfermo si el resultado es negativo (-). Para convertir a estos valores en probabilidad se deberán realizar los siguientes cálculos:

Probabilidad Pos Prueba Positiva (PPP+) =  $\frac{\text{Odds a posteriori} +}{1 + \text{Odds a posteriori} +}$

Probabilidad Pos Prueba Negativa (PPN-) =  $\frac{\text{Odds a posteriori} -}{1 + \text{Odds a posteriori} -}$  La PPP+ y la PPN- son las probabilidades de estar enfermo si los resultados son (+) o (-) respectivamente.

### **Análisis de las componentes principales (PCA)**

El PCA construye una transformación lineal que escoge un nuevo sistema de coordenadas para el conjunto original de datos en el cual la varianza de mayor tamaño del conjunto de datos es capturada en el primer eje (llamado el Primer Componente Principal), la segunda varianza más grande es el segundo eje, y así sucesivamente. Permite observar la relación entre variables cuantitativas y cualitativas. Es de gran utilidad en el análisis exploratorio de datos. Es de esperar que estos dos primeros componentes expliquen un porcentaje importante de la variabilidad de los datos. Para su ejecución se utilizó el software R y la biblioteca FactoMineR.

### **Regresión logística**

En la regresión logística es un tipo de modelo en que la variable dependiente es cualitativa. En este modelo se busca una función que relacione variables independientes (predictoras) cuantitativas y/o categóricas con la probabilidad que una variable dependiente cualitativa tome uno u otro valor de dos posibilidades. Es decir, la variable dependiente será dicotómica. Es útil para modelar la probabilidad de un evento ocurriendo en función de otros factores. El análisis de regresión logística se enmarca en el conjunto de Modelos Lineales Generalizados (GLM por sus siglas en inglés) que usa como función de enlace la función logit. Las probabilidades que describen el posible resultado de un único ensayo se modelan como una función de variables explicativas, utilizando una función logística.

**Prueba de Chi<sup>2</sup>.** Esta prueba estadística se usa para evaluar si hay o no una asociación entre dos variables. Es decir, nos da información acerca de independencia o no de las variables entre sí. Mientras menor sea el grado de asociación, menor es el valor de Chi<sup>2</sup>; cuando la independencia entre ellas es nula el valor es cero. Por el otro lado, cuanto mayor sea el grado de independencia entre las variables, el valor de Chi<sup>2</sup> será mayor, hasta alcanzar la independencia absoluta. El nivel de significancia usado fue de  $P < 0.05$  y en todos los casos se utilizó la corrección de Yates.

## CAPÍTULO 3. RESULTADOS.

### 3.1. Producción y caracterización de antígeno.

La producción de antígeno se llevó a cabo como se describe en el apartado 2.2 del capítulo materiales y métodos, posteriormente se practicó una corrida electroforética como se describe en el apartado 2.3 comparando distintos lotes del antígeno WLA (L2, L4, L5, L8, L9) con el PPA (Allied Monitor®, INC; Fayette, USA). (Figura 12).

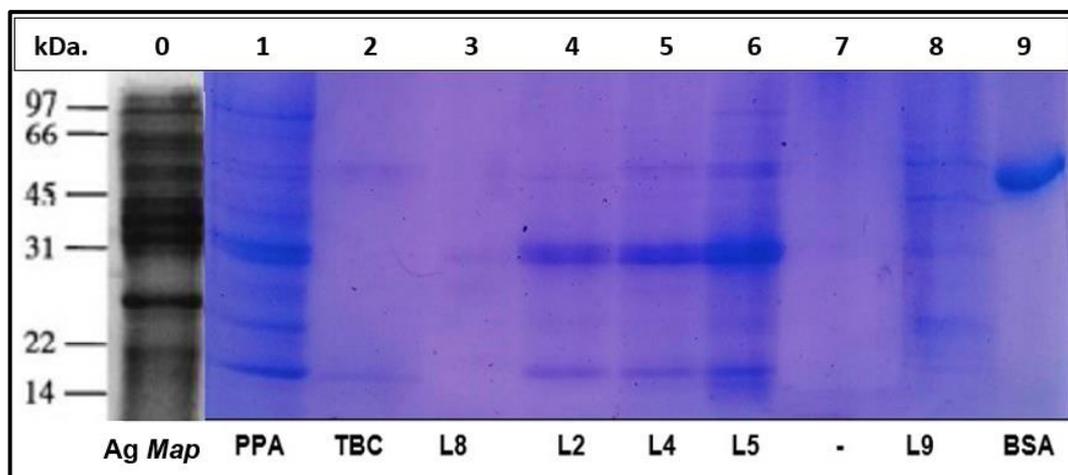


Figura 12. SDS-PAGE de los antígenos producidos y utilizados. Podemos observar los diferentes patrones de bandas obtenidos y su peso molecular aproximado. kDa= kilo Dalton. Calle 0= Antígeno obtenido a partir de *Map*, imagen extraída de Reichel y col. (1999). Calle 1= Antígeno PPA. Tanto calle 0 como calle 1 son patrones de comparación con el resto de los lotes de antígenos de producción local. Calle 2= antígeno de tuberculosis. Calle 3= L8. Calle 4= L2. Calle 5= L4. Calle 6= L5. Calle 8= L9 y Calle 9= seroalbúmina bovina proteína que tiene un PM de 66,5 kDa.

En base a este ensayo los antígenos utilizados en esta tesis fueron los lotes L2, L4 y L5 los cuales mostraron mayor integridad en sus bandas. Posteriormente mediante el método de Bradford se estimó la cantidad aproximada de proteínas de los mismo siendo en promedio 32 mg/mL. Lo cual a la dilución de trabajo del ELISA aplicada equivale a un aproximado de entre 5-6,6 µg/pocillo.

Con la finalidad de comparar el desempeño de los antígenos comercial PPA y el WLA producido a partir de *M. avium* subsp. *avium* en el ELISAI-S se procesaron un total de 72 sueros sanguíneos como se describe en el apartado 2.4; en el caso de PPA se utilizó a una concentración de 7,5 µg /pocillo. Los cultivos en materia fecal de los 72 animales se ejecutaron como indica el apartado 2.8. Obtenidos los porcentajes de positividad (pos) se procedió a realizar el análisis estadístico. (Tabla 4). Primariamente se evaluaron los datos mediante Shapiro Wilk, se constató que los mismos no presentaban distribución normal, al ser dos mediciones distintas sobre la misma muestra se aplicó el test no paramétrico de Wilcoxon, observándose diferencias significativas entre PPA y WLA ( $p\text{-value}=1.749e^{-12}$ ). En la Figura 13 se puede observar un gráfico boxplot que muestra las diferencias entre las medias de los pos obtenidos a partir de ambos antígenos, siendo los de PPA significativamente menores que los de WLA. Se correlacionaron ambos resultados, obteniendo un coeficiente de correlación de 0,901 con un IC del 95% (0,856-0,100), siendo la correlación entre los resultados obtenidos para ambos antígenos positiva y estadísticamente significativa ( $p\text{-value}<0,05$ ). En la Figura 14 se muestra la distribución de los pos obtenidos al enfrentar a cada suero bajo prueba a los antígenos PPA y WLA mediante el test de ELISAI-S.

		PPA		TOTAL
		Negativos	Positivos	
WLA	Negativos	68	1	69
	Positivos	0	3	3
	TOTAL	68	4	72

Tabla 4. Resumen de los resultados obtenidos para un punto de corte del 65% para ambos antígenos.

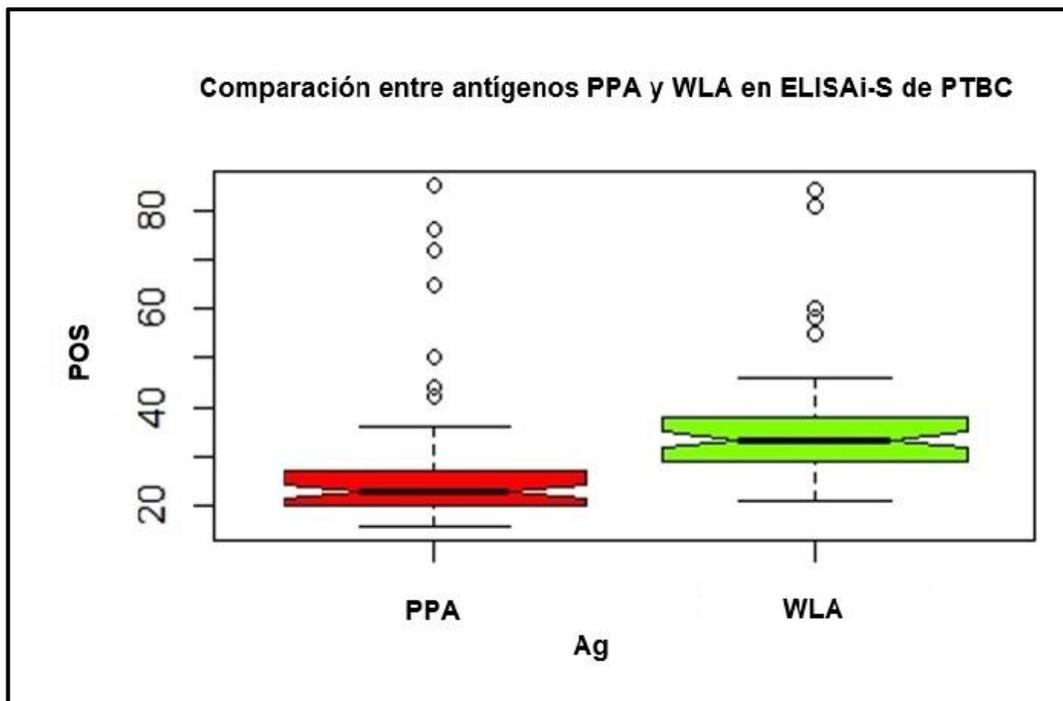


Figura 13. Comparación de los porcentajes de positividad (pos) obtenidos en el ELISAI-S utilizando antígeno (Ag) PPA y WLA. Las muecas de las cajas evidencian que las medias difieren significativamente.

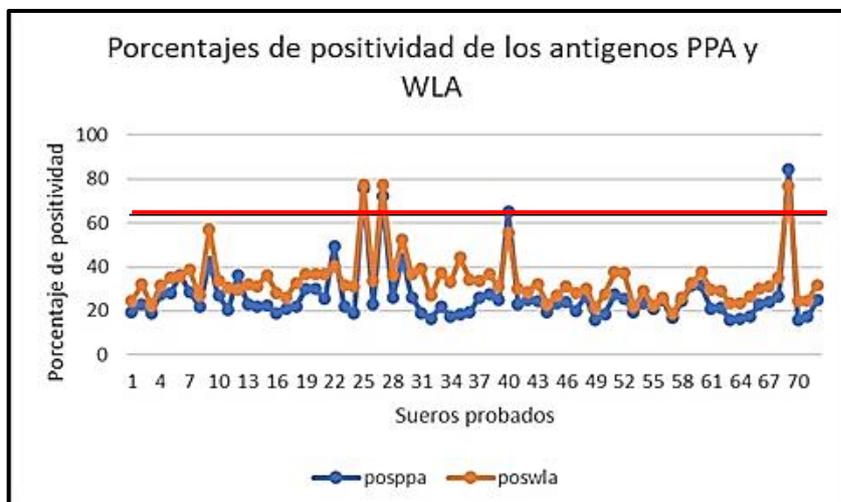


Figura 14. Distribución de los pos de los 72 sueros analizados mediante ELISAI-S con los dos antígenos bajo prueba. Los pos obtenidos por PPA son inferiores a los de WLA, lo cual no influye significativamente a la hora de clasificarlos como positivos y negativos. La línea roja indica el punto de corte.

A continuación, se estimó la concordancia mediante el cálculo del valor *Kappa* con IC del 95% empleando el software online WinEPI ([WinEpi: Working IN](#)

EPIde miology), siendo el mismo de 0,85 con un IC del 95% (0,62-1,08); el cual expresa un grado de concordancia excelente entre el uso de antígenos PPA y WLA. En cuanto a los cultivos en materia fecal resultaron positivos 3/72. Con la información del cultivo y los resultados de ambas serologías se obtuvieron las AUC de PPA, WLA y se compararon mediante *DeLong's test*, utilizando el software R versión (4.0.2), paquete pROC (Robin y col., 2011). No se encontraron diferencias significativas entre las AUC obtenidas (p-value= 0,695), siendo las mismas de 0,763 y 0,756 y para PPA y WLA respectivamente.

### 3.2. Resultados serológicos y aislamientos de *Map* en heces.

Se obtuvieron muestras individuales de materia fecal, suero sanguíneo y leche de 370 bovinos Holando Argentino. Las mismas fueron procesadas mediante cultivo, ELISAI-S y ELISAI-L respectivamente, con la finalidad de conocer el estatus de cada individuo en cuanto a la eliminación fecal de *Map* mediante su aislamiento y posterior confirmación por PCR IS900, las muestras de materia fecal se colectaron en algunas ocasiones una semana posterior a la ejecución de las serologías y en otros casos en el mismo momento que las muestras de suero y leche. Los resultados se resumen en la tabla 5.

370 (100%)	ELISAI-S+	ELISAI-S-	ELISAI-L+	ELISAI-L-
Cultivos+ (59)	43 (11,62%)	16 (4,32%)	37 (10%)	22 (5,95%)
Cultivos- (311)	36 (9,73%)	275 (74,32%)	28 (7,57%)	283 (76,49%)

Tabla 5. Resultados de los 370 ELISAI-S, ELISAI-L para un punto de corte del 70% de positividad y cultivos en materia fecal para la detección de *Map* confirmados por IS900.

Se elaboró la siguiente tabla de doble entrada con la finalidad de obtener la índice *kappa* entre ambos ELISAs.

		ELISAI-S		TOTAL
		Negativos	Positivos	
ELISAI-L	Negativos	279	12	291
	Positivos	26	53	79
	TOTAL	305	65	370

La concordancia obtenida mediante el cálculo del coeficiente *kappa* fue de 0,67 con un IC 95% (0,57-0,77), el cual expresa un grado de concordancia acorde entre el ELISAI-S y el ELISAI-L para el diagnóstico de PTBC.

Posteriormente, utilizando como variable los pos se estimó un coeficiente de correlación entre ambos ELISAs de 0,69 con un IC del 95% (0,63-0,74), resultando una correlación positiva y estadísticamente significativa ( $p\text{-value} < 2,2e^{-16}$ ), como se evidencia en la Figura 15. Se estimó una regresión lineal entre ambos ELISAs siendo la misma significativa con un  $R^2=0,48$  indicando un grado de acuerdo sustancial.

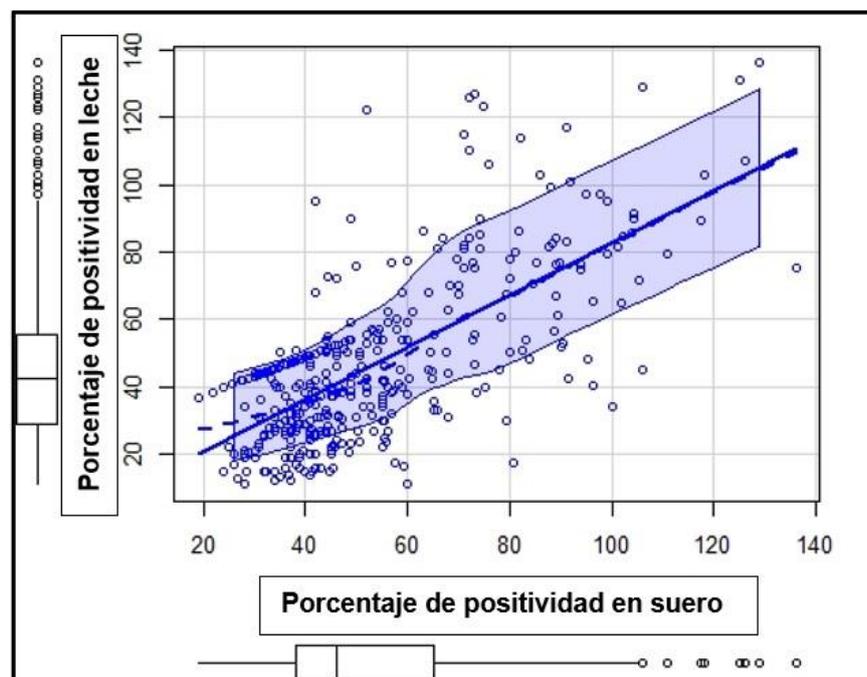


Figura 15. El gráfico de dispersión muestra una asociación positiva y una relación lineal entre el ELISAI-S y el ELISAI-L para el diagnóstico de PTBC. Con un IC del 95% que se vuelve algo más amplio aproximadamente a partir de 70% positividad donde los datos son más dispersos con respecto a la línea de tendencia central.

### 3.2.1. Análisis ROC de ELISAI-L y ELISAI-S

En este apartado el objetivo fue calcular mediante análisis ROC las AUC, las características operativas de los dos ELISAs y estimar el punto de corte.

Se realizó el análisis estadístico empleando el software R Core Team versión 4.0.2 (2020). Las variables en estudio fueron los pos obtenidos luego de ejecutar ambos ELISAs, y cultivos positivos como casos (1) y negativos como controles (0), se trabajó sobre los resultados presentados en el apartado 3.2. El área bajo la curva (AUC), puntos de corte, Se y Sp se determinaron mediante análisis ROC utilizando el paquete pROC (Robin col., 2011), se calcularon los valores predictivos mediante estadística bayesiana (Risso y Risso, 2017). El análisis ROC arrojó un AUC de 0,862 con un IC 95% (0,81-0,92) para el ELISAI-S. y de 0,817 con un IC 95% (0,75-0,89) para el ELISAI-L, con una potencia de 1 para ambas AUC. Si bien por los valores de ambas AUC se pueden clasificar como test diagnósticos buenos (0,75-0,9), mediante el estadístico *DeLong's test* se observaron diferencias significativas entre ambas AUC (p-value= 0,026), siendo menor el AUC obtenido para el ELISAI-L. Se calculó el punto de corte maximizando la Se y Sp para ambos ELISAs, es decir mediante índice de Youden, siendo de 68,2% para el ELISAI-S y 63,9% para el ELISAI-L respectivamente. La información que se resume en las Figuras 16 y 17. Para dichos puntos de corte la Se fue de 79,7% (69,4-89,8%) y 72,9% (61-83%) y la Sp de 88,4% (84,5-91,6%) y 89,7% (86,5-92,9%), para los ELISAI-S y en leche respectivamente, para el suero el VPP fue 0,566 y VPN fue 0,96; para el ELISAI-L el VPP fue 0,57 y el VPN fue 0,94.

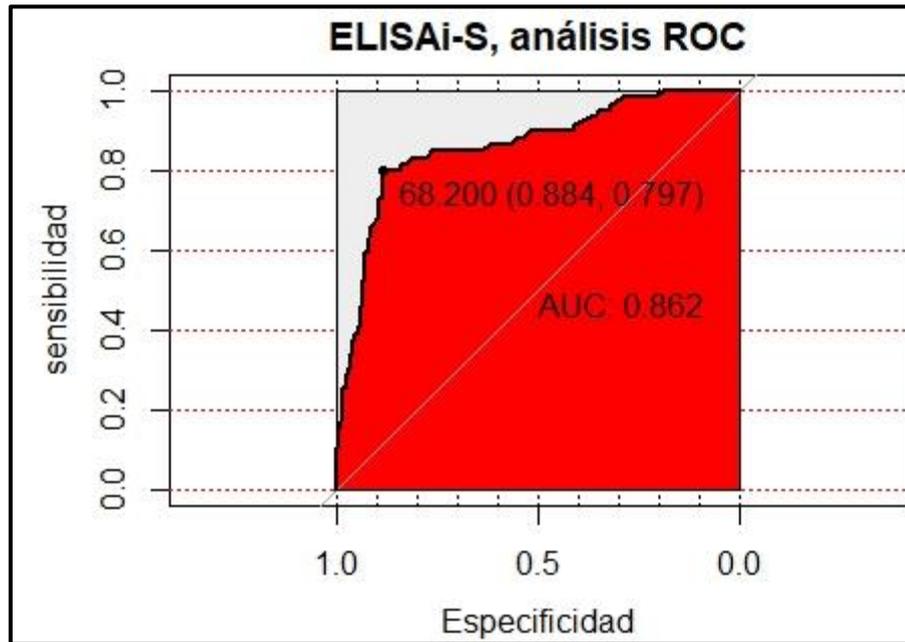


Figura 16. Gráfico de curva ROC obtenida para el ELISAI-S. Podemos evidenciar en él, el AUC, el punto de corte calculado mediante índice de youden, la Sp y Se para el mismo. En sus ejes la Se y Sp expresadas como frecuencias de 0 a 1.

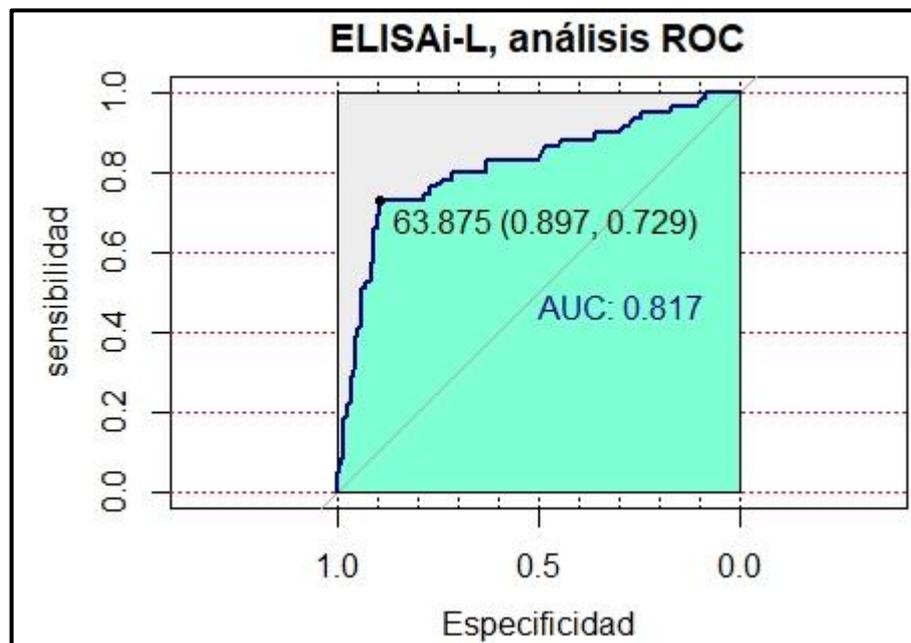


Figura 17. Gráfico de curva ROC obtenida para el ELISAI-L. Podemos evidenciar en él, el AUC, el punto de corte calculado mediante índice de youden, la Sp y Se para el mismo. En sus ejes la Se y Sp expresadas como frecuencias de 0 a 1.

En las tablas 6 y 7 se expresan para diferentes alternativas de puntos de corte expresados en pos los cálculos de su Se y Sp media, baja y alta.

A continuación, conociendo los puntos de corte se seleccionaron 3 alternativas, para cada uno de los ELISAs y se aplicó estadística bayesiana a través de la metodología de razón de probabilidades u Odds, cuyos resultados se resumen en las tablas 8 y 9. Obteniendo así LRp, LRn, Odds posteriori positivo y negativo (OpostP y OpostN) y los valores predictivos cuyas interpretaciones se aclararon previamente en el apartado 2.15 del capítulo materiales y métodos.

<b>Punto de corte (%)</b>	<b>Sp baja</b>	<b>Sp media</b>	<b>Sp alta</b>	<b>Se baja</b>	<b>Se media</b>	<b>Se alta</b>
68,2	0,84	0,88	0,92	0,69	0,79	0,89
72,9	0,87	0,90	0,93	0,55	0,67	0,79
75,0	0,89	0,92	0,95	0,50	0,62	0,74
79,7	0,90	0,93	0,96	0,56	0,57	0,69
83,3	0,91	0,94	0,96	0,34	0,45	0,59
88,2	0,92	0,95	0,97	0,28	0,40	0,52
90,8	0,94	0,96	0,98	0,22	0,33	0,45

Sp= especificidad; Se= sensibilidad; ELISAI-S= ELISA indirecto en suero.

Tabla 6. Especificidad (Sp) y sensibilidad (Se) calculadas utilizando el software R con el paquete pROC para distintos puntos de corte en ELISAI-S, con un Intervalo de Confianza del 95%.

<b>Punto de corte (%)</b>	<b>Sp baja</b>	<b>Sp media</b>	<b>Sp alta</b>	<b>Se baja</b>	<b>Se media</b>	<b>Se alta</b>
63,9	0,86	0,89	0,92	0,61	0,72	0,83
67,2	0,87	0,90	0,93	0,57	0,69	0,81
76,5	0,90	0,93	0,95	0,39	0,52	0,66
79,2	0,91	0,94	0,97	0,33	0,46	0,58
84,2	0,93	0,96	0,98	0,20	0,32	0,44
86,2	0,94	0,97	0,99	0,18	0,28	0,40
93,1	0,95	0,98	1,00	0,11	0,22	0,34

Sp= especificidad; Se= sensibilidad; ELISAI-L= ELISA indirecto en leche.

Tabla 7. Especificidad (Sp) y sensibilidad (Se) calculadas utilizando el software R con el paquete pROC para distintos puntos de corte en ELISAI-L con un Intervalo de Confianza del 95%.

<b>Corte</b>	<b>Oapri</b>	<b>LRp</b>	<b>LRn</b>	<b>OpostP</b>	<b>OpostN</b>		
	0,19	6,88	0,23	1,31	0,04		
<b>68,20%</b>	<b>Se</b>	<b>Sp</b>	<b>Pre</b>	<b>VPP</b>	<b>FP</b>	<b>VPN</b>	<b>FN</b>
	0,797	0,884	0,159	0,566	0,434	0,958	0,041
	<b>Oapri</b>	<b>LRp</b>	<b>LRn</b>	<b>OpostP</b>	<b>OpostN</b>		
	0,19	8,13	0,404	1,54	0,077		
<b>75,00%</b>	<b>Se</b>	<b>Sp</b>	<b>Pre</b>	<b>VPP</b>	<b>FP</b>	<b>VPN</b>	<b>FN</b>
	0,627	0,923	0,159	0,607	0,393	0,929	0,0767
	<b>Oapri</b>	<b>LRp</b>	<b>LRn</b>	<b>OpostP</b>	<b>OpostN</b>		
	0,19	8,92	0,654	1,69	0,124		
<b>89,00%</b>	<b>Se</b>	<b>Sp</b>	<b>Pre</b>	<b>VPP</b>	<b>FP</b>	<b>VPN</b>	<b>FN</b>
	0,373	0,958	0,159	0,629	0,371	0,89	0,11

Tabla 8. Resumen de las características operativas del ELISAI-S obtenidas a partir del análisis Bayesiano para distintos puntos de corte.

Los valores de Se y Sp media para los distintos puntos de corte no difieren entre la estadística frecuentista y la Bayesiana, la prevalencia obtenida en estas muestras analizadas fue del 15,9%. Podemos interpretar por ejemplo para un punto de corte de 68,8% en el ELISAI-S el LRp de la siguiente manera: si el

individuo está enfermo, tiene 6,88/1 posibilidades de ser positivo al test. El LRn: si está enfermo tiene 0,23/1 posibilidades de ser negativo al test. El OpostP: indica que ante un resultado positivo hay 1,31 posibilidades de estar enfermo. El OpostN: indica que ante un resultado negativo hay 0,04 posibilidades de estar enfermo.

<b>Corte</b>	<b>Oapri</b>	<b>LRp</b>	<b>LRn</b>	<b>OpostP</b>	<b>OpostN</b>		
	0,19	7,08	0,302	1,34	0,057		
<b>64,00%</b>	<b>Se</b>	<b>Sp</b>	<b>Prev</b>	<b>VPP</b>	<b>FP</b>	<b>VPN</b>	<b>FN</b>
	0,729	0,897	0,159	0,573	0,427	0,946	0,0542
	<b>Oapri</b>	<b>LRp</b>	<b>LRn</b>	<b>OpostP</b>	<b>OpostN</b>		
	0,19	6,54	0,516	1,24	0,0979		
<b>75,00%</b>	<b>Se</b>	<b>Sp</b>	<b>Prev</b>	<b>VPP</b>	<b>FP</b>	<b>VPN</b>	<b>FN</b>
	0,525	0,92	0,159	0,554	0,446	0,911	0,0892
	<b>Oapri</b>	<b>LRp</b>	<b>LRn</b>	<b>OpostP</b>	<b>OpostN</b>		
	0,19	8,66	0,639	1,64	0,121		
<b>82,00%</b>	<b>Se</b>	<b>Sp</b>	<b>Prev</b>	<b>VPP</b>	<b>FP</b>	<b>VPN</b>	<b>FN</b>
	0,39	0,955	0,159	0,622	0,378	0,892	0,108

Tabla 9. Resumen de las características operativas del ELISAI-L obtenidas mediante análisis Bayesiano para distintos puntos de corte.

Podemos interpretar por ejemplo para un punto de corte de 64% en el ELISAI-L el LRp de la siguiente manera: si el individuo está enfermo, tiene 7,08/1 posibilidades de ser positivo al test. El LRn: si está enfermo tiene 0,302/1 posibilidades de ser negativo al test. El OpostP: indica que ante un resultado positivo hay 1,34 posibilidades de estar enfermo. El OpostN: indica que ante un resultado negativo hay 0,05 posibilidades de estar enfermo.

### 3.2.2. Análisis de variables y ELISAI-L.

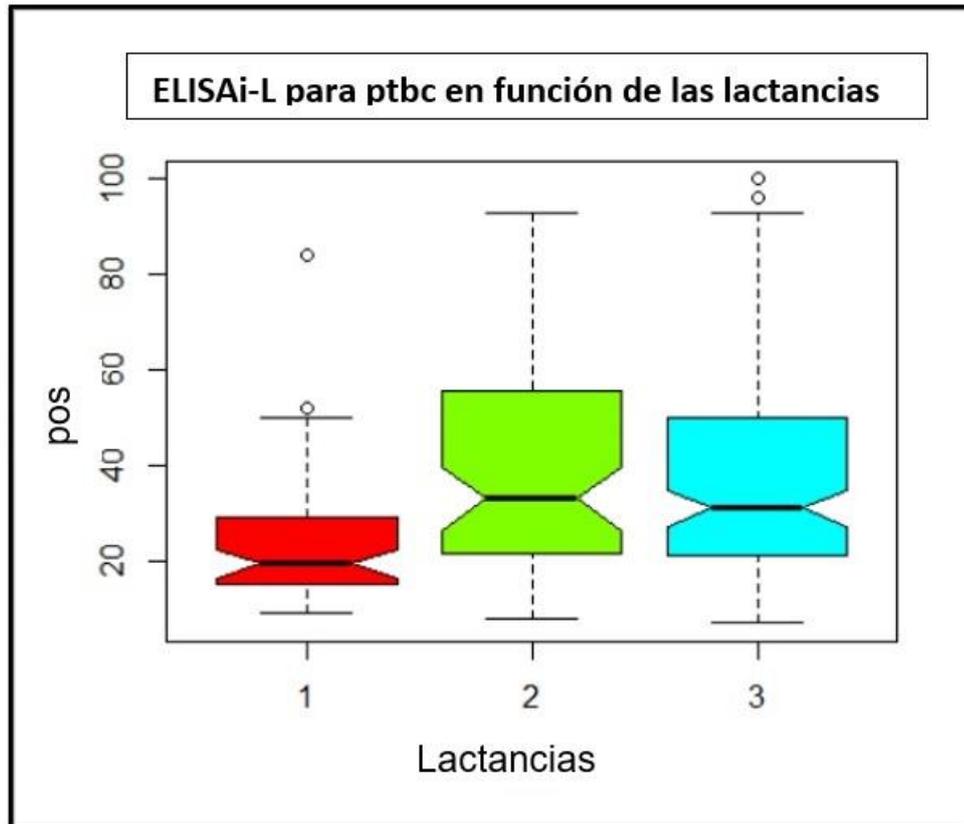
Se analizaron los resultados de ELISAI-L para el diagnóstico de PTBC de 275 animales considerando las variables número de lactancias, producción en litros y días en lactancia (DEL) como posibles covariables o factores asociados a la variación del resultado del ELISAI-L para el diagnóstico de PTBC.

La estadística se efectuó mediante el test no paramétrico Kruskal Wallis y en aquellas variables donde se encontró diferencias entre grupos se realizó el test de Wilcoxon con la finalidad de evaluar entre que grupos existía diferencias.

Para su análisis el número de lactancias fue agrupado en 1°, 2° y más de 2 lactancias (>2°). Se dividió la producción en litros en cuartiles y en base a esto se formaron 4 grupos para su posterior análisis de la siguiente manera: grupo 1: de 5 a 18,69 L, grupo 2: de 18,7 a 21 L, grupo 3: de 21,01 a 25,21 L, y grupo 4: de 25,22 a 54 L. Los DEL se agruparon de la siguiente manera: en el grupo 1 de 5-44 DEL, grupo 2 de 45-90 DEL, grupo 3 de 91-140 DEL y grupo 4 de 141-305 DEL. Para el ELISAI-L en función de las lactancias el test de Kruskal Wallis arrojó diferencias significativas (p-value <0,05), la prueba *pos hoc* evidencio diferencias entre los pos en leche de los individuos de 1° lactancia con respecto a los de 2° y más de 2 lactancias como se evidencia en la Figura 18. La tabla 10 expresa los resultados del test de Wilcoxon.

	1° lactancia (1)	2° lactancia (2)
2° lactancia (2)	p-value= 3,6e-05*	-
>2° lactancia (3)	p-value= 2,2e-07*	p-value= 0,95

Tabla 10. Resultados del test de Wilcoxon comparando los grupos de número de lactancias. Se evidencia que entre los grupos de 2° y >2° lactancias no hay diferencias significativas, pero si las hay entre estos y el grupo de 1° lactancia. Siendo los pos del ELISAI-L significativamente (\*) menores en el grupo de 1° lactancia.



Referencias. pos= porcentaje de positividad (ELISAI-L), lact= lactancias. 1= 1° lactancia; 2= 2° lactancia; 3 = mayor a 2 lactancias.

Figura 18. Comparación de los pos obtenidos mediante ELISAI-L para el diagnóstico de PTBC en función del número de lactancias. Las muescas representan los intervalos de confianza (IC), obsérvese que las del grupo de 1 (1° lactancia) no están incluidas en los IC de los grupos de 2° de >2° lactancias, coincidiendo con el resultado de la prueba *pos hoc*.

Para el análisis de la producción en litros preliminarmente se realizó un gráfico de tipo bandplot representado en la Figura 19, el mismo muestra la distribución de los pos obtenidos en el ELISAI-L para el diagnóstico de PTBC en función de la producción en litros.

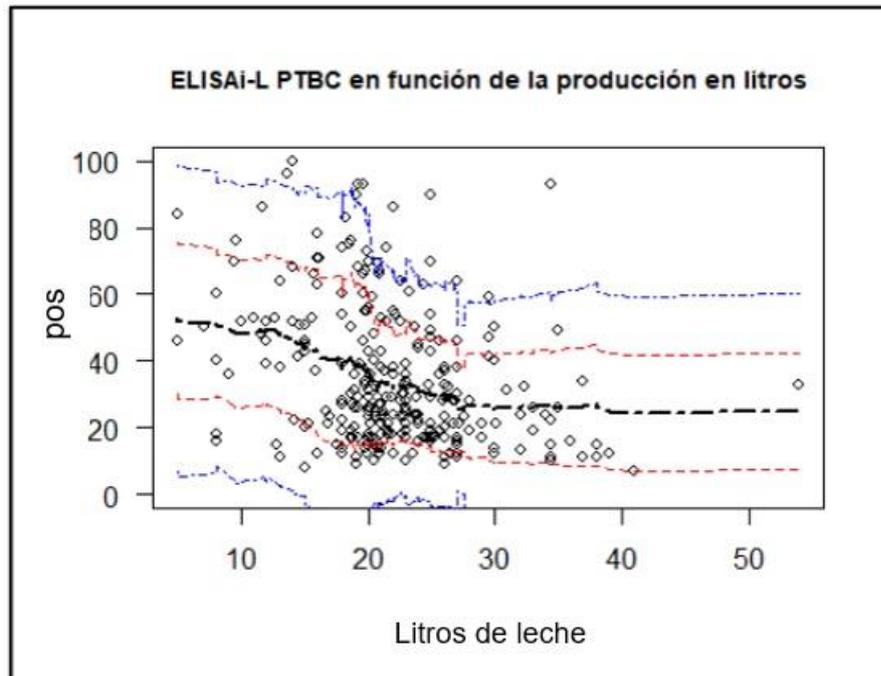


Figura 19. Gráfico bandplot donde se evidencia la dispersión de los pos para el ELISAI-L en función de la producción en litros. La línea del medio (en color negro) representa a la media, las líneas rojas representan las medias más y menos un DS (+1DS, -1DS). Las líneas azules representan las medias más y menos 2 DS (+2DS, -2DS).

Se evidencia en el mismo una mayor dispersión de los resultados para los individuos que producen aproximadamente menos de 20 L y una menor dispersión, pero más constante a partir de los 20 L.

Para el ELISAI-L en función de la producción en litros el test de Kruskal Wallis arrojó diferencias significativas ( $p$ -value  $< 0,05$ ) entre los grupos conformados, los resultados de la prueba *pos hoc* evidencian en tabla 11.

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Grupo 2	p-value=0,048*	-	-
Grupo 3	p-value=0,012*	p-value=0,58	-
Grupo 4	p-value=1,6e-05*	p-value=0,0092*	p-value=0,012*

Referencias. grupo 1= de 5 a 18,69 L, grupo 2= de 18,7 a 21 L, grupo 3= de 21,01 a 25,21 L, y grupo 4= de 25,22 a 54 L. \*= diferencias significativas.

Tabla 11. Resultados del test de Wilcoxon para el ELISAI-L de PTBC en función de la producción en litros.

Obsérvese que no existen diferencias significativas entre grupo 2 y grupo 3, pero sí entre estos y el grupo 1 y 4. En la Figura 20 podemos interpretar que a medida que aumenta la producción la DO en leche disminuye, lo cual puede estar dado por una dilución de anticuerpos cuya concentración en leche se mantiene relativamente constante durante la lactancia teniendo variaciones por el volumen producido, lo cual no indica necesariamente una variación del resultado del ELISAI-L para el diagnóstico de PTBC ya que también podemos observar individuos positivos a dicha prueba con alta producción en litros.

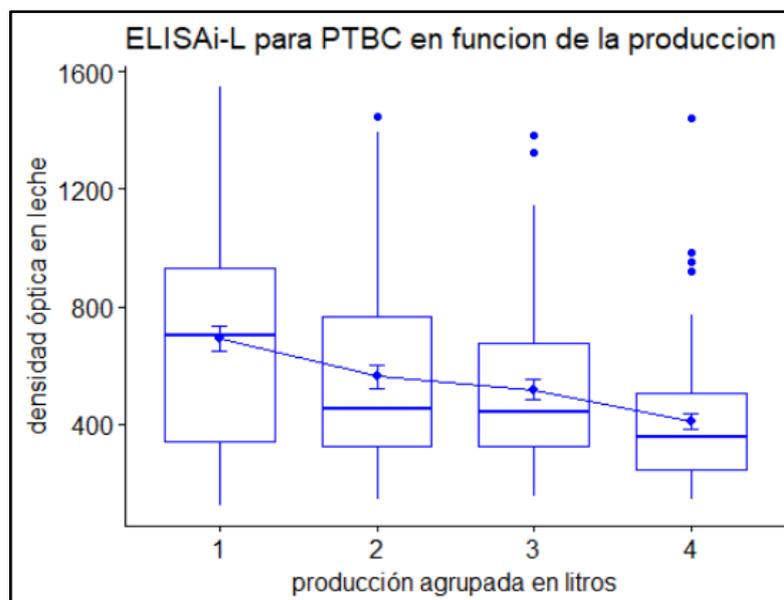


Figura 20. ELISAI-L para PTBC en función de la producción.

En el caso de los DEL el test de Kruskal Wallis arrojó diferencias significativas ( $p$ -value  $< 0,05$ ) entre los grupos conformados, los resultados de la prueba *pos hoc* se evidencian en tabla 12.

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Grupo 2	p-value=0,0344*	-	-
Grupo 3	p-value=0,8395	p-value=0,0344*	-
Grupo 4	p-value=0,9489	p-value=0,0034*	p-value=0,8027

Referencias. grupo 1 de 5-44 DEL, grupo 2 de 45-90 DEL, grupo 3 de 91-140 DEL y grupo 4 de 141-305 DEL. \*= Diferencias significativas.

Tabla 12. Resultados del test de Wilcoxon para el ELISAI-L de PTBC en función de los DEL.

Podemos evidenciar que el grupo 2 (45-90) días en lactancia difiere significativamente de los grupos 1, 3 y 4. Dicho resultado probablemente sea debido al pico de producción relacionado por lo general a estos DEL.

Se realizó un análisis de las componentes principales (PCA) tomando en cuenta los resultados del ELISAI-L, la producción en litros y los resultados de los cultivos en materia fecal de los 275 individuos incluidos en este análisis. En la Figura 21 podemos apreciar el gráfico de variables generado.

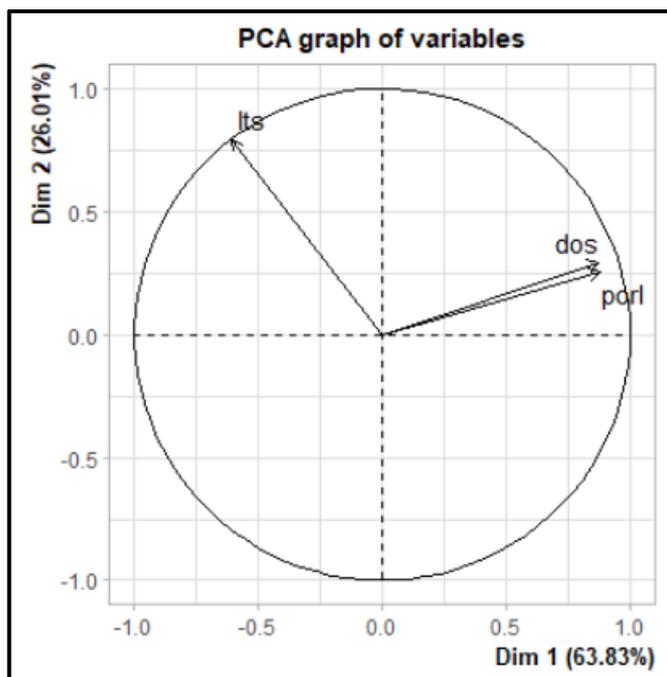


Figura 21. Gráfico de variables obtenido luego de realizar el PCA.

Las componentes generadas a partir de las variables pos en leche y la DO en el ELISAI-S se encuentran en el mismo sentido lo cual marca una correlación positiva, dichas componentes son perpendiculares a la de producción en litros, lo cual nos permite interpretar que en los datos analizados la producción en litros no

depende del pos en el ELISAI-L, ni de la DO en suero. No obstante, al introducir el resultado del cultivo como variable cualitativa al análisis PCA pudimos observar diferencias en la producción en litros entre individuos con aislamiento *Map* positivo y negativo. (Figura 22).

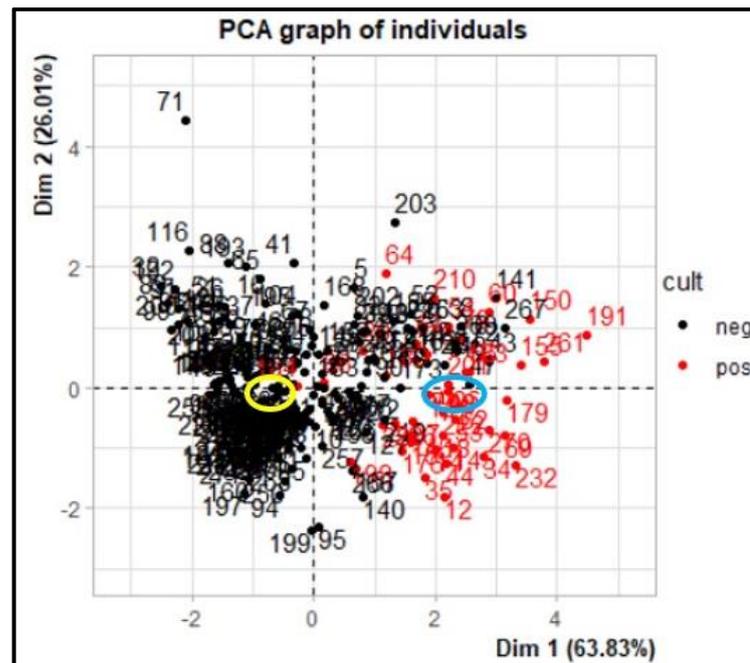


Figura 22. Gráfico de individuos obtenido luego del análisis PCA. La no superposición de las elipses evidencia con un 95% de confianza que existen diferencias significativas en la producción entre individuos con aislamiento *Map* positivo y negativo.

En el semiplano de la derecha se ubicarían los individuos de mayor DO y por lo tanto pos al ELISAI-L de PTBC, así como también los de menor producción en litros y en el semiplano de la izquierda los de menor DO y mayor producción en litros. Si tomamos el eje horizontal en el semiplano superior a este se ubicarían los individuos con mayor producción en litros y en el semiplano inferior los de menor producción en litros. En color rojo podemos distinguir los individuos positivos y en negro los negativos al cultivo de *Map* en materia fecal.

### 3.3. Implementación de ELISAI-L en pooles de muestras individuales

Los objetivos fueron establecer las características operativas de un ELISAI, “*in house*” para el diagnóstico de PTBC en pooles de leche (ELISAip-L), determinar el número adecuado de muestras por pool, calcular la prevalencia aparente (PA) mediante pooles, evaluar los costos operativos y su potencial reducción.

El número de muestras por pool fue determinado como se explica en el apartado 2.5.2. Resultando en 4 muestras por grupo, siendo en nuestro caso, el tamaño de pool ( $S_1$ ) que permitiría procesar menor cantidad de muestras. (Tabla 13).

<b>Muestras pool (<math>S_1</math>)</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>prevalencia(<math>P_0</math>)</b>	0,078			
<b>Pool prevalencia(<math>P_1</math>)</b>	0,15	0,22	0,28	0,33
<b>n° de muestras</b>	167			
<b>Cantidad de pooles</b>	83,5	56	41,75	33,4
<b>Repeticiones</b>	25	36	46	56
<b>Total, a procesar</b>	108,5	92	88	89

Tabla 13. Se puede observar el cálculo de  $P_1$  a partir de la prevalencia ( $P_0$ ) y muestras por pool ( $S_1$ ), lo cual permite conocer el total de muestras a procesar (pool + repeticiones).

Efectuado el ELISA en pooles de leche (ELISAip-L), se calcularon las características operativas de ambos ELISAs, utilizando software R Core Team versión 4.0.2 (2020-06-22), paquete pROC. Tomando como casos (1) los cultivos positivos y como controles (0) los cultivos negativos, para la alternativa en pooles se tomó como caso el pool que contenía como mínimo un individuo con cultivo positivo. La PA a través de los pooles ( $P$ ), se estimó con la fórmula:  $P = 1 - (1 - X/M)^{1/S_1}$ , donde  $X$  es el número de pooles positivos,  $M$  pooles testeados y  $S_1$  es el tamaño o sisa del pool.

Para el ELISAip-L de 42 pooles (**M**), 11 dieron positivos (**X**) y 31 negativos. El análisis ROC arrojó un AUC de 89% con un IC 95% (78,51%-99,96%) para el ELISAi-L individual, y un AUC de 83% con un IC 95% (65,75%-100%) para el ELISAip-L, mediante el estadístico *DeLong's test* no se observaron diferencias significativas entre ambas AUC ( $p= 0,53$ ). Para nuestro punto de corte de 70% en el ELISAi-L individual la Se fue de 76,92% con IC 95% (54-100%) y la Sp 92,21% con IC 95% (88-97%), en el ELISAip-L la Se fue de 45,45% con IC 95% (18-73%) y la Sp 93,55% con un IC 95% (84-100%). Se seleccionó la sisa de 4 muestras por pool que permitiría procesar el menor número de muestras. La prevalencia individual calculada a través de aislamientos de *Map* fue de 7,8% la obtenida a partir de esa sisa de pool fue de 7,31%. Con el uso de ELISAip-L inicialmente se permite reducir el número de pruebas en un 75%, es decir se procesa la totalidad de las muestras (167) en 42 pooles. El total de las determinaciones fueron 88 (pooles + repeticiones) lo que equivaldría al 52,69% del total de las muestras individuales.

<b>S<sub>1</sub></b>	<b>P<sub>0</sub></b>	<b>Muestras totales</b>	<b>N</b>	<b>P</b>	<b>Costo pool (USD)</b>	<b>Ahorro</b>	<b>Ahorro (USD)</b>
2	5%	60	100	4,9%	147,0	40%	98,0
	8%	65	100	7,7%	159,3	35%	85,8
	15%	78	100	13,9%	190,5	22,25%	54,5
	20%	86	100	18,0%	210,7	14%	34,3
	30%	101	100	25,5%	247,5	-1%	-2,5
3	5%	48	100	4,7%	116,6	52,41%	128,4
	8%	55	100	7,4%	135,9	44,54%	109,1
	15%	72	100	12,9%	176,2	28,08%	68,8
	20%	82	100	16,3%	201,2	17,87%	43,8
	30%	99	100	21,9%	242,6	1%	2,4
4	5%	44	100	4,6%	106,7	56,45%	138,3
	8%	53	100	7,1%	130,7	46,64%	114,3
	15%	73	100	12,0%	178,3	27,21%	66,7
	20%	84	100	14,8%	205,9	15,96%	39,1
	30%	101	100	19,0%	247,4	0,99%	-2,4
5	5%	43	100	4,5%	104,4	57,38%	140,6
	8%	54	100	6,8%	132,5	45,91%	112,5
	15%	76	100	11,4%	185,3	24,38%	59,7
	20%	87	100	13,4%	213,7	12,77%	31,3
	30%	103	100	16,6%	252,8	0	-7,8

S<sub>1</sub>= muestras por pool, P<sub>0</sub>= prevalencia, muestras totales= pooles + repeticiones, N= muestras individuales, P= prevalencia aparente estimada a través de pooles, (USD)= dólares, Ahorro= expresado en porcentaje (%).

Tabla 14. Número de determinaciones a procesar mediante ELISAI-P en función de la prevalencia. Se puede observar un ejemplo hipotético de 100 muestras como varía el número de muestras a procesar, la P obtenida en función de la sisa del pool, prevalencia individual, y el ahorro aproximado en base a la implementación del ELISAI-P-L.

### 3.4 Análisis de ELISAI-L de tanque y seroprevalencia individual

El objetivo de este análisis fue demostrar la existencia de correlación entre el ELISAI-L individual y el nivel de anticuerpos contra *Map* presente en leche de tanque (LT), también se realizó una regresión con la finalidad de obtener un modelo que permita predecir la PA en establecimientos con diferentes prevalencias a PTBC a través del análisis de muestras de LT. Se obtuvieron 8 muestras de LT y 1508 muestras de leche individual de la totalidad de las vacas en ordeño, los muestreos se resumen en la tabla 15. Se procedió a realizar el ELISAI-L como se describe en el apartado 2.5. Se calcularon los pos individual y las PA en cada uno de los muestreos. Las DO de los ELISAI-LT (DOLT) no se clasificaron como positivas o negativas, sino que se utilizaron para realizar la correlación con sus respectivas PA, aplicando así el ELISAI-LT como posible predictor de la situación epidemiológica de PTBC en el tambo muestreado. Con el software estadístico R se realizó el estudio de correlación entre las DOLT y las PA en leche, la correlación fue estadísticamente significativa ( $p\text{-value} = 0,001$ ), el coeficiente de correlación fue de 0,898 con un IC del 95% (0,623-1) demostrando una correlación positiva entre ambas variables. La potencia calculada para dicho ensayo fue de 0,93, afirmando de esta forma que la correlación entre ambas variables existe.

Posteriormente se procedió a realizar una regresión lineal, se tomó como variable dependiente las DOLT y como variable independiente las PA.

El modelo lineal obtenido quedó conformado de la siguiente manera:  $DOLT = 12,97 * PA + 329,92$ , siendo el ajuste lineal realizado estadísticamente significativo ( $p\text{-value} = 0,002$ ), el valor de R-cuadrado fue de 0,808 indicando que el modelo explica el 80,8% del valor de la variable DOLT.

Muestras ind.	ELISAI-L+	PA (%)	DOLT	Tambo	Mes
281	9	3,20	320	3	abr-21
185	12	6,49	400	1	ago-19
172	12	6,98	425	1	ene-20
170	13	7,65	410	1	jul-19
187	15	8,02	423	1	sep-19
175	14	8,00	469	1	oct-19
167	15	8,98	522	1	dic-19
171	41	23,98	620	2	nov-19

ind: individuales; ELISAI-L+: cantidad de positivos al ELISAI-L; %PA: prevalencia aparente en %; DOLT: densidad óptica en leche de tanque.

Tabla 15. Muestreos de leche tanque e individuales para el ELISAI-L, resultados y cálculos de prevalencias aparentes.

Podríamos utilizar el modelo para conocer PA, de la siguiente manera:  $PA = \frac{DOLT}{329,92} - 12,97$ . De este modo mediante la estimación de PA, la Se y Sp del ELISAI-L podríamos calcular la prevalencia real de PTBC a través del resultado del ELISAI-LT, caracterizando al establecimiento como se muestra en la Figura 23. Siendo importante a la hora de diagramar la toma de decisiones sobre el control de la enfermedad.

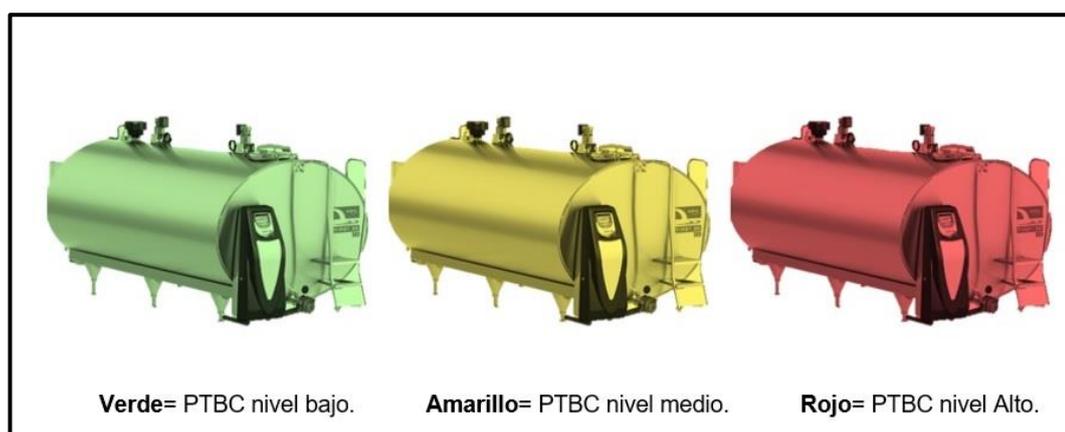


Figura 23. Esquema de caracterización de tambos en cuanto al nivel de anticuerpos contra *Map* en leche de tanque y la prevalencia aparente obtenida mediante el ELISAI-L de PTBC.

### 3.5. Implementación de *Nocardia spp.* como pre-adsorbente en el ELISAI-S de PTBC

La presencia de FP en el ELISAI-S y en el ELISAI-L que se evidenció en el apartado 3.2 es uno de los puntos a optimizar en ambos test. En base a nuestra experiencia el número de FP suele variar entre rodeos con distinta prevalencia siendo mayor en explotaciones tamberas que en establecimientos de cría, esta característica se puede asociar a una mayor exposición antigénica, a la aplicación de mayor cantidad de vacunas, al manejo hormonal entre otras características inherentes al tipo de producción. El uso de adsorbentes pre incubación como el *M. phlei* es uno de los pasos incorporados en el ELISAI-S de PTBC (Yokomizo y col., 1985; Alvarado Pinedo y col., 2019; Di Paolo y col., 2021) para evitar la reactividad cruzada, aumentar la Sp y disminuir resultados FP.

Las bacterias del género *Nocardia* pertenecen al mismo filo que las micobacterias y comparten similitudes en su pared celular como la presencia de ácidos micólicos de cadena larga por lo cual también son BAAR, aunque pueden ser total o parcialmente ácido alcohol resistentes. (Figura 24). Sus cadenas laterales son de 45 a 56 carbonos a diferencia de las micobacterias en las que son de 60 a 90 carbonos. En bovinos provocan procesos neumónicos, mastitis granulomatosas, y pododermatitis entre otras formas de presentación. La enfermedad de la ubre se presenta casi siempre de 1 a 2 días después del parto y también a lo largo de la lactancia. La nocardiosis bovina, también puede manifestarse por enfermedad pulmonar, sobre todo en terneros menores de 6 meses (Acha, 2001). Las similitudes antigénicas entre los dos géneros y los reportes bibliográficos de su reactividad serológica cruzada (Harboe y col., 1986; Ridell y col., 1983) nos hacen plantear la hipótesis de su potencialidad para ser utilizada como inmuno pre-adsorbente en el ELISAI-S para el diagnóstico de PTBC.

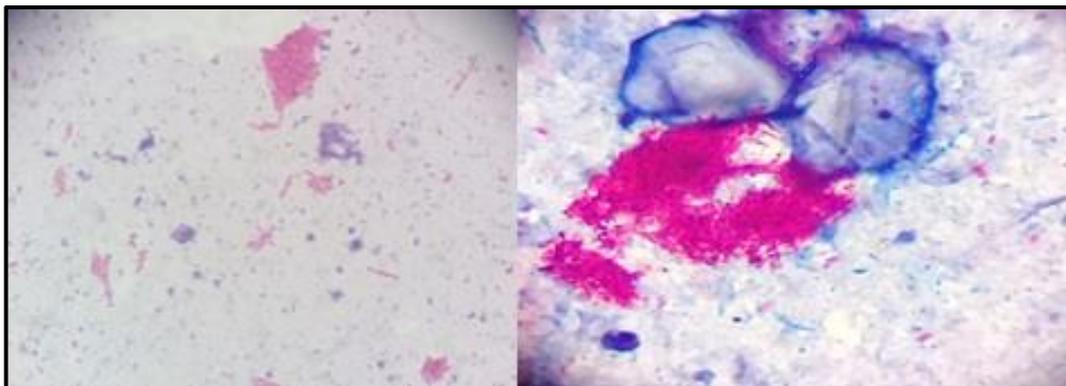


Figura 24. Coloración Ziehl Neelsen de *Nocardia* spp. parcialmente ácido alcohol resistente (izquierda) versus *Mycobacterium* spp. totalmente ácido alcohol resistente (derecha).

El objetivo de este apartado fue evaluar la utilización de una cepa de *Nocardia* spp. como un inmuno pre-adsorbente para optimizar la performance del ELISAI-S. Se cultivó para obtener biomasa a partir de un aislamiento en leche de *Nocardia* spp. y posteriormente se inactivó como se describe en el apartado 2.2, luego se lisó y se utilizó en una dilución en PBS-T 1:100 como pre-adsorbente de los sueros, incubando los mismos a 37°C durante 2 horas en una dilución 1:180. Se utilizaron 133 sueros pertenecientes a vacas de las cuales se cuenta con el resultado del aislamiento de *Map* a partir de heces al momento del muestreo, siendo 37 positivos y 96 negativos al cultivo. (Tabla 16). Posteriormente se efectuó el ELISAI-S con y sin adsorbente y se realizó el análisis estadístico.

Obtenidos los pos del ELISAI-S con y sin adsorbentes para los 133 sueros utilizado en este ensayo, se calculó un AUC de 0,58 para el ELISAI-S y un AUC de 0,71 para el ELISAI-S con pre adsorción con *Nocardia*. Mediante *DeLong's* test ambas curvas resultaron significativamente diferentes ( $p$ -value= 0,005). Se estimó un punto de corte de 83,5% como óptimo para el ELISAI-S y de 69,5% en el caso de ELISAI-S con pre adsorción con *Nocardia*. Las características operativas para dichos puntos de corte se resumen en la tabla 17.

		ELISAI-S		TOTAL
		Negativos	Positivos	
Aislamiento	Negativos	25 (VN)	71 (FP)	96
	Positivos	4 (FN)	33 (VP)	37
	TOTAL	29	104	133

VN= verdaderos negativos; FP= falsos positivos; FN= falsos negativos VP= verdaderos positivos

Tabla 16. Resumen del ELISAI-S y cultivos en materia fecal para la detección de *Map* de las 133 unidades experimentales utilizadas en este ensayo. Para un punto de corte del 69,5% de positividad se obtuvieron un total de 71 sueros FP al ELISAI-S para el diagnóstico de PTBC.

Tomando como punto de corte 83,5% la Se fue de 65% y la Sp de 72% en el ELISAI-S sin adsorbente y para el test con adsorbente la Se fue 21% y la Sp 96,8%, mejorando radicalmente la especificidad en detrimento de la Se.

Los FP disminuyeron de 27 a 3, lo cual equivale a un 88% pero con un detrimento de la Se de 65% a 21% es decir 63% menos y un aumento de la Sp de 72% a 96,8%.

	Punto de corte	Se	Sp	VP	VN	FN	FP	VPP	VPN
ELISAI-S	83,5	0,65	0,72	24	69	0,159 (13)	0,53 (27)	0,47	0,84
	69,5	0,89	0,26	33	25	0,138 (4)	0,68 (71)	0,31	0,86
ELISAI-S <i>Nocardia</i>	83,5	0,21	0,97	8	93	0,24 (29)	0,27 (3)	0,72	0,76
	69,5	0,56	0,84	21	81	0,165 (16)	0,42 (15)	0,58	0,83

Se= sensibilidad. Sp= especificidad. VP= verdaderos positivos. VN= verdaderos negativos. FN= falsos negativos. FP= falsos positivos. VPP= valor predictivo positivo. VPN= valor predictivo negativo.

Tabla 17. Resumen de las características operativas de ELISAI-S para el diagnóstico de PTBC con y sin adsorción con *Nocardia spp.* para los dos puntos de corte diferentes.

### 3.6 ELISAI-C de individuos con y sin aislamientos de *Map* en heces. Curva ROC

Para evaluar la utilidad del calostro como muestra para el diagnóstico de la PTBC mediante la prueba de ELISAI, se establecieron las diluciones de los distintos

reactivos utilizando el método del tablero de ajedrez siendo para el antígeno 1:480, para el conjugado 1:5000, para la muestra 1:639. Posteriormente se volvió a trabajar con 23 calostros practicándose 6 diluciones en base 3, que se detallaran a continuación: 1:71, 1:213, 1:639, 1:1917, 1:5751 y 1:17253. Obteniendo el mismo resultado. Conociendo cual era el resultado del aislamiento de *Map* en heces de cada uno de los individuos de los cuales se obtuvo el calostro se realizó un análisis ROC para cada una de las 6 diluciones. Como podemos apreciar en la tabla 18 al calcular la relación entre la DO mayor y la DO menor la dilución de trabajo resultante fue la previamente mencionada, pero al realizar el análisis ROC el AUC para dicha dilución resultó no ser la de mayor capacidad diagnóstica. Se calcularon los puntos de corte óptimos para cada dilución de calostro obteniendo una alta tasa de FP. Dichos resultados se resumen en la tabla 19.

En la dilución 3 (1:639) de un total de 23 calostros analizados 7 pertenecían a individuos positivos al aislamiento en materia fecal de *Map*, de estos solo 2 resultaron positivos el ELISAI-C, mientras que de los 16 individuos con cultivo negativo 11 resultaron positivos al ELISAI-C. Se estimó la concordancia entre los resultados del ELISAI-C y el aislamiento de *Map* en materia fecal, presentando un desacuerdo entre pruebas con un coeficiente Kappa de -0,20 con un IC del 95% (-0,54; 0,13).

Dilución de calostro.	AUC	IC del 95%	Muestras procesadas	Relación e/ DO mayor (+) y DO menor (-)
<b>1:71 (doc1)</b>	0,58	0,34-0,83	23	3,8
<b>1:213 (doc2)</b>	0,58	0,33-0,83	23	4,8
<b>1:639 (doc3)</b>	0,55	0,29-0,81	23	11,1
<b>1:1917 (doc4)</b>	0,52	0,25-0,79	23	9,4
<b>1:5751 (doc5)</b>	0,53	0,26-0,80	23	4,9
<b>1:17253 (doc6)</b>	0,69	0,44-0,95	23	3,2

AUC= área bajo la curva. IC= intervalo de confianza. DO= densidad óptica. doc1= densidad óptica en calostro (dilución 1).

Tabla 18. Se resumen en la misma los resultados de las AUC y la relación entre el calostro de mayor y el de menor DO para las distintas diluciones. Siendo clasificado el ELISAI-C en base a las AUC como test malo, con baja capacidad discriminadora para el diagnóstico de la PTBC.

Dilución de calostro.	Punto de corte	Se	Sp	FN	FP	VPP	VPN
doc1	1000	0,71	0,19	0,40	0,72	0,28	0,60
doc2	877,5	0,43	0,56	0,31	0,70	0,30	0,70
doc3	360	0,42	0,31	0,44	0,78	0,21	0,56
doc4	215,5	0,43	0,37	0,40	0,77	0,23	0,60
doc5	134	0,42	0,31	0,44	0,78	0,21	0,56
doc6	112,5	0,43	0,25	0,5	0,80	0,20	0,50

doc1= densidad óptica en calostro (dilución 1). Se= sensibilidad. Sp= especificidad. FN= falsos negativos. FP= falsos positivos. VPP= valor predictivo positivo. VPN= valor predictivo negativo.

Tabla 19. Se resumen las características operativas para cada una de las diluciones de calostro utilizadas y sus puntos de corte óptimos detectándose una alta tasa de FP.

Pudimos en base a esta experiencia interpretar que el calostro presenta mayor Se analítica que el suero en el ELISAI utilizado en esta tesis, es decir su dilución de trabajo es mayor que la del suero, pero no presenta mayor Se diagnóstica.

### 3.7. Evaluación de micobactinas obtenidas a partir de *Ms*, *M. phlei*, y *M. avium* subsp. *avium*.

El sideróforo llamado micobactina se utiliza en medios de cultivo para el desarrollo de *Map* en una concentración de 1mg/L para medios de cultivo líquidos y 2mg/L en medios sólidos, los costos de importación son muy altos, volviéndose su carencia un factor limitante para el desarrollo de trabajos de investigación y mejoramiento de la performance del aislamiento. Como alternativa ante esta situación se procedió a realizar extractos de *Ms*, *M phlei* y *M. avium* subsp. *avium*. Una vez obtenidos se realizó la prueba biológica de los mismos, se elaboró medio líquido M7H9 como se describe en el anexo II, pero sin micobactina. Se realizaron diluciones y combinaciones de las distintas micobactinas en el medio M7H9, se probaron en forma individual y sus combinaciones en diluciones en base 3, con diferentes concentraciones V/V de micobactina/medio de cultivo. Comenzando de 2 µL/mL para la prueba en forma individual, para la combinación de dos

micobactinas 4  $\mu\text{L}/\text{mL}$  totales y la de las tres 6  $\mu\text{L}/\text{mL}$  (2  $\mu\text{L}$  de cada una). (Tabla 20).

Se inocularon los medios con una muestra clínica de materia fecal proveniente de una vaca con EJ, semanalmente se coloreo con Ziehl Neelsen en busca de determinar la presencia de desarrollo y su tiempo en días para las distintas combinaciones. Para la interpretación de la misma se elaboró una escala cualitativa en base al grado de desarrollo que se puede observar en la Figura 25. Los resultados de esta experiencia se muestran en la tabla 21a; 21b y 21 c.

Diluciones	Diluciones y combinaciones de las micobactinas						
	S	P	A	SP	SA	PA	SPA
<b>Madre</b>		2 $\mu\text{L}/\text{mL}$			4 $\mu\text{L}/\text{mL}$		6 $\mu\text{L}/\text{mL}$
<b>1:3</b>		1 $\mu\text{L}/\text{mL}$			1,33 $\mu\text{L}/\text{mL}$		2 $\mu\text{L}/\text{mL}$
<b>1:9</b>		0,33 $\mu\text{L}/\text{mL}$			0,44 $\mu\text{L}/\text{mL}$		0,6 $\mu\text{L}/\text{mL}$
<b>1:27</b>		0,11 $\mu\text{L}/\text{mL}$			0,15 $\mu\text{L}/\text{mL}$		0,2 $\mu\text{L}/\text{mL}$
<b>1:81</b>		0,04 $\mu\text{L}/\text{mL}$			0,05 $\mu\text{L}/\text{mL}$		0,07 $\mu\text{L}/\text{mL}$
<b>1:243</b>		0,012 $\mu\text{L}/\text{mL}$			0,016 $\mu\text{L}/\text{mL}$		0,02 $\mu\text{L}/\text{mL}$
<b>S/micobactina</b>		S/m			S/m		S/m

**S**= micobactina de *M. smegmatis*. **P**= micobactina de *M. phlei*. **A**= micobactina de *M. avium*. S/m= sin micobactina.  $\mu\text{L}/\text{mL}$ = microlitros/mililitro de medio.

Tabla 20. Concentraciones V/V logradas en base a las diluciones de las micobactinas en medio de cultivo líquido M7H9 en sus distintas combinaciones.

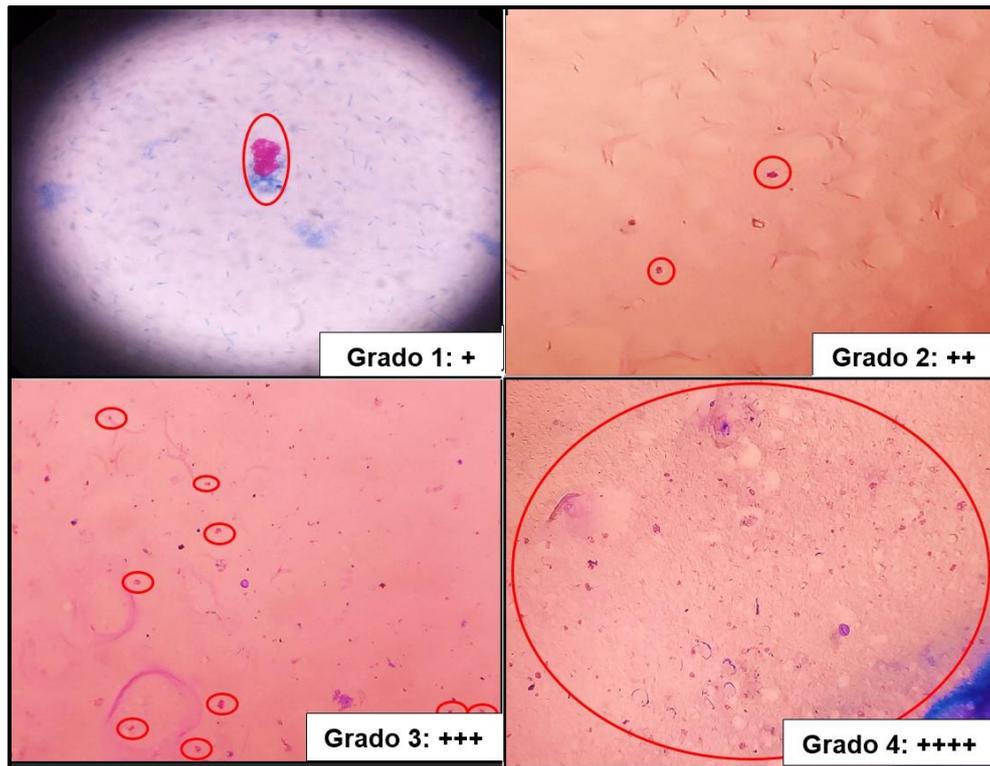


Figura 25. En las siguientes microfotografías 10X se evidencian los distintos grados de desarrollo de *Map* obtenidos durante esta experiencia representados en las tablas con los símbolos - (negativo) para los sin desarrollo y +, ++, +++, ++++ para aquellas micobactinas y combinaciones con desarrollo.

Diluciones	S	P	A	SP	SA	PA	SPA
Madre	+	+	-	-	-	-	+
1:3	+	+	-	-	-	-	-
1:9	+	-	-	+	-	+	-
1:27	+	-	+	+	+	+	-
1:81	-	-	-	++	-	+	-
1:243	-	-	-	-	-	-	-
S/micobactina	-	-	-	-	-	-	-

S= micobactina de *M. smegmatis*. P= micobactina de *M. phlei*. A= micobactina de *M. avium*. Desarrollo= - (ausente); +; ++; +++.

Tabla 21a. Resultado de los cultivos de *Map* en medio líquido M7H9 suplementado con distintas micobactinas en un periodo de 6 días de incubación a 37°C.

Diluciones	S	P	A	SP	SA	PA	SPA
Madre	+	+++	+++	+	-	++	++++
1:3	++++	++	++	++	-	+++	++
1:9	+	+	+++	+	+	++	+++
1:27	+	++++	+	++	+	++	+
1:81	++	++	-	+++	-	+++	+
1:243	-	-	-	-	-	-	-
S/micobactina	-	-	-	-	-	-	-

S= micobactina de *M. smegmatis*. P= micobactina de *M. phlei*. A= micobactina de *M. avium*. Desarrollo= - (ausente); +; ++; +++. S/= sin.

Tabla 21b. Resultado de los cultivos de *Map* en medio líquido M7H9 suplementado con distintas micobactinas en un periodo de 15 días de incubación a 37°C.

Diluciones	S	P	A	SP	SA	PA	SPA
Madre	+	++++	++++	+++	++	++	++++
1:3	++++	++	++	++	+	+++	++
1:9	++++	+++	++++	+	+	++	+++
1:27	+++	++++	+++	++	+	++	+
1:81	+++	++	-	+++	-	+++	+
1:243	-	-	-	-	-	-	-
S/micobactina	-	-	-	-	-	-	-

S= micobactina de *M. smegmatis*. P= micobactina de *M. phlei*. A= micobactina de *M. avium*. Desarrollo= - (ausente); +; ++; +++. S/= sin.

Tabla 21c. Resultado de los cultivos de *Map* en medio líquido M7H9 suplementado con distintas micobactinas en un periodo de 21 días de incubación a 37°C.

### 3.8 PCR IS900 en calostro y leche.

El objetivo de la siguiente experiencia fue determinar la Se analítica de la PCR punto final de IS900 junto con el desempeño del método de extracción de ADN a partir de muestras de leche y calostro bovino. La extracción de ADN se realizó como se describe en el apartado 2.13. Se trabajó en forma *in vitro* sobre un

calostro proveniente de una vaca sin evidencia clínica, serológica y bacteriológica de PTBC, efectuada la extracción de ADN y posterior PCR IS900 se confirmó que la muestra de calostro a partir de ahora llamada “blanco” era negativa para la secuencia de inserción mencionada. Con la finalidad de evaluar los objetivos antes establecidos se conformaron inóculos para realizar la contaminación del “blanco” como se describe a continuación.

Se utilizó en reemplazo de *Map* una cepa de *Ms*, la cual al ser de crecimiento rápido nos permite detectar colonias visibles en menos de 7 días, con menor riesgo de contaminación, mayor adaptabilidad a diferentes medios, menor patogenicidad, y como característica fundamental para esta experiencia la reactividad cruzada con la PCR IS900 al igual que otras micobacterias con segmentos de inserción similares (Vansnick y col., 2004).

A partir de una suspensión madre de micobacterias en PBS estéril cuya densidad óptica promedio obtenida luego de 10 mediciones a 620 nm fue de 172, con un CV= 1,4%. Se realizaron 15 diluciones de *Ms* en base 3. Posteriormente se inocularon 40 µL por duplicado en medio de Herrold, para cada una de las diluciones obtenidas. La temperatura de incubación fue de 37°C, durante 6 días. Las colonias fueron contables a partir de la dilución número 8 (1:6561). (Figura 26).

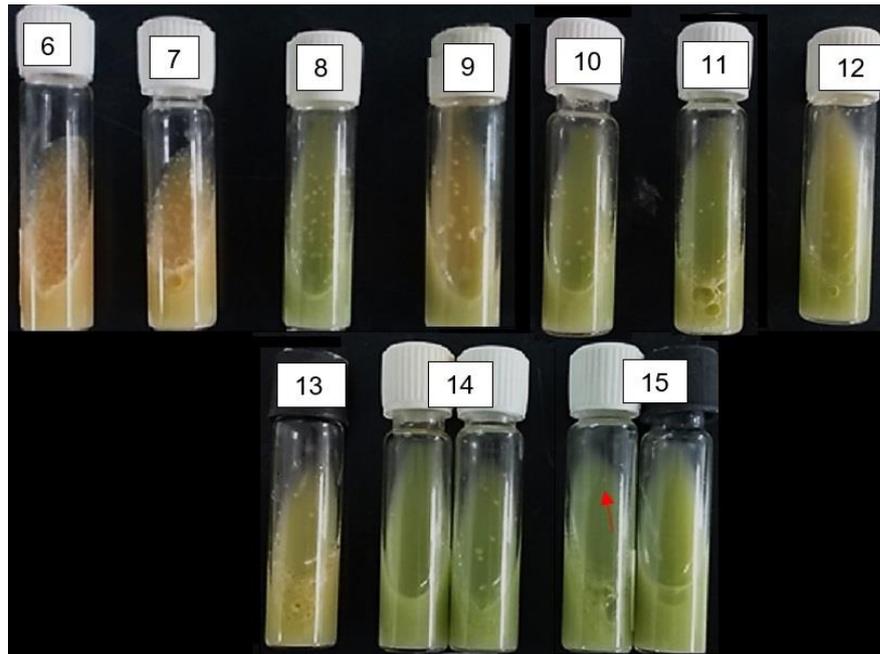


Figura 26. Cultivos en medio Herrold a partir de las diluciones de los inóculos generados con *Ms*. Las colonias se vuelven factibles de contar a partir de la dilución número 8.

Se contabilizaron las UFC en ambos inóculos para cada dilución, se obtuvo el promedio y se estimó la cantidad de UFC/mL como muestra en la tabla 22.

Dilución	Recuento UFC /40 $\mu$ L	UFC/mL del inóculo	UFC/10 $\mu$ L-UFC/100 $\mu$ L del inóculo
<b>1-7 no contable</b>	-	-	-
<b>8 (1: 6561)</b>	54 UFC	1350	13,5 \ 135
<b>9 (1:19683)</b>	26	650	6,5 \ 65
<b>10 (1:59049)</b>	19,5	487~500	5 \ 50
<b>11 (1:177147)</b>	11	275	2,75 \ 27,5
<b>12 (1:531441)</b>	8	200	2 \ 20
<b>13 (1:1594323)</b>	5	125	1,25 \ 12,5
<b>14 (1:4782969)</b>	3	75	0,75 \ 7,5
<b>15(1:14348907)</b>	0,5	12,5	0,125 \ 1,25

Tabla 22. Resultados de los conteos de UFC/mL para cada dilución.

Se efectuaron ocho contaminaciones en alícuotas de 2 mL totales: 1,980 mL de calostro se contaminaron con 20  $\mu$ L de los inóculos del 15 al 8, siendo la cantidad estimada de UFC/mL de las alícuotas conformadas la siguiente: 0,125; 0,75; 1,25; 2; 2,75; 5; 6,5; 13,5 UFC/mL. Y tres alícuotas de 1,8 mL de calostro con 200  $\mu$ L

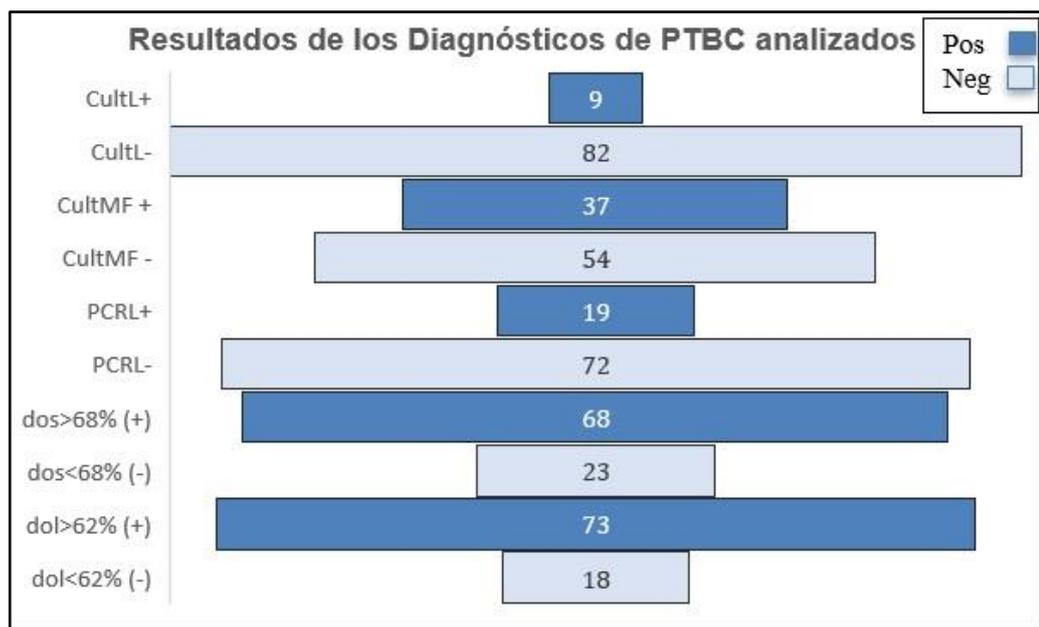
de las diluciones 12, 11 y 8. Siendo la cantidad estimada de 20, 27,5 (~28) y 135 UFC/mL para estas dos alícuotas respectivamente.

El límite de detección de este PCR punto final IS900 en calostro a diferentes recuentos de UFC/mL de *Ms.* mediante esta técnica de extracción y bajo las condiciones de ejecución de PCR descritas en el apartado 2.14; en este trabajo de tesis resultó estar aproximadamente entre el rango de 14 a 28 UFC/mL de calostro.

### **3.9. Aislamientos de *Map* en leche y su asociación con los diferentes métodos de diagnóstico de PTBC.**

El objetivo de este apartado fue contrastar y determinar si existe asociación entre el aislamiento de *Map* en muestras de leche y el aislamiento en materia fecal, también se incorporaron al análisis otras variables como los resultados del ELISAI-S, ELISAI-L y las PCR punto final IS900 realizadas sobre muestras individuales de leche.

Los ELISAs y el cultivo en materia fecal se procesaron en el mismo momento, las muestras de leche fueron fraccionadas en alícuotas y conservadas a -20°C para su posterior procesamiento mediante cultivo y PCR IS900 como se describe en los apartados 2.10, 2.13 y 2.14 respectivamente. Se incluyeron en este análisis 91 muestras, seleccionando aquellas con aislamiento fecal de *Map* y con antecedentes serológicos de los ELISAs previamente ejecutados. Los resultados a las diferentes pruebas realizadas sobre las 91 muestras de suero, leche y materia fecal incluidas en este análisis se resumen en la Figura 27.



**Pos**= positivos. **Neg**= negativos. **CultL+**= Cultivo en leche *Map* positivo. **CultL-** = Cultivo en leche negativo. **CultMF+**= Cultivo en materia fecal *Map* positivo. **CultMF-** = Cultivo en materia fecal negativo. **PCRL+**= PCR *IS900* en leche positivo. **PCRL-** = PCR en leche negativo. **Dos** y **dol** son los porcentajes de positividad obtenidos en el ELISAI-S y leche respectivamente por encima (+) y por debajo (-) de su punto de corte.

Figura 27. Resultados de los 91 cultivos realizados a partir de muestras de leche individuales y sus antecedentes a las pruebas diagnósticas de PTBC: aislamiento en materia fecal, PCR en leche, ELISAI-S y en leche.

Se obtuvieron 9 aislamientos de *Map* en leche, de los cuales solamente 2 se corresponden con individuos que presentaban signos clínicos de PTBC al momento del muestreo. Los aislamientos BAAR+ en leche se confirmaron mediante PCR *IS900*. A partir de uno de los cultivos en leche se aisló una bacteria del género *Nocardia* spp. dicho individuo había resultado positivo a la prueba de ELISAI-L y en suero, existiendo la posibilidad de reacción cruzada con dicho germen. El análisis estadístico se realizó con el software R Core Team versión 4.0.2 (2020) se aplicó el test de comparación de proporciones (`prop.test`), estimación de la concordancia entre pruebas a través del índice *Kappa* y  $\chi^2$  (`chisq.test`), aplicando corrección de Yates en los casos correspondientes.

Se obtuvieron 37 aislamientos de *Map* en materia fecal (CultMF+) y 9 en leche, siendo la proporción 0,4065 (37/91) y 0,098 (9/91) respectivamente. La proporción de CultMF+ fue significativamente mayor que la proporción de CultL+ (p-value= 4,12e-06). La proporción de CultL+ con CultMF+ fue de 0,1621 (6/37), para aislamientos *Map* positivos en leche y CultMF- la proporción fue menor (0,055 (3/54)) aun así no existieron diferencias significativas entre ambas proporciones (p-value = 0,1882). Expresado de otra manera la probabilidad condicional de que un individuo seleccionado al azar en la N estudiada dé como resultado CultL+ siendo CultMF+ es del 16,21%, y de un 5,5% para el caso de ser CultMF-.

La proporción de PCRL+ (PCR IS900 en leche) fue de 0,2088 (19/91) y también se comparó con las dos anteriores, difiriendo significativamente del CultMF+ (p-value = 0,013), no así del CultL+ (p-value = 0,064).

Se conformaron las distintas tablas de doble entrada en el software R, con la finalidad de calcular la concordancia entre pruebas y el estadístico de  $\chi^2$  para los resultados obtenidos a partir de las 91 unidades experimentales. En los casos donde la significancia estadística estableció una asociación entre variables se calcularon el riesgo relativo (RR) y el Odds Ratio (OR). Los resultados de la concordancia entre pruebas se resumen en la tabla 23.

Mediante  $\chi^2$  no se encontró asociación entre dar cultivo en materia fecal *Map* positivo y cultivo en leche *Map* positivo (p= 0,1882) reafirmando lo presentado anteriormente al realizar el análisis de proporciones. Se evidenció asociación estadísticamente significativa entre dar resultado PCRL+ y ser CultMF+ (p= 0,005) y CultL+ (p= 0,02). Los resultados se resumen en la tabla 24.

Los individuos con CultL+ presentan 3,25 veces mayor riesgo de ser PCRL+ que los individuos CultL- con un IC del 95% (1,53-6,91). El OR indica que los individuos con CultL+ tienen 6,07 veces más probabilidad de ser PCRL+ que los individuos CultL-.

Aislamiento de <i>Map</i> en leche individual		CultMF	PCR-L	ELISAI-S	ELISAI-L
	Kappa (95% IC)	0,121	0,394	0,04	0,02
	IC kappa se (0)	(-0,02-0,27)	(0,2-0,6)	(-0,03-0,12)	(-0,04-0,09)
	IC kappa se (1)	(-0,06-0,3)	(0,19-0,6)	(-0,15-0,23)	(-0,17-0,22)
	Grado de concordancia	Insignificante	Bajo	Insignificante	Insignificante
	Conformidad observada	62,6%	81%	33%	27%
Significancia	-	***	-	-	

Tabla 23. Resumen de concordancia entre aislamiento de *Map* en leche y las pruebas diagnósticas efectuadas sobre las 91 unidades experimentales.

	CultL+	Odds Ratio	CultMF+	Odds Ratio	PCRL+	Odds Ratio	dos>68%	Odds Ratio	dol>62%
CultL+			p= 0,1882		p= 0,02*		p= 0,5313		p= 0,804
CultMF+	s/asoc.	s/asoc.			p= 0,005*		p= 0,0007*		p= 0,0407*
PCRL+	RR= 3,25	OR= 6,07	RR= 3,16	OR= 4,33			p= 0,4396		p= 0,4153
dos>68%	s/asoc.	s/asoc.	RR= 1,55	OR= 11,14	s/asoc.	s/asoc.			p= 0,0027***
dol>62%	s/asoc.	s/asoc.	RR= 1,27	OR= 4,36	s/asoc.	s/asoc.	RR= 1,56	OR= 5,77	

**CultL+**= Cultivo en leche *Map* positivo. **CultMF+**= Cultivo en materia fecal *Map* positivo. **PCRL+**= PCR *IS900* en leche positivo. **Dos** y **dol** son los porcentajes de positividad obtenidos en el ELISAI-S y leche respectivamente por encima (+) y por debajo (-) de su punto de corte.

Tabla 24. Resumen de Chi<sup>2</sup>. Por encima de la diagonal roja podemos observar el p-value resaltado en verde y con \* en las pruebas entre las que se encontró asociación (p<0,05); por debajo de la diagonal roja podemos evidenciar los RR y OR obtenidos en los casos con significancia.

Los individuos CultMF+ presentaron 3,16 más riesgo de ser PCRL+ que los individuos CultMF- con un IC del 95% (1,37- 7,56). El OR indica que los individuos CultMF+ tienen 4,33 veces más probabilidad de ser PCRL+ que los individuos CultMF-. Los individuos CultMF+ presentan 1,55 más probabilidades con un IC del 95% (1,23- 1,94) de ser ELISAI-S positivo que los individuos CultMF-. Si realizamos el cálculo tomando como factor de exposición el resultado ELISAI-S

positivo (dos >68%) los individuos expuestos (dos>68%) presentan 5,91 más probabilidades de estar enfermos que los no expuestos (dos<68) con un IC del 95% (1,54 y 22,70). Por lo que se considera que dos>68% es un factor de riesgo. El OR indica que los individuos CultMF+ tienen 11,14 veces más probabilidad de ser dos>68% que los individuos CultMF-.

Con la N analizada no se encontró asociación entre CultMF+ y CultL+, según los cálculos de potencia se necesitaría una N de 329 muestras para tener una potencia de 0,8. Por lo cual la interpretación de los resultados obtenidos debe realizarse con cautela.

### 3.10 PCR y LAMP en materia fecal de individuos positivos al cultivo.

Se ejecutó la técnica de PCR y LAMP sobre materia fecal de individuos con aislamiento de *Map* positivo en heces, con la finalidad de demostrar su potencialidad como herramienta diagnóstica alternativa al cultivo en materia fecal. La extracción de ADN se realizó en base a lo descrito en el apartado 2.12.1 y los resultados obtenidos se detallan en la tabla 25.

En la Figura 28 podemos observar la lectura macroscópica de la técnica de LAMP.



Figura 28. Prueba de LAMP. Observar el control positivo en amarillo y en rosa el control negativo. Del 1 a las 10 son muestras. Las número 1 y 8 se consideran negativas. Las muestras 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 y 10 son positivas. Nótese que mediante este sistema de revelado que se basa en el cambio de pH se obtienen una serie de colores intermedios que hacen compleja la interpretación del resultado.

El LAMP presenta como ventajas respecto al PCR su interpretación macroscópica sin necesidad de la realización posterior de la corrida electroforética, según esta descrito en la bibliografía tolera más la presencia de inhibidores a su vez el protocolo de amplificación es a temperatura constante pudiendo ser realizado en baño maría o bloque térmico y de menor tiempo de ejecución. Si bien los resultados son alentadores presenta algunas complicaciones como la formación de dímeros entre los primers ocasionando el viraje en el sistema de revelado por lo tanto interpretaciones dificultosas con la presencia de FP.

<b>Animal</b>	<b>Aislamiento de <i>Map</i></b>	<b>PCR</b>	<b>LAMP</b>
4877	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
5007	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
5098	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
5045	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO
5183	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
5026	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
4985	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
4956	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
4591	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
4812	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
5033	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
5124	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
5170	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
134(A738)	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
139(A461)	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
167(A614)	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
10(O453)	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
164(A445)	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO

Tabla 25. Resultado de PCR y LAMP IS900 sobre materia fecal.

## CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN

La PTBC es una enfermedad de complejo diagnóstico y control, la extensa bibliografía y este trabajo de tesis mencionan las dificultades, sobre todo en la detección precoz, la identificación y segregación de los reactantes junto a las medidas de manejo, son las herramientas para disminuir su prevalencia (Gilardoni y col., 2012b; Paolicchi y col., 2003; Alvarado Pinedo, 2015; Chaubey y col., 2017; Gavey y col., 2021). No existe un método de diagnóstico único e ideal para esta enfermedad, en consecuencia, se hace necesaria su combinación para mejorar el nivel de discriminación. Los test y la producción de biológicos para el diagnóstico de la PTBC desarrollados y aplicados en esta tesis generan herramientas para el control y el monitoreo epidemiológico. Contribuyen al conocimiento del estado sanitario de la EJ en los establecimientos tamberos y al desarrollo para futuras investigaciones epidemiológicas sobre esta temática. Los anticuerpos contra *Map* en leche y suero pueden detectarse por diferentes métodos, el ELISAI es hasta el momento el de mayor Se diagnóstica (Harris y Barletta 2001). El antígeno protoplasmático comercial PPA (Allied Monitor®, INC; Fayette, USA) es extensamente utilizado en el ELISAI para el diagnóstico de PTBC (Nielsen y Toft, 2008; Ferreira y col., 2002b), en una revisión realizada por Nielsen y Toft (2008) el diagnóstico de PTBC mediante ELISAI utilizando el antígeno PPA presentó una Se entre el 40% y el 80% y una Sp entre el 90% y el 95% en la mayoría de los estudios evaluados. Al contrastar dicho antígeno con el WLA utilizado en esta tesis verificamos que sus performances diagnósticas no difieren significativamente, en concordancia por lo descrito por Constanzo y col. (2011). Si bien la utilización de antígenos totales elaborados a partir de bacterias asociadas a *Map* como *M. avium* subsp. *avium* puede inducir reactividad cruzada debido a la sensibilización previa de los bovinos (Leroy y col., 2009) arrojando FP, el uso de inmunoabsorbente y

urea permitiría su disminución (Di Paolo y col., 2021; Alvarado pinedo y col., 2019; Cox y col., 1991; Yokomizo y col., 1985). De este modo, la producción en el laboratorio de antígeno WLA nos facilita aplicar en forma masiva el ELISAI para PTBC, debido a su performance diagnóstica, bajo costo y simplicidad de producción.

El desarrollo de un ELISAI-L de PTBC permitió la detección de anticuerpos contra *Map* en forma individual, evidenciando similares características diagnósticas al compararlo mediante análisis ROC con el ELISAI-S definiendo a ambos como “test buenos”, siendo el AUC del ELISAI-L algo inferior que la del ELISAI-S. Para los puntos de corte calculados mediante índice de Youden la Se fue de 79,7% (69,4-89,8%) y 72,9% (61-83%) y la Sp de 88,4% (84,5-91,6%) y 89,7% (86,5-92,9%), para los ELISAI-S y en leche respectivamente, coincidiendo con lo determinado por Klausen y col. (2003). En dicho ensayo a diferencia de nuestro trabajo el autor utilizó como antígeno PPA (Allied Monitor, Fayette, Missouri). En dos revisiones, una realizada por Slana y col. (2008) y otra por Nielsen y Toft (2008), donde se recopilan múltiples trabajos que emplearon kits comerciales de ELISAI para PTBC en muestras individuales de leche bovina expresan sensibilidades entre el 21% y el 67% y especificidades entre el 83% al 99%. Las sensibilidades descritas en la bibliografía son menores con respecto a la de nuestro estudio, probablemente se deba a una mayor tasa de eliminación fecal de *Map* en los bovinos muestreados (Carpenter y col., 2004), en coincidencia con nuestro análisis Tiwari y col. (2006) informó una Se del ELISAI-L que oscilaba entre el 51% y 84% y la Sp entre el 92% y 96%. Haber muestreado en tambos que presentan la enfermedad en forma endémica podría llevarnos a tener un sesgo, subestimando el cálculo de la Sp, por lo cual es válido aclarar que los resultados “negativos” al ELISAI-L están respaldados por un VPN de 0,94 y que el cultivo utilizado para definir el “caso” en el análisis ROC tiene una Se baja en general lo cual podría resultar en un aumento

de FP en ambos ELISAs, sobre todo en cuadros subclínicos de PTBC donde no hay eliminación fecal de *Map* o la misma es intermitente. Norton y col. (2010) afirman que no existe una prueba de referencia que pueda determinar el verdadero estado de infección y considera imperfectas las estimaciones de Se y Sp tomando como base al aislamiento fecal de *Map*. En cuanto al uso de suero sanguíneo o leche para la detección de anticuerpos *Map* específicos parece haber diferencias limitadas entre ambos ELISAs (Lombard y col., 2006; Nielsen y col., 2002a; Sweeney y col., 1995), en coincidencia con este trabajo varios autores evidencian una correlación positiva entre los resultados obtenidos a partir muestras de suero y de leche (Eisenberg y col., 2015; Lombard y col., 2006; Hendrick y col., 2005) pero con algunas consideraciones a tener en cuenta para optimizar la interpretación de los resultados del ELISAI-L. El momento de muestreo es importante para realizar una correcta elección de la matriz diagnóstica (Nielsen y col., 2002; Nielsen & Toft, 2012). Dicha elección también va a depender de la logística, es decir, el muestreo en leche es menos invasivo respecto al suero, sobre todo si el establecimiento realiza controles lecheros mensuales, permitiéndonos acceder a la muestra en varios momentos del año. Como desventaja, las muestras de leche no pueden obtenerse de las vacas secas, ni en categorías jóvenes y tampoco de vacas en los primeros 3-5 días de lactancia, en las cuales la transición de calostro a leche aumenta la probabilidad de obtener resultados FP (Nielsen & Toft, 2012), por otro lado el pico de producción de leche podría llegar a diluir en algunos individuos la concentración de IgG la cual es relativamente constante durante la lactancia (Nielsen y Toft, 2012), momento en el cual sería más oportuno muestrear suero sanguíneo. Las diferencias observadas en nuestro trabajo con respecto al número de lactancia, probablemente se deban a que en vacas de primer parto el nivel de anticuerpos contra *Map* en leche es menor, el mismo aumenta conforme lo hace el número de

pariciones y la edad, por cuestiones fisiológicas e inherentes a la PTBC (Toft col., 2005), a su vez en esta categoría la calidad de calostro suele ser menor con respecto a la concentración de IgG, esto se traslada a menor nivel de las mismas posteriormente en la leche. (Eisenberg y col., 2015). Otra alternativa del ELISAI-L para PTBC sería el agrupamiento de muestras individuales de leche en pooles, con los propósitos de inferir la prevalencia predial (Krieger y col., 2021; Köhler y col., 2017), realizar el diagnóstico individual mediante el agrupamiento y posterior procesamiento en forma individual de los pooles positivos (Lavers y col., 2014; Græsbøll y col., 2017; Köhler y col., 2017). Mathevon y col. (2019) desestimaron el uso del ELISAI de PTBC en pooles de suero, por obtener una alta tasa de FP; la leche presenta menor probabilidad de obtener resultados FP, ya que la amplitud de DO entre ELISAs positivos y negativos es mayor. En base a lo que evidenciamos durante el trabajo de tesis la relación entre el C+ en suero y un resultado negativo es aproximadamente 3 a 3,5 veces, para el caso de la leche es de 7 a 8 veces, teóricamente esto se explicaría por su concentración de anticuerpos que es entre 50 a 100 veces menor que la del suero (Butler, 1983), teniendo mayor robustez a la hora de utilizar la estrategia en pooles. La prevalencia individual influye en la Se del ELISAip-L para *Map*, Lavers y col. (2014) evidenciaron al utilizar pooles de leche que la Se disminuye cuando también lo hace la prevalencia, por el contrario, y en coincidencia con nuestro estudio en general la Sp se mantuvo. Para el punto de corte de 70% la Se estimada utilizando ELISAip-L fue menor que en el ELISAI-L individual, en cuanto a los valores de Sp fueron similares para ambas alternativas. Se calculó el número de muestras por pool en base a la prevalencia ( $P_0$ ), el número de individuos y se seleccionó el tamaño de 4 muestras, el cual permitiría el mayor ahorro y la menor cantidad de determinaciones totales, en futuros trabajos se podrían incluir en el cálculo puntos de corte alternativos que maximicen la Se y Sp con el fin de ajustar en base a

estos parámetros el tamaño de pool, disminuyendo la probabilidad de resultados falsos negativos, tal como fue realizado por Mathevon y col. (2019) y Lavers y col. (2014).

Como se puede apreciar en la tabla 14, pudimos evidenciar que a medida que aumenta el número de muestras por pool, y la prevalencia ( $P_0$ ), disminuye el ahorro económico, la diferencia entre  $P_0$  y la PA se hace mayor, lo cual podría interpretarse como una disminución de la Se analítica al aumentar el número de muestras por pool, en concordancia con lo descrito por Græsbøll y col. (2017). Para implementar el uso de pooles se debería tener en cuenta la prevalencia crítica a partir de la cual deja de ser un método ventajoso como describe Williams, (2010), ya que si en lugar de una prevalencia de 7,8% tuviéramos una entre el 20-30% al no generarse ningún tipo de ahorro y perder capacidad diagnóstica la alternativa individual volvería a ser la elección. Según lo evidenciado por Krieger y col. (2021) el uso de la serología en pooles de leche para PTBC parece ser una herramienta adecuada para el propósito de reducción de la prevalencia, ya que el análisis de muestras de pool es un método de detección económico y conveniente.

Los resultados de nuestro trabajo de tesis son alentadores para esta alternativa del ELISAI-L. Evaluar el desempeño del ELISAip-L para PTBC en la determinación del estatus epidemiológico del rodeo, implicaría trabajar con un mayor número de establecimientos, tanto los antecedentes previos del cálculo de la prevalencia en el establecimiento lechero bajo estudio y los realizados mediante pooles no difirieron significativamente, siendo este hallazgo alentador para futuros trabajos. Como ventaja el ELISAip-L para PTBC nos permitió una reducción significativa de la cantidad de determinaciones individuales y costos de procesamiento, mostrando un desempeño aceptable como herramienta diagnóstica. Teniendo en cuenta que el ELISAI tiene un costo aproximado de 2,45 USD, (Cotización

obtenida a partir del valor del dólar estadounidense, en el Banco Central de la República Argentina (BCRA) y siendo el precio del ELISA equivalente a \$224 argentinos a la fecha: 25/02/2021) procesar el 52,69% de las muestras, nos permitiría ahorrar 47,3% del costo (equivalente a 193,57 USD). (Tabla 14).

La muestra de leche de tanque se ha procesado mediante ELISAI-L con la finalidad de realizar vigilancia epidemiológica y para estimar prevalencia predial (Nielsen y col., 2000; Delafosse y col., 2019; Pesqueira y col., 2017; Wilson y col., 2010; Bauman y col., 2019), calculando la correlación entre la seroprevalencia individual de PTBC con el nivel de anticuerpos contra *Map* obtenido en leche de tanque, en distintos establecimientos, obteniendo resultados diversos, con limitaciones por baja Sp (Pesqueira y col., 2017), no obstante otros autores evidenciaron un alto VPP para el ELISAI-LT con la finalidad de clasificar al establecimiento como verdaderamente positivo a PTBC (Bauman y col., 2019) y una asociación significativa entre el resultado del ELISAI-LT y la prevalencia individual a PTBC (Nielsen y Toft, 2014). El análisis realizado evidencia una correlación positiva y estadísticamente significativa ( $p\text{-value} = 0,001$ ) entre la DOLT y la PA, siendo el coeficiente de correlación fue de 0,898 con un IC del 95% (0,623-1); lo cual concuerda con la bibliografía y refuerza la potencialidad de que la detección de anticuerpos contra *Map* mediante ELISAI-LT permitiría la realización de vigilancia epidemiológica no invasiva y caracterización de los establecimientos tamberos con respecto a la PTBC, sería prudente aumentar el número de establecimientos muestreados, con la finalidad de comprobar y fortalecer dicha hipótesis en futuros trabajos. Por otro lado, las DOLT obtenidas son algo estrechas entre los establecimientos con distintas prevalencias evaluados en este trabajo, de forma similar a lo descrito por Nielsen y Toft, (2014), dificultando la determinación de un punto de corte para el ELISAI-LT, o

asociar firmemente el resultado obtenido a una prevalencia individual con un error bien establecido.

En bovinos los patrones de IgG en suero sanguíneo y leche varían al comienzo de la lactancia debido a la calostrogénesis, produciéndose una disminución de la concentración de la misma en suero y un aumento en el calostro que se está sintetizando (Lombard y col., 2006; Guidry y Miller, 1986; Williams y Millar, 1979), siendo la concentración de IgG en calostro entre 5 a 10 veces mayor que en el suero sanguíneo y aproximadamente 100 veces superior que en la leche (Zervens y col., 2013; Beer y col., 1974; Sasaki y col., 1976). Ante esta particularidad previamente mencionada nos planteamos que la identificación de anticuerpos contra *Map* en el calostro nos permitiría diagnosticar la PTBC con mayor Se analítica que el suero al tener mayor probabilidad de detectar la presencia de IgG *Map* específica. Hecho importante, sobre todo, en la fase subclínica de la PTBC donde el ELISAI-S tiene menor Se. (Jenvey y col., 2016).

En base a nuestros resultados pudimos confirmar que en ELISAI-C de PTBC presenta mayor Se analítica que el suero en el ELISAI utilizado en esta tesis, al ser su dilución de trabajo mayor que la de este último. Por otro lado, el calostro con respecto a la leche no solo difiere en concentración de anticuerpos también presenta un mayor número de células somáticas, característica que podría influir en los resultados debido a una mayor actividad de oxidativa y formación de peróxidos. En un trabajo realizado por Zervens y col. (2013) se analizaron los resultados obtenidos a partir del ELISAI-C para PTBC en base a los días en lactancia del día 0 al 4, revelando que la probabilidad de dar resultado positivo el día 0 era 130 veces mayor que al día 4, en dicho estudio consideran solamente 3 reacciones inespecíficas y no emplearon ningún gold estándar para los cálculos de Se y Sp, simplemente caracterizaron los FP, planteando que el calostro

presenta potencialidad como matriz diagnóstica. A su vez la prevalencia de la prueba en calostro fue del 97% en la fecha del parto, mientras que sólo el 11% de las vacas resultaron positivas antes del parto, razón por la cual y en coincidencia con nuestro análisis el número de FP sería realmente elevado. En un estudio realizado por Jenvey y col. (2016) se realizaron distintas diluciones de los sueros y calostros para efectuar el ELISAI de PTBC, como prueba de oro aplicaron el cultivo y PCR en heces con la finalidad de realizar un análisis ROC, concluyendo que, con diluciones de muestra más bajas, los valores de Se relativa del suero fueron del 0% (1:2, AUC 0,62; 1:5, AUC 0,55) y la del calostro fue del 75% (1:5, AUC de 0,73). Por lo tanto, para su análisis, en disidencia con el hasta ahora realizado por nosotros, el uso de calostro en el ELISAI en comparación con las muestras de suero podría proporcionar una mejor identificación de los animales en las primeras etapas de la infección con *Map*. Bajo nuestras condiciones de trabajo para la dilución 3 (1:639) el AUC calculada para el ELISAI-C fue de 0,55, demostrándose su bajo poder discriminatorio. La evaluación del calostro como matriz diagnóstica para la PTBC en forma temprana podría ser aplicada en futuros estudios longitudinales, evaluándolo sobre vaquillonas de 1° lactancia con un posterior seguimiento de las mismas, con el fin de comprobar si existe asociación con el desarrollo de la EJ o la posterior eliminación fecal la cual es menos probable de detectar en estas categorías.

Los individuos que presentan la enfermedad clínica diseminan *Map* en altas cargas a través de materia fecal ( $100-10^{12}$  UFC/gr de MF) y en leche (2-200 UFC/ml de leche) (Giese y Ahrens, 2000; Rademaker y col., 2007), *Map* también fue detectado por PCR en leche de vacas clínicamente sanas (Sweeney y col., 1994). Por lo cual, el calostro de las madres infecciosas y clínicas representa un alto riesgo de exposición para los terneros (Nielsen y col., 2008). Un estudio de cohorte realizado por Pithua y col. (2011) en la cual se ejecutó PCR anidado para

ISMAP02 en calostro no encontró diferencias entre el riesgo de infección con *Map* entre los terneros expuestos y no expuestos al consumo de calostro ISMAP02 positivo, en discrepancia con lo descrito por Nielsen y col. (2008). Este tipo de análisis de riesgo debería contemplar la prevalencia de PTBC en el rodeo y el tipo de calostrado, ya que estas dos variables podrían tener fuerte influencia sobre los resultados, sobre todo en establecimientos con PTBC endémica, por lo tanto, la detección de material genético y formas viables de *Map* en leche y calostro podrían mejorar las medidas de bioseguridad tendientes a disminuir el riesgo de infección en los terneros. La concentración de micobacterias detectadas mediante el método de extracción y PCR utilizado en esta tesis para leche cruda y calostro contaminado experimentalmente fue de aproximadamente 14-28 UFC/mL similar a lo descrito por Pillai y col. (2002) el cual mediante PCR IS900 detectó entre  $10^1$ - $10^2$  UFC/mL y Slana y col. (2008) en su revisión. Dicha Se podría mejorar utilizando kits de extracción comerciales o métodos como la separación inmuno-magnética utilizada en nuestro país por Gilardoni y col. (2016), que presentan mayor Se, detectando hasta  $10^1$  UFC/50mL de leche como se puede evidenciar en la tabla 26, extraída de Slana y col. (2008), lo cual estaría por debajo de la dosis infectante ( $10^3$  UFC) para un ternero que consume aproximadamente 4 L diarios. Si bien la detección de ADN es un método sensible y de mayor practicidad que el cultivo, presenta como desventaja frente a este no evidenciar la viabilidad de *Map* lo cual representa un riesgo real de exposición.

Table 10. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* detection in cows' and goat milk by the PCR method after immunomagnetic separation

Examined milk		Examined samples			Methods		Detection limit	Reference
Animal	Type	No.	positive	%	isolation	detection		
Cow	raw <sup>1</sup>	244	19	7.8	nk	IS900 PCR	10 <sup>1</sup> CFU/50 ml	Grant et al. (2002b)
		389	50	12.9	nk	IS900 PCR	10 <sup>0</sup> CFU/50 ml	O'Reilly et al. (2004)
		423	23	5.5	home made	PMC, MS (IS <i>Mav</i> 2)	5 × 10 <sup>2</sup> CFU/ml	Stratmann et al. (2006)
	raw <sup>2</sup>	60	11	6.7	Dynabeads	IS900 PCR	nk	Grant et al. (2002a)
		243	25	10.3	home made	Q IS900 PCR	5–10 <sup>1</sup> CFU/ml	Metzger-Boddien et al. (2006)
		567	67	11.8	nk	IS900 PCR	10 <sup>1</sup> CFU/50 ml	Grant et al. (2002b)
	pasteurised <sup>1</sup>	357	35	9.8	nk	IS900 PCR	10 <sup>0</sup> CFU/50 ml	O'Reilly et al. (2004)
		144	29	20.8	Dynabeads <sup>3</sup>	IS900 PCR	nk	Grant et al. (2002a)
	Goat	raw <sup>2</sup>	340	5	1.5	Dynabeads <sup>3</sup>	IS900 PCR	10 <sup>0</sup> CFU/ml
340			24	7.1	Dynabeads <sup>3</sup>	IS900 PCR	10 <sup>-1</sup> CFU/ml <sup>4</sup>	

CFU = colony forming unit; PMC = peptide mediated capture; MS = magnetic separation; IS = insertion sequence; nk = not known; Q = quantitative Real-Time PCR

<sup>1</sup>bulk milk

<sup>2</sup>individual milk samples

<sup>3</sup>Dynal UK Ltd., Wirral, Merseyside, United Kingdom

<sup>4</sup>after the dot blot hybridisation

Tabla 26. Detección de *Map* en leche de vaca y cabra mediante PCR con separación inmuno magnética. Extraída de Slana y col. (2008).

La muestra de leche puede contener *Map* de dos orígenes, uno es la diseminación de dicha bacteria en leche a través de la ubre y el segundo es la contaminación fecal. Aunque la obtención de leche se realice bajo medidas de asepsia es fácilmente contaminable. De igual modo las dos fuentes mencionadas tienen importancia en el contagio de la PTBC a las categorías lactantes susceptibles. La identificación de *Map* por aislamiento en leche cruda tiene baja Se (16%-37%), debido a la baja carga de micobacterias eliminada en dicha matriz (Sweeney y col., 1992; Dundee y col., 2001; Jayarao y col., 2004; Gao y col., 2005), a su vez el protocolo de descontaminación, puede conducir a su reducción, manifestándose posteriormente con la ausencia de desarrollo, y, por lo tanto, la presentación de FN, que podrían ser detectados por PCR. En este trabajo de tesis de 91 muestras de leche individual, procesadas se obtuvieron 9 (9,9%) aislamientos *Map* positivos y 19 (21%) PCR IS900 positivos, resultandos positivos a las dos técnicas solo 5; evidenciando menor Se relativa para el aislamiento en leche. De 211 animales examinados por Pillai y col., 2002 9 (4%) y 69 (33%) resultaron positivos a *Map*

por cultivo y PCR IS900 en leche respectivamente, coincidiendo en una mayor proporción de positivos detectada por el segundo método. Se obtuvieron 37 aislamientos de *Map* en materia fecal (CultMF+) y 9 en leche, siendo la proporción 0,4065 (37/91) y 0,098 (9/91) respectivamente. La proporción de CultMF+ fue significativamente mayor que la proporción de CultL+ (p-value = 4,12e-06). Por lo que claramente el cultivo en leche individual no sería útil para confirmar la PTBC. La proporción de CultL+ con CultMF+ fue de 0,1621 (6/37), para aislamientos *Map* positivos en leche y CultMF- la proporción fue menor (0,055 (3/54)) aun así no existieron diferencias significativas entre ambas (p-value = 0,1882). Las tasas de aislamiento de *Map* en leche cruda varían mucho, en un estudio de Pensilvania (Sweeney y col., 1992), se detectó *Map* en 9/77 (11,6%) leches de vacas subclínicas. En otro trabajo del mismo grupo (Sweeney y col., 1994) se reportaron 7 aislamientos *Map* positivos sobre un total de 16 (44%) vacas clínicamente normales. En esta tesis también se obtuvieron aislamientos de *Map* en leche, a partir de 3 individuos sin aislamiento fecal, sin signos clínicos y con serología positiva, fortaleciendo la hipótesis de que la eliminación en leche también podría darse en estadios tempranos la enfermedad, siendo las vacas en este estadio un claro factor de exposición para los terneros susceptibles, favoreciendo el contagio de la PTBC. En concordancia con Jayarao y col. (2004) se observó una asociación significativa entre dar resultado positivo en la prueba de PCRL+ y el CultMF+. La PCR en leche es un método rápido de detección, pero también tiene una baja Se por la presencia de sustancias inhibidoras de la reacción (Grant y col., 2000; Khare y col., 2004). Motivo por el cual, el método de extracción juega un papel crucial en la performance diagnóstica. En concordancia a lo descrito por Gilardoni, (2012a), se evidenció asociación estadísticamente significativa entre dar resultado PCRL+ y ser CultMF+ (p= 0,005) y CultL+ (p= 0,02). En discrepancia con lo descrito con Gilardoni y col. (2016) donde la concordancia entre PCRL y el Aislamiento de *Map*

en leche presenta un coeficiente kappa de 0,02 en nuestro estudio fue de 0,39 y si bien el grado de concordancia resultó bajo, fue el único estadísticamente significativo.

En los primeros párrafos de esta discusión mencionamos la falta de pruebas de diagnóstico rápidas, sencillas y precisas para el diagnóstico de PTBC limita su control, el desarrollo de la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) ha sido realizado por diversos autores como Enosawa y col. (2003); Trangoni y col. (2015) y Sange y col. (2019) y Singh col. (2020), promoviendo dichas cualidades ventajosas con respecto al aislamiento en materia fecal. La LAMP presenta sus diferencias con respecto del PCR, prescindiendo del uso de termociclador, electroforesis en gel y un sistema de documentación del mismo (Sange y col., 2019). Las heces contienen compuestos muy variables que dependen de la nutrición, la flora intestinal y el entorno del animal, los inhibidores pueden incluir polisacáridos, clorofila, sales biliares, urea, glicolípidos, hemoglobina y heparina (Pontiroli y col., 2011). También es muy probable que las heces de animales con PTBC clínica que son típicamente excretores de alto nivel, pueden contener grupo hemo y células epiteliales, sobre todo en la fase final de la enfermedad. Se ha comprobado que estos componentes inhiben la PCR (Inglis y Kalischuk 2003). Aunque en general se informa de que el LAMP es menos sensible a esos inhibidores (D'Agostino y col., 2015), independientemente de esto el uso de kits de extracción es algo de lo que no podríamos prescindir al tratarse de heces. En esta tesis se llevó a cabo el protocolo descrito por Enosawa y col. (2003), los resultados obtenidos indican una concordancia con los autores previamente mencionados e impulsan a darle continuidad al estudio sobre dicha técnica y su aplicación en la detección de *Map* para el reemplazo del cultivo. Cabe destacar que las extracciones de ADN fueron realizadas con kit comercial y que no se probó el LAMP con la extracción mediante solventes. El Sistema de revelado

seleccionado sin dudas es importante pudiendo influir en la sensibilidad de la técnica (Trangoni y col., 2015) ya que el cambio del pH por ejemplo se podría dar sin ser amplificación específico dando lugar a FP y dificultades en la interpretación de los resultados.

## CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES.

- 1) La utilización del antígeno WLA en el ELISAI-S para el diagnóstico de PTBC tiene igual performance diagnóstica que el antígeno comercial PPA (Allied Monitor, INC; Fayette, USA).
- 2) La detección de anticuerpos contra *Map* mediante el test de ELISAI-L en forma individual tiene una aceptable performance diagnóstica para la PTBC en vacas de tambo en la región.
- 3) El ELISAI-L mostró similares características operativas que el ELISAI-S para PTBC, sin ser un test de reemplazo, aunque si complementario y con algunas ventajas en la obtención de la muestra de leche durante ordeño, sin necesidad de un encierre extra.
- 4) El uso e interpretación del ELISAI-L para PTBC debería tener en cuenta las variaciones durante la lactancia. Siendo los momentos óptimos de muestreo entre el día 7 al 21 para evitar colectar leche con anticuerpos calostrales y el otro momento podría ser posterior al pico de producción en el cual se puede producir un fenómeno de dilución.
- 5) Las variantes del ELISAI-L, ELISAip-L y ELISAI-LT arrojaron resultados alentadores en el monitoreo del estatus epidemiológico de la enfermedad. Permitiendo la implementación de pooles disminuir los costos del ensayo con resultados similares al ensayo individual; para el caso del ELISAI-LT los resultados preliminares obtenidos demostraron que es posible caracterizar epidemiológicamente el establecimiento, siendo una herramienta potencial a la hora de la toma de decisiones.
- 6) El ELISAI-C demostró una mala performance diagnóstica para PTBC, por su baja capacidad discriminatoria y alta tasa de FP.
- 7) La producción local e implementación de distintas micobactinas en el medio de cultivo M7H9 nos permitió avanzar en el desarrollo de la tesis, cultivo y aislamiento de *Map*.

- 8) El uso de PCR IS900 en calostro y leche permitiría realizar en forma rápida la identificación de calostros contaminados o con presencia de *Map*, siendo útil en la formación de bancos de calostro, leche para la alimentación artificial de terneros, y relevante en salud pública en el monitoreo de leche fluida comercial para consumo humano.
- 9) El cultivo en leche individual no sería útil para confirmar la PTBC, con el número de muestras analizadas no se encontró asociación entre CultMF+ y CultL+, pero si con este último y el PCRL+.
- 10) El aislamiento *Map* en leche de 3 individuos sin aislamiento fecal, sin signos clínicos y con serología positiva, fortalece la hipótesis de que la eliminación en leche podría darse en estadios tempranos la enfermedad.
- 11) La aplicación de PCR y LAMP IS900 resultó ser una alternativa al cultivo de *Map* en materia fecal en las muestras analizadas. Siendo evidente la necesidad de utilización de kits comerciales para la extracción de ADN, debido a la presencia de inhibidores.

## BIBLIOGRAFÍA.

1. Adams JL & Czuprynski CJ. Ex vivo induction of TNF- $\alpha$  and IL-6 mRNA in bovine whole blood by *Mycobacterium paratuberculosis* and mycobacterial cell wall components. *Microb. Pathogen.* 1995. 19, 19-29.
2. Adams JL, Czuprynski CJ. Mycobacterial cell wall components induce the production of TNF- $\alpha$ , IL-1, and IL -6 by bovine monocytes and the murine macrophage cell line RAW 264.7. *Microb. Pathogen.* 1994. 16, 401-411.
3. Antognoli MC, Garry FB, Hirst HL, Lombard JE, Dennis MM, Gould DH, & Salman MD. Characterization of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* disseminated infection in dairy cattle and its association with antemortem test results. *Veterinary microbiology.* 2008. 127(3-4), 300–308. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.08.017>
4. Alvarado Pinedo M F, Di Paolo LA, Sosa PS, Romero MA, Peralta LM, Costa EF, Travería GE. 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.* 2019. 39(1), 2-9. <https://doi.org/10.24215/15142590e032>
5. Alvarado Pinedo MF. Posibilidades diagnósticas de la PPD Aviar en la Paratuberculosis Bovina en animales jóvenes. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. 2015. [Documento completo .pdf \(unlp.edu.ar\)](#)
6. Alzuhherri HM, Woodall CJ & Clarke CJ. Increased intestinal TNF- $\alpha$ , IL-1 beta and IL-6 expression in ovine paratuberculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1996. 49, 331-345.
7. Ayele WY, Macháčková M, Pavlík I. The transmission and impact of paratuberculosis infection in domestic and wild ruminants. *Vet Med Czech.* 2001; 46: 205-222.
8. Bannantine JP, Zhang Q, Li L, Kapur V. Genomic homogeneity between *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* belies their divergent growth rates. *BMC Microbiol.* 2003; 3:10. <https://doi:10.1186/1471-2180-3-10>
9. Barkema HW, Orsel K, Nielsen SS, Koets A, Rutten VPMG, Bannantine JP, y col. Knowledge gaps that hamper prevention and control of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection. *Transbound Emerg Dis.* 2018. 65:125–148. doi: 10.1111/tbed.12723.
10. Barkema HW, Hesselink JW, McKenna SLB, Benedictus G y Groenendaal H. Global prevalence and economics of infection with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in ruminants. En *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control.* M. Behr y D. M. Collins (editores). University

of Calgary, Alberta, Canada. 2010. P. 10-21, ed. CAB International, Cambridge, MA. ISBN 9781845936136

11. Bates A, O'Brien R, Liggett S, & Griffin F. The effect of sub-clinical infection with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* on milk production in a New Zealand dairy herd. BMC Veterinary Research. 2018. 14(1). <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1421-4>
12. Bauerfeind R, y col. Molecular characterization of *Mycobacterium paratuberculosis* isolates from sheep, goats, and cattle by hybridization with a DNA probe to insertion element IS900. Journal of clinical microbiology. 1996. 34(7), pp.1617-21
13. Bauman CA, Jones-Bitton A, Jansen J, Kelton D, & Menzies P. Evaluation of bulk tank milk PCR and bulk tank milk modified ELISA tests for the detection of paratuberculosis at the herd level in goat and sheep dairies in Ontario, Canada. Journal of dairy science. 2019. 102(1), 511–520. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15020>
14. Beard PM, Henderson D, Daniels MJ, Pirie A, Buxton D, Greig A, Hutchings MR, McKendrick I, Rhind S, Stevenson K & Sharp JM. Evidence of paratuberculosis in fox (*Vulpes vulpes*) and stoat (*Mustela erminea*). Vet. Rec. 1999. 145, 612–613.
15. Begg DJ, de Silva K, Carter N, Plain KM, Purdie A, Whittington RJ. Does a Th1 over Th2 dominancy really exist in the early stages of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections? Immunobiology. 2011. 216:840–6. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2010.12.004>.
16. Beer, A. E., Billingham, R. E., & Head, J. Proceedings: The immunologic significance of the mammary gland. *The Journal of investigative dermatology*, 1974. 63(1), 65–74. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12678092>.
17. Belo-Reis AS, Salvarani FM, Brito MF, Fonseca AA, Silva NS. Intrauterine Infection by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in buffalo (*Bubalus bubalis*). J Vet Sci Med Diagn. 2016. 5:1.
18. Bernardelli A. Manual de Procedimiento Técnico Diagnóstico de Paratuberculosis. SENASA 2000; 1-47. [Online] <http://www.aavld.org.ar/paratub.pdf>
19. Bermudez LE, Petrofsky M, Sommer S, & Barletta RG. 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. 2010. 78(8), 3570–3577. <https://doi.org/10.1128/IAI.01411-09>
20. Beutler B & Cerami A. - The biology of cachectin/TNF-a primary mediator of the host response. Annu. Rev. Immunol. 1980. 7, 625-655.

21. Bradner L, Robbe-Austerman S, Beitz D, and Stabel JR. Optimization of hexadecylpyridium chloride decontamination for culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from milk. *J. Clin. Microbiol.* 2013. 51(5):1575-1577.
22. Brown WC, Rice-Ficht AC & Estes DM. Bovine Type I and Type II responses. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1998. 63, 45-55.
23. Butler JE. Bovine immunoglobulins: An augmented review. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1983. 4(1-2), 43–152. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(83\)90056-9](https://doi.org/10.1016/0165-2427(83)90056-9)
24. Carpenter TE, Gardner IA, Collins MT, and Whitlock RH. Effects of prevalence and testing by enzyme-linked immunosorbent assay and fecal culture on the risk of introduction of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*–infected cows into dairy herds. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2004. 16, 31-38. <https://doi.org/10.1177/104063870401600106>
25. Chaubey KK, Singh SV, Gupta S, Singh M, Sohal JS, Kumar N, Singh MK, Bhatia AK, Dhama K. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* - an important food borne pathogen of high public health significance with special reference to India: an update. *Vet Q.* 2017. Dec;37(1):282-299. doi: 10.1080/01652176.2017.1397301. PMID: 29090657
26. Cicuta ME. Validez de la prueba tuberculínica en el diagnóstico de paratuberculosis bovina en el NEA. *Rev Med Vet.* 1999; 80: 72-74.
27. Chiodini RJ, Chamberlin WM, Sarosiek J, & McCallum RW. Crohn's disease and the mycobacterioses: a quarter century later. Causation or simple association? *Critical reviews in microbiology.* 2012. 38(1), 52–93. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2011.638273>
28. Chiodini RJ, Van Kruiningen HJ, Merkal RS, Walter R, Thayer JR, and Coutu JA. Characteristics of an Unclassified *Mycobacterium* Species Isolated from Patients with Crohn's Disease. *Journal of Clinical Microbiology.* 1984. 20(5), 966–971.
29. Clarke CJ. The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *Journal of Comparative Pathology.* 1987 116(3), 217-261. [doi: 10.1016/s00219975\(97\)800011](https://doi.org/10.1016/s00219975(97)800011)
30. Clarke CJ & Little CL. The pathology of ovine paratuberculosis: gross and histological changes in the intestine. *J. comp. Pathol.* 1996. 114, 419-437.
31. Cohen J. A Coefficient of Agreement for Nominal Scales. *Educational and Psychological Measurement.* 1960. 20, 37-46. <https://dx.doi.org/10.1177/001316446002000104>
32. Collins MT. Diagnosis of Paratuberculosis. *Vet. Clin. Food. Anim.* 2011. 27:581-591.

33. Collins MT, Wells SJ, Petrini KR, Collins JE, Schultz RD, y Whitlock RH. Evaluation of five antibody detection tests for diagnosis of bovine paratuberculosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2005. 12:685-692.
34. Collins DM, Stephens DM, De Lisle GW. Comparison of polymerase chain reaction tests and faecal culture for detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine faeces. *Veterinary Microbiology.* 1993 36(34), 288-299.
35. Collins MT & Morgan IR. Simulation model of paratuberculosis control in a dairy herd. *Preventive Veterinary Medicine.* 1992 14(1-2), 21-32. [https://doi.org/10.1016/0167-5877\(92\)90081-P](https://doi.org/10.1016/0167-5877(92)90081-P)
36. Collins DM, Gabric DM, de Lisle GW. Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. *J Clin Microbiol.* 1990. 28:1591-6.
37. Costa EF, Fazzio LE, Travería GE, Sánchez RO, Alvarado Pinedo MF, Mattioli GA, Otero MM, Chialva M, Romero JR. Causas de mortalidad y aborto en bovinos. Informe de 1163 casos entre 1986 y 2001 en la provincia de Buenos Aires. *Revista de Medicina Veterinaria.* 2004 85(1), 16-22.
38. Costanzo G, Pinedo FA, Mon ML, Viale M, Gil A, y col. Accuracy assessment and screening of a dairy herd with paratuberculosis by three different ELISAs. *Veterinary Microbiology.* 2012. 156(1-2), 183-188. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.10.029>
39. Coussens PM, Verman N, Coussens MA, Elftman MD, & McNulty AM. Cytokine gene expression in peripheral blood mononuclear cells and tissues of cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: evidence for an inherent proinflammatory gene expression pattern. *Infection and immunity.* 2004. 72(3), 1409-1422. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.3.1409-1422.2004>
40. Cox JC, Drane DP, Jones SL, Ridge R, Milner AR. Development and evaluation of a rapid absorbed enzyme immunoassay test for the diagnosis of Johne's disease in cattle. *Australian Veterinary Journal.* 1991. 68(5), 157-160. DOI: 10.1111/j.1751-0813.1991.tb03167.x
41. Crowther JR. *The ELISA Guidebook.* Totawa, New Jersey. USA. Ed: Humana Press. 2002.
42. D'Agostino M, Diez-Valcarce M, Robles S, Losilla-Garcia B, Cook N. A loop-mediated isothermal amplification-based method for analysing animal feed for the presence of Salmonella. *Food Anal Methods.* 2015. 8, 2409-2416.
43. de Kruijf M, Coffey A, O'Mahony J. The investigation of the truncated mbtA gene within the mycobactin cluster of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* as a novel diagnostic marker for real-time PCR. *Journal of microbiological methods.* 2017. 40-48. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.03.005>

44. de Silva K, Begg D, & Whittington R. The interleukin 10 response in ovine Johne's disease. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2011. 139(1), 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2010.07.022>
45. Deb R, & Goswami PP. Co-expression of PPE 34.9 Antigen of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with Murine Interferon Gamma in HeLa Cell Line and Study of Their Immunogenicity in Murine Model. *Biotechnology research international*. 2011. 632705. <https://doi.org/10.4061/2011/632705>
46. Delafosse A, Meens E, Rambaud T, Hanoy F, Achour A. Sensitivities of a bulk-tank milk ELISA and composite fecal qPCR to detect various seroprevalence levels of paratuberculosis in cattle herds in Normandy, France. *Can Vet J*. 2019. 60(3), p 275–281.
47. Dhama K, & Derakhshandeh A. Trends and advances in the diagnosis and control of paratuberculosis in domestic livestock. *The veterinary quarterly*. 2016. 36(4), 203–227. <https://doi.org/10.1080/01652176.2016.1196508>
48. Dimareli-Malli Z, Mazaraki K, Stevenson K, Tsakos P, Zdragas A, Giantzi V, Petridou E, Heron I, Vafeas G. Culture phenotypes and molecular characterization of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from small ruminants. *Res Vet Sci*. 2013. 95:49–53
49. Di Paolo LA, Sosa PS, Alvarado Pinedo MF, Romero MA, Peralta LM, Travería GE. Paratuberculosis bovina: asociación entre el índice de urea y la densidad óptica del suero en la técnica de Elisa indirecta. *Brazilian Journal of Animal and Environmental Research*. 2021. 4(1), 1298-1306. DOI:10.34188/bjaerv4n1-105
50. Dundee L, Grant IR, Ball HJ & Rowe MT. Comparative evaluation of four decontamination protocols for the isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from milk. *Letters in applied microbiology*. 2001. 33(3), 173–177. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2001.00979.x>
51. Eisenberg SWF, Veldman E, Rutten VPMG, Koets AP. A longitudinal study of factors influencing the result of a *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* antibody ELISA in milk of dairy cows. *J Dairy Sci*. 2015. 98(4), 2345–2355. DOI:10.3168/jds.2014-8380
52. Ellingson JL, Bolin CA, and Stabel JR. Identification of a gene unique to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and application to diagnosis of paratuberculosis. *Mol. Cell. Probes*. 1998. 12:133-142.
53. Enosawa M, Kageyama S, Sawai K, Watanabe K, Notomi T, Onoe S, Mori Y, & Yokomizo Y. Use of loop-mediated isothermal amplification of the IS900 sequence for rapid detection of cultured *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Journal of clinical microbiology*. 2003, 41(9), 4359–4365. [10.1128/JCM.41.9.4359-4365.2003](https://doi.org/10.1128/JCM.41.9.4359-4365.2003)

54. Eslami M, Shafiei M, Ghasemian A, Valizadeh S, Al-Marzoqi AH, Shokouhi Mostafavi SK, Mirforughi SA. *Mycobacterium avium paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* complex and related subspecies as causative agents of zoonotic and occupational diseases. *Journal of Cellular Physiology*. 2019. <https://doi.org/10.1002/jcp.28076>
55. Fecteau ME, Hovingh E, Whitlock RH, & Sweeney RW. Persistence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in soil, crops, and ensiled feed following manure spreading on infected dairy farms. *The Canadian veterinary journal*. 2013. 54(11), 1083–1085.
56. Ferreira R, Fonseca LS, & Lilenbaum W. Agar gel immunodiffusion test (AGID) evaluation for detection of bovine paratuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Letters in Applied Microbiology*. 2002a. 35(3), 173–175. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2002.01149.x>
57. Ferreira R, Fonseca L, Lilenbaum W. Comparison between a commercial and an in-house ELISA or anti-*M. avium paratuberculosis* antibodies detection in dairy herds in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Latinoam. Microbiol*. 2002b. 44 (3–4), 129–132.
58. Fitzgerald LE, Abendaño N, Juste RA, & Alonso-Hearn M. Three-dimensional in vitro models of granuloma to study bacteria-host interactions, drug-susceptibility, and resuscitation of dormant mycobacteria. *BioMed research international*. 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/623856>
59. Fortea Ormaechea JI, Gisbert JP, y Marín Jiménez I. Papel de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en la etiopatogenia de la enfermedad de Crohn. *Gastroenterología y Hepatología*. 2009. 32(5), 353-363. doi: 10.1016/j.gastrohep.2008.12.006
60. Flesch IE, & Kaufmann SH. Attempts to characterize the mechanisms involved in mycobacterial growth inhibition by gamma-interferon-activated bone marrow macrophages. *Infection and immunity*. 1988. 56(6), 1464–1469. <https://doi.org/10.1128/iai.56.6.1464-1469.1988>
61. Gamberale F, Pietrella G, Sala M, Scaramella P, Puccica S, Antognetti V, Arrigoni N, Ricchi M, & Cersini A. Management of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy farms: Selection and evaluation of different DNA extraction methods from bovine and buffalo's milk and colostrum for the establishment of a safe colostrum farm bank. *Microbiology Open*. 2019 8(10), e875. <https://doi.org/10.1002/mbo3.875>
62. Gao A, Odumeru J, Raymond M y Mutharia L. Development of improved method for isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from bulk tank milk: Effect of age of milk, centrifugation, and decontamination. *Can. J. Vet. Res*. 2005. 69:81-87.
63. Garcia AB, Shalloo L. Invited review: The economic impact and control of paratuberculosis in cattle. *J Dairy Sci*. 2015. 98:5019–39.

64. Garry F. Control of Paratuberculosis in Dairy Herds. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 2011, 27(3), 599–607. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2011.07.001>
65. Gavey L, Citer L, More SJ, & Graham D. The Irish Johne's Control Programme. *Frontiers in veterinary science*. 2021. 8, 703843. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.703843>
66. Gessani S, & Belardelli F. IFN-gamma expression in macrophages and its possible biological significance. *Cytokine & growth factor reviews*. 1998. 9(2), 117–123. [https://doi.org/10.1016/s1359-6101\(98\)00007-0](https://doi.org/10.1016/s1359-6101(98)00007-0)
67. Giese SB, and Ahrens P. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk from clinically affected cows by PCR and culture. *Vet. Microbiol*. 2000. 77:291-297
68. Gilardoni LR, Fernández B, Morsella C, Mendez L, Jar AM, Paolicchi FA, Mundo SL. *Mycobacterium paratuberculosis* detection in cow's milk in Argentina by immunomagnetic separation-PCR. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2016. 47(2), 506–512. [10.1016/j.bjm.2016.01.013](https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.01.013)
69. Gilardoni LR. ESTRATEGIA DIAGNÓSTICA DE PARATUBERCULOSIS EN BOVINOS. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires. 2012a. [Microsoft Word - TESIS 08-3 2012 B .doc \(uba.ar\)](#)
70. Gilardoni LR, Paolicchi FA, Mundo SL. Bovine paratuberculosis: a review of the advantages and disadvantages of different diagnostic tests. *Revista Argentina de Microbiología*. 2012b. 44: 20115
71. Græsbøll K, Andresen LO, Halasa T, Toft N. Opportunities and challenges when pooling milk samples using ELISA. *Prev Vet Med*. 2017.138(B), 93-98. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.08.001>
72. Grant IR, Pope CM, O'Riordan LM, Ball HJ, Rowe MT. Improved detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk by immunomagnetic PCR. *Vet. Microbiol*. 2000. 77:369-378.
73. Green EP, Moss MT, Hermon-Taylor J, McFadden JJ. Insertion elements in mycobacteria. *Acta Leprol* 7 Suppl. 1989. 1:239–42
74. Greig A, Stevenson K, Henderson D, Perez V, Hugues V, Pavlik I, Hines ME, McKendrick I & Sharp JM. Epidemiological study of paratuberculosis in wild rabbits in Scotland. *J. Clin. Microbiol*. 1990. 37, 1746-1751.
75. Guidry AJ, Miller RH. Immunoglobulin isotype concentrations in milk as affected by stage of lactation and parity. *J Dairy Sci*. 1986. 69(7), 1799–1805. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(86\)80604-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(86)80604-X)
76. Gwozdz JM, Thompson KG, Manktelow BW, Murray A, West DM. Vaccination against paratuberculosis of lambs already infected

experimentally with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. Aust Vet J. 2000. 78:560566.

77. Hall RM & Ratledge C. A simple method for the production of mycobactin, the lipid-soluble siderophore, from mycobacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 1982. 15(2), 133-136.
78. Hanifian S, Khani S, Barzegari A, & Shayegh J. Quantitative real-time PCR and culture examination of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* at farm level. *Veterinary microbiology*. 2013. 162(1), 160–165. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.08.026>
79. Hansen S, Roller M, Alslim L, Böhlken-Fascher S, Fechner K, Czerny CP & Abd El Wahed A. Development of Rapid Extraction Method of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* DNA from Bovine Stool Samples. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*. 2019. 9(2), 36. <https://doi.org/10.3390/diagnostics9020036>
80. Harboe M, Nagai S, Patarroyo ME, Torres ML, Ramirez C, & Cruz N. Properties of proteins MPB64, MPB70, and MPB80 of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infection and immunity*, 1986. 52(1), 293–302. <https://doi.org/10.1128/iai.52.1.293-302.1986>
81. Harris NB, Barletta RG. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. *Clin Microbiol Rev*. 2001. 14:489–512.
82. Hendrick SH, Duffield TE, Kelton DE, Leslie KE, Lissemore KD, & Archambault M. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays performed on milk and serum samples for detection of paratuberculosis in lactating dairy cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2005. 226(3), 424–428. <https://doi.org/10.2460/javma.2005.226.424>
83. Hermon Taylor J, Bull T. Crohn's disease causes by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a public health tragedy whose resolution is long overdue. *Journal of Medical Microbiology*. 2002. 51(1), 3-6. DOI:[10.1099/0022-1317-51-1-3](https://doi.org/10.1099/0022-1317-51-1-3)
84. Hett EC, & Rubin EJ. Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective. *Microbiology and molecular biology reviews*. 2008. 72(1), 126–156. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00028-07>
85. Inglis GD and Kalischuk LD. Use of PCR for direct detection of *Campylobacter* species in bovine feces. *Appl Environ Microbiol*. 2003. 69, 3435–3447.
86. Jayarao BM, Pillai SR, Wolfgang DR, Griswold DR, Rossiter CA, Tewari D, Burns CM, and Hutchingson LJ. Evaluation of IS900-PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in cattle using quarter milk and bulk tank milk samples. *Foodborne Pathog. Dis*. 2004. 1:17-26

87. Jenvey CJ, Reichel MP, & Cockcroft PD. The diagnostic performance of an antibody enzyme-linked immunosorbent assay using serum and colostrum to determine the disease status of a Jersey dairy herd infected with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians*. 2016. Inc, 28(1), 50–53. <https://doi.org/10.1177/1040638715612873>
88. Jørgensen JB. An improved medium for culture of from bovine faeces. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 1982. 23:325-335.
89. Johne HA, Frothingham L. Ein eigenthümlicher Fall von Tuberkulose beim Rind. *Dtsch. Ztschr. Tiermed. Path.* 1895. 21: 438-454.
90. Juste RA, Marco JC, Sáez de Ocáriz C, Adúriz JJ. Comparison of different media for the isolation of small ruminant strains of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet Microbiol*. 1991. 28:385–90
91. Kalis CH, Collins MT, Hesselink JW, Barkema HW. Specificity of two tests for early diagnosis of bovine paratuberculosis based on cell-mediated immunity: the Johnin skin test and the gamma interferon assay. *Veterinary Microbiology*. 2003. 97: 73-86.
92. Khare S, Ficht TA, Santos RL, Romano J, Ficht AR, Zhang S, Grant IR, Libal M, Hunter D, y Adams LG. Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine milk and feces by a combination of immunomagnetic bead separation-conventional PCR and real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004, 42:1075-1081. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.3.1075-1081.2004>
93. Klausen J, Huda A, Ekeröth L, Ahrens P. Evaluation of serum and milk ELISAs for paratuberculosis in Danish dairy cattle. *Preventive Veterinary Medicine*. 2003. 58(3-4), 171-178. DOI:[10.1016/S0167-5877\(03\)00047-3](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(03)00047-3)
94. Koets AP, Eda S, Sreevatsan S. The within host dynamics of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infection in cattle: where time and place matter. *Veterinary Research*. 2015. 46(1), 1-17. DOI: 10.1186 / s13567-015-0185-0
95. Koets AP, Rutten VPMG, Hoek A, Bakker D, van Zijderveld F, Müller KE & van Eden W. — The T(h) 1 to T(h) 2 shift in bovine paratuberculosis and the role of apoptotic cell death. In Proc. 6th International Colloquium on paratuberculosis (E.J.B. Manning & M.T. Collins, eds), 14-18 February, Melbourne. International Association for Paratuberculosis, Madison, Wisconsin. 1990. 585-592.
96. Köhler H, Ziller M, Gierke F, and Donat K. Within-pool prevalence limits for the identification of paratuberculosis infected herds using antibody detection in pooled milk samples. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr*. 2017. 130:34–41.

97. Körmendy B. Diagnostic value of mammalian, avian and johnin PPD tuberculins in cattle herds infected by *Mycobacterium paratuberculosis*. *Acta Veterinaria Hungarica*. 1988. 36(3-4), 177-183.
98. Krieger M, Eisenberg S, Köhler H, Freise F, & Campe A. Within-herd prevalence threshold for the detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* antibody-positive dairy herds using pooled milk samples: A field study. *Journal of dairy science*. 2021, S0022-0302(21)00952-8. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20401>
99. Lambrecht RS, & Collins MT. *Mycobacterium paratuberculosis*. Factors that influence mycobactin dependence. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 1992. 15(3), 239–246. [https://doi.org/10.1016/0732-8893\(92\)90119-e](https://doi.org/10.1016/0732-8893(92)90119-e)
100. Lambrecht RS, Carriere JF, Collins MT. A model for analyzing growth kinetics of a slowly growing *Mycobacterium* sp. *Appl Environ Microbiol*. 1988. 54:910–6.
101. Lavers CJ, Barkema HW, Dohoo IR, McKenna SL, & Keefe GP. Evaluation of milk ELISA for detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy herds and association with within-herd prevalence. *Journal of dairy science*. 2014. 97(1), 299–309. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7101>
102. Leite FL, Stokes KD, Robbe-Austerman S, and Stabel JR. Comparison of fecal DNA extraction kits for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest*. 2013 25(1):27-34
103. León E y Duffy S. “Programa de Muestreo Estadístico en Sanidad Animal (ProMESA)”, *Anales 39.as Jornadas Argentinas de Informática: Congreso Argentino de Agro informática 2010*, Buenos Aires, pp. 807-817.
104. Leroy B, Viart S, Trincherro N, Roupie V, Govaerts M, y col. Use of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* specific coding sequences for serodiagnosis of bovine paratuberculosis. *Veterinary Microbiology*, 2009. 135(3-4), 313–319. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.065>
105. Lévy-Frébault VV, & Portaels F. Proposed minimal standards for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1992, 42(2), 315-323. <https://doi.org/10.1099/00207713-42-2-315>
106. Li L, Bannantine JP, Zhang Q, Amonsin A, May BJ, Alt D, Banerji N, Kanjilal S, Kapur V. The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005 Aug;102(35) 12344-12349. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505662102>
107. Liverani E, Scaioli E, Cardamone C, Dal Monte P, Belluzzi A. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in the etiology of

- Crohn's disease, cause or epiphenomenon? *World Journal Gastroenterology*. 2014, 20(36), 13060-13070. doi: [10.3748/wjg.v20.i36.13060](https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i36.13060).
108. Lombard JE, Byrem TM, Wagner BA, McCluskey. Comparison of milk and serum enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in dairy cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2006. 18(5), 448-458. <https://doi.org/10.1177/104063870601800504>.
109. Lusted LB. Signal detectability and medical decision-making. *Science* 1971; 171: 1.217-1.219.
110. Manning E, Collins MT. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: Pathogen, pathogenesis and diagnosis. *Revue scientifique et technique*. 2001 20(1), 133-150. DOI: [10.20506/rst.20.1.1275](https://doi.org/10.20506/rst.20.1.1275).
111. Maroudam V, Mohana Subramanian B, Praveen Kumar P, Dhinakar Raj G. Paratuberculosis: Diagnostic Methods and their Constraints. *J Veterinar Sci Technol*. 2015. 6: 259. doi:[10.4172/2157-7579.1000259](https://doi.org/10.4172/2157-7579.1000259)
112. Martinez FO, & Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime reports*. 2014. 6, 13. <https://doi.org/10.12703/P6-13>
113. Mathevon Y, Foucras G, Corbière F. Flock sensitivity and specificity of pooled fecal qPCR and pooled serum ELISA for screening ovine paratuberculosis. *PLoS ONE*. 2019. vol 14(12), e0226246.
114. McFadden JJ, Butcher PD, Chiodini R, Hermon Taylor J. Crohn's disease-isolated mycobacteria are identical to *Mycobacterium paratuberculosis*, as determined by DNA probes that distinguish between mycobacterial species. *Journal of Clinical Microbiology*. 1987. 25(5), 796–801.
115. McKenna SL, Keefe GP, Barkema HW y Sockett DC. Evaluation of three ELISAs for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using tissue and fecal culture as comparison standards. *Vet. Microbiol*. 2005. 110, 105-111. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.07.010>
116. Mitchell RM, Medley GF, Collins MT, Schukken YH. A meta-analysis of the effect of dose and age at exposure on shedding of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) in experimentally infected calves and cows. *Epidemiol Infect*. 2012. 140:231–46.
117. Momotani E, Whipple DL, Thiermann AB & Cheville NF. - Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches in calves. *Vet. Pathol*. 1988. 25, 131-137.
118. Moreno F, Frade V, Morsella C, Méndez A, Paolicchi F, Späth EJA. Análisis retrospectivo de paratuberculosis en establecimientos bovinos diagnosticados en INTA EEA Balcarce, Argentina, durante el periodo 1991-2015. En: *Memorias Sociedad Iberoamericana de Epidemiología Veterinaria y Medicina Preventiva*. 2017. Valdivia, Chile, p 36. Disponible

- en: [http://www.sag.cl/sites/default/files/resumenes\\_sievmp\\_valdivia-2017.pdf](http://www.sag.cl/sites/default/files/resumenes_sievmp_valdivia-2017.pdf).
119. Nielsen SS. Developments in diagnosis and control of bovine paratuberculosis. CAB Reviews International. 2014. (Online ISSN 1749-8848) doi: [10.1079/PAVSNNR20149012](https://doi.org/10.1079/PAVSNNR20149012)
  120. Nielsen SS, Toft N. Bulk tank milk ELISA for detection of antibodies to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: Correlation between repeated tests and within-herd antibody-prevalence. Preventive Veterinary Medicine, 2014 113(1), 96–102. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2013.10.013>
  121. Nielsen SS, Toft N. Effect of days in milk and milk yield on testing positive in milk antibody ELISA to *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in dairy cattle. Veterinary Immunology and immunopathology. 2012. 149, 6-10. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.05.013>
  122. Nielsen SS, & Toft N. Effect of management practices on paratuberculosis prevalence in Danish dairy herds. Journal of dairy science. 2011. 94(4), 1849–1857. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3817>
  123. Nielsen SS. Transitions in diagnostic tests used for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infections in cattle. Veterinary Microbiology. 2008.132:274–82
  124. Nielsen SS, Toft. Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: A review of accuracies of ELISA, interferon- $\gamma$  assay and faecal culture techniques. Vet. Microbiol. 2008. 129(3-4), 217–235. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.12.011>
  125. Nielsen SS, and Toft N. Age-specific characteristics of ELISA and fecal culture for purpose-specific testing for paratuberculosis. J. Dairy Sci. 2006. 89:569-579.
  126. Nielsen SS, Grønbæk C, Agger JF, Houe H. Maximum likelihood estimation of sensitivity and specificity of ELISAs and faecal culture for diagnosis of paratuberculosis. Preventive Veterinary Medicine. 2002a. a; 53:191–204.
  127. Nielsen SS, Grohn YT, and Enevoldsen C. Variation of the milk antibody response to paratuberculosis in naturally infected dairy cows. J. Dairy Sci. 2002b. 85:2795- 2802
  128. Nielsen SS, Thamsborg SM, Houe H, Bitsch V. Bulk-tank milk ELISA antibodies for estimating the prevalence of ISSN 1852-771X 35 paratuberculosis in Danish dairy herds. Prev Vet Med. 2000. 44, 1–7. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(00\)00098-2](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(00)00098-2)
  129. Norcross NL. Secretion and composition of colostrum and milk. Journal of the American Veterinary Medical Association. 1982. 181(10), 1057-1060.

130. Norton S, Johnson WO, Jones G, & Heuer C. Evaluation of diagnostic tests for Johne's disease (*Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*) in New Zealand dairy cows. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.* 2010 22(3), 341–351. <https://doi.org/10.1177/104063871002200301>
131. Núñez A, Piaggio J, Zaffaroni R, Cernichiaro N, Suanes A, De Freitas J, Huertas S, Gil A. Seroprevalence study of bovine paratuberculosis in dairy herds in Uruguay. Proceedings of the XI International Congress in Animal Hygiene. ISAH. 2003. 23-27. México. p. 493-495.
132. Osterstock JB, Fosgate GT, Norby B, Manning EJ, Collins MT, Roussel AJ. Contribution of environmental mycobacteria to false-positive serum ELISA results for paratuberculosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 2007. 230:896–901
133. Orme IM. Immunity to mycobacteria. Current opinion in immunology. 1993. 5(4), 497–502. [https://doi.org/10.1016/0952-7915\(93\)90029-r](https://doi.org/10.1016/0952-7915(93)90029-r)
134. Orme IM, & Cooper AM. Cytokine/chemokine cascades in immunity to tuberculosis. *Immunology today.* 1990. 20(7), 307–312. [https://doi.org/10.1016/s0167-5699\(98\)01438-8](https://doi.org/10.1016/s0167-5699(98)01438-8)
135. Orme IM, & Basaraba RJ. The formation of the granuloma in tuberculosis infection. *Seminars in immunology.* 2014. 26(6), 601–609. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.09.009>
136. Ott SL, Wells SJ, Wagner BA. Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. *Prev Vet Med.* 1990. 40: 179-192.
137. Ozsvári L, Harnos A, Lang Z, Monostori A, Strain S, & Fodor I. The Impact of Paratuberculosis on Milk Production, Fertility, and Culling in Large Commercial Hungarian Dairy Herds. *Frontiers in Veterinary Science.* 2020. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.565324>
138. Paolicchi FA, Cirone K, Morsella C, y Gioffré A. First isolation of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* from commercial pasteurized milk in Argentina. *Brazilian Journal of Microbiology.* 2012. 43(3), 1034–1037. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822012000300028>
139. Paolicchi FA, Zumárraga MJ, Gioffre A, Zamorano P, Morsella C, Verna A, Cataldi A, Alito A, Romano M. Application of different methods for the diagnosis of paratuberculosis in a dairy cattle herd in Argentina. *Journal of Veterinary Medicine.* 2003. 50(1), 20-26. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2003.00606.x>
140. Patterson DS, Allen WM & Lloyd MK. - Clinical Johne's as a protein losing enteropathy. *Vet. Rec.* 1967. 81, 717-718.

141. Pavlik I y col. Standardisation of restriction fragment length polymorphism analysis for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Journal of microbiological methods*. 1999. 38(1-2), pp.155-67.
142. Pavlik I, Matlova L, Bartl J, Svastova P, Dvorska L & Whitlock R. Parallel faecal and organ *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* culture showing organism distribution in different breeds of cattle. In Proc. 6th International Colloquium on paratuberculosis (E.J.B. Manning & M.T. Collins, eds), 14-18 February, Melbourne. International Association for Paratuberculosis, Madison, Wisconsin. 1990. 642-656
143. Pesqueira MN, Yus E, Factor C, Mato I, Sanjuán ML, Eiras C, Arnaiz I, & Diéguez FJ. Short communication: Correlation between within-herd antibody-prevalence and bulk tank milk antibody levels to *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* using 2 commercial immunoassays. *Journal of dairy science*. 2017. 100(9), 7544–7548. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12706>
144. Pfeiffer DU. *Veterinary Epidemiology-An Introduction*, Editado por la Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA), Proyecto de Veterinarios del Sur (PROVETSUR) y La Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata. Argentina 2002; p 1-65.
145. Pillai SR, Jayarao BM. Application of IS900 PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* directly from raw milk. *J. Dairy Sci*. 2002, 85:1052-1057
146. Pithua P, Godden SM, Wells SJ, & Stabel JR. Evaluation of the risk of paratuberculosis in adult cows fed *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* DNA-positive or -negative colostrum as calves. *American journal of veterinary research*. 2011 72(11), 1456–1464. <https://doi.org/10.2460/ajvr.72.11.1456>
147. Pontiroli A, Travis ER, Sweeney FP, Porter D, Gaze WH, Mason S, Hibberd V, Holden J. Pathogen quantitation in complex matrices: a multi-operator comparison of DNA extraction methods with a novel assessment of PCR inhibition. *PLoS ONE*. 2011 6, e17916.
148. R Core Team. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. 2020. Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
149. Rademaker JL, Vissers MM, and Giffel MC. Effective heat inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw milk contaminated with naturally infected feces. *Appl. Environ. Microbiol*. 2007. 73:4185-4190.
150. Ramírez R, Maldonado J. Evasión molecular de la activación del macrófago bovino por *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*. 2013. Vol. 18, no 3, p. 3897-3907.
151. Rathnaiah G, Zinniel DK, Bannantine JP, Stabel JR, Gröhn YT, Collins MT and Barletta RG. Pathogenesis, Molecular Genetics, and

Genomics of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, the Etiologic Agent of Johne's Disease. *Front. Vet. Sci.* 2017. 4:187. <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00187>

152. Reichel MP, Kittelberger R, Penrose ME, Meynell RM, Cousins D, Ellis T, De Lesli W. Comparison of serological tests and faecal culture for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle and analysis of the antigens involved. *Veterinary Microbiology.* 1999, 66(2), 135–150. [10.1016/s0378-1135\(98\)00311-3](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(98)00311-3)
153. Ridell M. Crossreactivity between *Mycobacterium leprae* and various actinomycetes and related organisms. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases: official organ of the International Leprosy Association*, 1983. 51(2), 185–190.
154. Rindi L, & Garzelli C. Genetic diversity and phylogeny of *Mycobacterium avium*. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases.* 2014. 21, 375–383. <https://doi.org/10.1016/j.meeqid.2013.12.007>
155. Risso MA, Risso P. *Introducción a la estadística bayesiana: uso de lenguaje R y Winbugs. 1ra Ed, Argentina, Buenos Aires, la plata, editorial: Vuelta a Casa.* 2017. Pág: 91-110.
156. Robin X, Turck N, Hainard A, Tiberti N, Lisacek F, Sanchez JC, Müller M). pROC: an opensource package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinformatics.* 2011. 12, p. 77. [doi: 10.1186/147121051277](https://doi.org/10.1186/147121051277)
157. Romero MA, Alvarado Pinedo MF, Moyano RD, Peralta L, Sosa P, Santangelo M, Travería G. Medio de cultivo líquido para el diagnóstico de paratuberculosis bovina. Aplicación y análisis comparativo con el medio de Herrold: resultados preliminares. *Analecta Veterinaria.* 2018. 38(1), 50 - 55. [doi.org/10.24215/15142590e025](https://doi.org/10.24215/15142590e025)
158. Rosenbusch F. La EJ o enteritis paratuberculosa del bovino en la Argentina. *Anuales de la Sociedad Rural.* 1937. 5, pp.475-480.
159. Sange MD, Becker A, Hassan AA, Bülte M, Ganter M, Siebert U, Abdulmawjood A. Development and validation of a loop-mediated isothermal amplification assay- a rapid and sensitive detection tool for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in small ruminants. *Journal of Applied Microbiology.* 2019. 127(1), 47-58. <https://doi.org/10.1111/jam.14284>
160. Sasaki M, Davis CL, Larson L. Production and turnover of IgG1 and IgG2 immunoglobulins in the bovine around parturition. *Journal of Dairy Science.* 1976. 59, 2046–2055. [10.3168/jds.S0022-0302\(76\)84486-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(76)84486-4)
161. Schwartz BD, & De Voss JJ. Structure and absolute configuration of mycobactin J. *Tetrahedron Letters.* 2001. 42(21), 3653–3655. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)00531-7](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)00531-7)

162. Sergeant ES, Nielsen SS, & Toft N. Evaluation of test-strategies for estimating probability of low prevalence of paratuberculosis in Danish dairy herds. *Preventive veterinary medicine*. 2008., 85(1-2), 92–106. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2008.01.005>
163. Sergeant ESG, Marshall DJ, Eamens GJ, Kearns C, Whittington RJ. Evaluation of an absorbed ELISA and an agar-gel immuno-diffusion test for ovine paratuberculosis in sheep in Australia. *Preventive veterinary medicine*. 2003. vol. 61, no 4, p. 235-248. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2003.08.010>
164. Sherman DM, Gay JM, Bouley DS, Nelson GH. Comparison of the complement fixation and agar gel immunodiffusion tests for diagnosis of subclinical bovine paratuberculosis. *Am J Vet Res*. 1990. 50: 461-465.
165. Shu D, Subharat S, Wedlock DN, Luo D, de Lisle GW, & Buddle BM. Diverse cytokine profile from mesenteric lymph node cells of cull cows severely affected with Johne's disease. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2011. 18(9), 1467-1476. <https://doi.org/10.1128/CVI.05201-11>
166. Sica A, & Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *The Journal of clinical investigation*. 2012. 122(3), 787–795. <https://doi.org/10.1172/JCI59643>
167. Singh M, Gupta S, Singh SV, Kumaresan G, Sharma D, Aseri GK, & Sohal JS. Development and Standardization of Visual Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for Specific Diagnosis of Johne's Disease. *Indian Journal of Animal Research*, 2020. 54(3), 293-299.
168. Slana I, Paolicchi F, Janstova B, Navratilova P, Pavlik I. Detection methods for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk and milk products: a review. *Veterinari Medicina*. 2008. 53(6), 283–306.
169. Smith RL, Gröhn YT, Pradhan AK, Whitlock RH, Van Kessel JS, Smith JM, Wolfgang DR, & Schukken YH. The effects of progressing and non-progressing *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infection on milk production in dairy cows. *Journal of dairy science*. 2016. 99(2), 1383–1390. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9822>
170. Souza CD, Evanson OA, Sreevatsan S, & Weiss DJ. Cell membrane receptors on bovine mononuclear phagocytes involved in phagocytosis of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*. *American journal of veterinary research*. 2007. 68(9), 975-980.
171. Stabel JR, Bradner L, Robbe-Austerman S, Beitz DC. Clinical disease and stage of lactation influence shedding of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* into milk and colostrum of naturally infected dairy cows. *J Dairy Sci*. 2014. 97:6296–304. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8204>
172. Stabel JR. 2010. Immunology of paratuberculosis infection and disease. Pages 230- 243 in *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control*. M. Behr and D. M. Collins, ed. CAB International, Cambridge, MA

173. Stabel JR. Production of gamma-interferon by peripheral blood mononuclear cells: an important diagnostic tool for detection of subclinical paratuberculosis. *J Vet Diagn Invest* .1996. 8: 345-350. <https://doi.org/10.1177/104063879600800311>
174. Stabel JR. - Transitions in immune response to *M. a. paratuberculosis*. In Proc. 6th International Colloquium on paratuberculosis (E.J.B. Manning & M.T. Collins, eds), 14-18 February, 1990. Melbourne. International Association for Paratuberculosis, Madison, Wisconsin, 579-584.
175. Stevenson K. Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and the influence of strain type on infection and pathogenesis: a review. *Veterinary research*. 2015. 46(1), 1-13.
176. St-Jean G, & Jernigan AD. Treatment of *Mycobacterium paratuberculosis* infection in ruminants. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*. 1991. 7(3), 793–804. [https://doi.org/10.1016/s0749-0720\(15\)31085-9](https://doi.org/10.1016/s0749-0720(15)31085-9)
177. Streeter R, Hoffsis G, Bech-Nielsen S, Shulaw W, y Rings D. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from calostrum and milk of subclinically infected cows. *American Journal of Veterinary Research*. 1995. 56(10), 1322– 1324.
178. Strommenger B, Stevenson K, Gerlach GF. Isolation and diagnostic potential of ISMav2, a novel insertion sequence-like element from *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett*. 2001. 196:31–7.
179. Sweeney RW. Pathogenesis of paratuberculosis. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*. 2011. 27(3), 537–v. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2011.07.001>
180. Sweeney RW, Whitlock RH, Buckley CL, & Spencer PA. Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 1995. 7(4), 488-493. <https://doi.org/10.1177/104063879500700411>
181. Sweeney RW, Whitlock RH, Buckley CL, Spencer P, Rosenberger AE, & Hutchinson LJ. Diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle, using enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. *American journal of veterinary research*. 1994. 55(7), 905–909.
182. Sweeney RW, Whitlock RH y Rosenberger A. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. *J. Clin. Microbiol*. 1992. 30:166-171. <https://doi.org/10.1128/jcm.30.1.166-171.1992>

183. Tanaka S, Sato M, Onitsuka T, Kamata H, & Yokomizo Y. Inflammatory cytokine gene expression in different types of granulomatous lesions during asymptomatic stages of bovine paratuberculosis. *Veterinary Pathology*. 2005. 42(5), 579-588. <https://doi.org/10.1354/vp.42-5-579>
184. Thirunavukkarasu S, de Silva K, Plain KM, Whittington JR. Role of host and pathogen associated lipids in directing the immune response in mycobacterial infections, with emphasis on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Crit Rev Microbiol*. 2016. 42(2):262-75.
185. Thornton CG, & Passen S. Inhibition of PCR amplification by phytic acid, and treatment of bovine fecal specimens with phytase to reduce inhibition. *Journal of microbiological methods*. 2004. 59(1), 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.06.001>
186. Timms VJ, Daskalopoulos G, Mitchell HM, y Neilan BA. The Association of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with Inflammatory Bowel Disease. *PLOS ONE*. 2016. 11(2), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148731>
187. Tiwari A, Van Leeuwen JA, Dohoo IR, Keefe GP y Weersink A. Estimate of the direct production losses in Canadian dairy herds with subclinical *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection. *Canadian Veterinary Journal*. 2008. 49(6), 569-576.
188. Tiwari A, VanLeeuwen JA, McKenna SL, Keefe GP, & Barkema HW. Johne's disease in Canada: Part I: Clinical symptoms, pathophysiology, diagnosis, and prevalence in dairy herds. *The Canadian Veterinary Journal*. 2006. 47(9), 874–882.
189. Toft N, Nielsen SS y Jorgensen E. Continuous data diagnostic tests for paratuberculosis as a multistage disease. *J. Dairy Sci*. 2005. 88(11), 3923-3931. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)73078-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)73078-2)
190. Trangoni MD, Gioffré AK, Cerón Cucchi ME, Caimi KC, Ruybal P, Zumárraga MJ, & Cravero SL. LAMP technology: Rapid identification of *Brucella* and *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2015. 46(2), 619–626. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246220131206>
191. Travería GE. “Análisis antigénico del *Mycobacterium paratuberculosis* y diagnóstico de la paratuberculosis bovina mediante enzimo inmuno ensayo (ELISA)”. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. 2003.
192. Van Schaik G, Kalis CHJ, Benedictus G, Dijkhuizen AA, & Huirne RBM. Cost-benefit analysis of vaccination against paratuberculosis in dairy cattle. *Veterinary Record*. 1996. 139(25), 624-627. <https://doi.org/10.1136/vr.139.25.624>
193. Vansnick E, De Rijk P, Vercammen F, Geysen D, Rigouts L, & Portaels F. Newly developed primers for the detection of *Mycobacterium avium*

- subspecies *paratuberculosis*. *Veterinary microbiology* 2004. 100(3-4), 197-204.
194. Vasini Rosell B, Lagleyze B, Morsella C, Méndez L, Gioffre A, Paolicchi F. Evidence of in utero infection by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using Multiple-Locus Variable number tandem-repeat Analysis: first report in Argentina. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 2020. 57(1): e161653. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2020.161653>
195. Vázquez P, Garrido JM, Juste RA. Specific antibody and interferon-gamma responses associated with immunopathological forms of bovine paratuberculosis in slaughtered Friesian cattle. *PLOS ONE*. 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064568>
196. Weiss DJ, Evanson OA, de Souza C, & Abrahamsen MS. A critical role of interleukin-10 in the response of bovine macrophages to infection by *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*. *American journal of veterinary research*. 2005. 66(4), 721–726. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2005.66.721>
197. Whitlock RH (2010). Paratuberculosis control measures in the USA. Pages 319-329 in *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control*. M. Behr and D. M. Collins, ed. CAB International, Cambridge, MA.
198. Whitlock, RH (2001). Protocol for culture of *mycobacterium paratuberculosis* from feces milk, and tissue. *Johne's Laboratory Updated*. 382 West Street Road Kennett Square, PA 19348.
199. Whitlock RH, Rosenberger AE, Sweeney RW, Spencer, PA. Distribution of *M. paratuberculosis* in tissues of cattle from herds infected with Johne's disease. In: Chiodini RJ, Hines II ME, Collins, MT, editors. *Fifth International Colloquium on Paratuberculosis*, 29 September-October 1996, International Association for Paratuberculosis, Madison, WI, USA; 1996. p. 168–74
200. Whittington RJ, Donat K, Weber MF, Kelton D, Nielsen SS, Eisenberg S, Arrigoni N, Juste R, Sáez JL, Dhand N, Santi A, Michel A, Barkema H, Kralik P, Kostoulas P, Citer L, Griffin F, Barwell R, Moreira M, Slana I, De Waard JH. Control of paratuberculosis: who, why and how. A review of 48 countries. *BMC veterinary research*. 2019. 15(1), 198. DOI: [10.1186/s12917-019-1943-4](https://doi.org/10.1186/s12917-019-1943-4)
201. Whittington RJ, Whittington AM, Waldron A, Begg DJ, de Silva K, Purdie AC, Plain KM. Development and validation of a liquid medium (M7H9C) for routine culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* to replace modified Bactec 12B medium. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013, 51(12), 3993-4000. DOI: [10.1128/JCM.01373-13](https://doi.org/10.1128/JCM.01373-13)
202. Whittington RJ. Factors affecting isolation and identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from fecal and tissue samples in a liquid culture system. *Journal of clinical microbiology*. 2009a. 47(3), pp.614-22.

203. Whittington RJ, Windsor PA. In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: A critical review and meta-analysis. *The Veterinary Journal*. 2009b. Volume 179, Issue 1, Pages 60-69, ISSN 1090-0233. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.08.023>.
204. Whittington RJ, Marshall DJ, Nicholls PJ, Marsh IB, & Reddacliff LA. Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment. *Applied and environmental microbiology*. 2004. 70(5), 2989–3004. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.5.2989-3004.2004>
205. Whittington RJ, Marsh IB, & Whitlock RH. Typing of IS1311 polymorphisms confirms that bison (*Bison bison*) with paratuberculosis in Montana are infected with a strain of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* distinct from that occurring in cattle and other domesticated livestock. *Molecular and cellular probes*. 2001a. 15(3), 139-145. <https://doi.org/10.1006/mcpr.2001.0346>.
206. Whittington RJ, Taragel CA, Ottaway S, Marsh I, Seaman J, Fridriksdottir V (2001b). Molecular epidemiological confirmation and circumstances of occurrence of sheep (S) strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cases of paratuberculosis in cattle in Australia and sheep and cattle in Iceland. *Vet Microbiol*. 79:311–22.
207. Whittington RJ, Sergeant ES. Progress towards understanding the spread, detection and control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in animal populations. *Aust Vet J*. 2001c;79(4):267–78.
208. Whittington RJ, Hope AF, Marshall DJ, Taragel CA, & Marsh I. Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: IS900 restriction fragment length polymorphism and IS1311 polymorphism analyses of isolates from animals and a human in Australia. *Journal of clinical microbiology*. 2000a. 38(9), 3240-3248. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.9.3240-3248.2000>
209. Whittington RJ, Fell S, Walker D, McAllister S, Marsh I, Sergeant E, Taragel CA, Marshall DJ, and Links IJ. Use of pooled fecal culture for sensitive and economic detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in flocks of sheep. *Journal of clinical microbiology*. 2000b. 38(7), 2550-2556. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.7.2550-2556.2000>
210. Wichert A, Einax E, Hahn N, Klassen A, & Donat K. Detection of *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* in Pooled Fecal Samples by Fecal Culture and Real-Time PCR in Relation to Bacterial Density. *Animals*. 2021. 11(6), 1605. <https://doi.org/10.3390/ani11061605>
211. Williams BG. Optimal pooling strategies for laboratory testing. South African Centre for Epidemiological Modelling and Analysis (SACEMA, [www.sacema.org](http://www.sacema.org)), Stellenbosch, South Africa. 2010; arXiv: 1007.4903 [q-

- bio. QM]. (consultado 10 de diciembre 2020) Disponible en: <https://arxiv.org/abs/1007.4903>
212. Williams MR, Millar P. Changes in serum immunoglobulin levels in Jerseys and Friesians near calving. *Res Vet Sci.* 1979. 26(1), 81–84. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(20\)30946-2](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(20)30946-2)
213. Wilson DJ, Rood K, Biswas P, & Byrem TM. Herd-level prevalence of Johne's disease in Utah and adjacent areas of the intermountain west as detected by a bulk-tank milk surveillance project. *Journal of dairy science.* 2010. 93(12), 5792–5797. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3481>
214. Windsor PA, Whittington RJ. Evidence for age susceptibility of cattle to Johne's disease. *The Veterinary Journal.* 2010. Volume 184, Issue 1, 37-44, ISSN 1090-0233. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.01.007>
215. Yashiki N, Yamazaki Y, Subangkit M, Okabayashi T, Yamazaki W, & Goto Y. Development of a LAMP assay for rapid and sensitive detection and differentiation of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and subsp. *hominissuis*. *Letters in applied microbiology.* 2019. 69(3), 155–160. <https://doi.org/10.1111/lam.13188>
216. Yokomizo Y, Yugi H, Merkal RS. A method for avoiding false-positive reactions in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculosis. *Japanese Journal of veterinary science* 1985 47(1), 111–119. DOI: [10.1292/jvms1939.47.111](https://doi.org/10.1292/jvms1939.47.111).
217. Zervens LM, Nielsen SS, & Jungersen G. Characterisation of an ELISA detecting immunoglobulin G to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine colostrum. *Veterinary journal.* 2013, 197(3), 889–891. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.03.018>
218. Zweig MH y Campbell G. "Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine". *Clinical chemistry.* 1993. 39 (8): 561–577

## ANEXOS

### ANEXO I. PRODUCCIÓN DE ANTÍGENO / CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DEL WLA MEDIANTE MÉTODO BRADFORD Y ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA SDS-PAGE.

Fórmula para 1L de caldo y medio glicerinado para la producción de antígeno descrita en el apartado 2.2

Componentes	Cantidad
Extracto de carne	5 gr.
Cloruro de sodio	5 gr.
Peptona	1,5 gr.
Glicerina	70 mL.
Agua Destilada	930 mL.
Agar (versión sólida 1,8%)	18 gr.

#### Cuantificación de proteínas mediante el método Bradford.

Este método es una técnica colorimétrica para la cuantificación de proteínas, para la ejecución del mismo se utilizó reactivo de Bradford (BIO BASIC®), se realizó una curva de calibración de seroalbúmina bovina y se realizaron las mediciones con el filtro de 460nm.

#### Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE.

##### Soluciones Stock

##### Acrilamida bis acrilamida

acrilamida 30 gr.

bis acrilamida 0,8 gr.

H<sub>2</sub>O csp 100 mL.

Se prepara en un vaso de precipitado o Erlenmeyer graduado, se disuelve en agitador magnético, se retira el buzo y se completa el volumen. Filtrar con embudo en recipiente color caramelo. Conservar refrigerado a 4°C.

#### **Buffer TRIS HCl 1,5 M (pH 8,8)**

Tris-base 18,5 gr.

HCl csp pH 8,8

H<sub>2</sub>O 50 mL. (luego llevar a 100 mL).

Se disuelve el TRIS en la mitad del volumen final, se ajusta el pH con HCl puro, se completa el volumen de agua indicada previamente, se fracciona en vasos rotulados y se conserva a 4°C.

#### **Buffer TRIS HCl 0,5 M (pH 6,8)**

Tris-base 6 gr.

HCl csp pH 6,8

H<sub>2</sub>O 50 mL. (luego llevar a 100 mL).

Proceder como para Buffer TRIS HCl pH 8,8.

#### **SDS al 10%**

Se disuelven 10 gr de SDS en 50 mL de H<sub>2</sub>O en un Erlenmeyer con agitación y si es necesario en baño maría a 60°C aproximadamente. Se completa el volumen, se enfrasca en un vaso caramelo, se rotula y se almacena a temperatura ambiente.

#### **APS al 10%**

Se prepara en el momento de trabajar, 100 mg de APS en 1 mL de agua.

#### **Buffer para reservorio de corrida concentración 10X**

TRIS-base 30,2 gr.

Glicina 144 gr.

H<sub>2</sub>O                    csp 100 mL.

100 mL buffer 10X + 10 mL SDS 10% ==> agua (csp 1L)

**Azul de bromofenol al 10%**

0,1gr de azul de bromofenol en 10 mL de agua.

**Buffer de carga (LB) para condiciones reductoras.**

TRIS HCl    0,5 M (pH 6,6) 250µL

SDS 10%                            400 µL

BETA ME 100 µL (para condiciones no reductoras se reemplaza con

agua)

Glicerol                            400 µL

H<sub>2</sub>O                                    850 µL

Azul de bromofenol            20 µL

**Técnica de electroforesis**

Las placas deben estar limpias y desengrasadas.

**Gel de corrida o Resolving gel**

Se preparó un gel al 12,5% con las siguientes cantidades:

2,5 mL de Acrilamida-Bis acrilamida 30-8.

1,5 mL de Tris HCl pH 8,8.

1,9 mL de Agua.

4 µL de Temed.

60 µL de SDS 10%.

40 µL de APS.

**Gel concentrador o Staking gel**

Se preparó un gel al 5% con las siguientes cantidades:

0,66 mL de Acrilamida-Bis acrilamida 30-8.

1,25 mL de Tris HCl pH 8,8.

2,97 mL de Agua.

5  $\mu$ L de Temed.

50  $\mu$ L de SDS 10%.

75  $\mu$ L de APS.

### **Preparación de las muestras**

100  $\mu$ L de muestra + 100  $\mu$ L de Buffer de carga.

Las muestras se hierven a baño maría 5 minutos y luego se centrifugan 5 minutos a 10000 RPM. Se usan o se almacenan a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **Electroforesis**

Las muestras se siembran en cantidad de 20-30  $\mu$ L por pocillo.

### **Revelado**

Utilizamos el sistema azul brillante de Coomasie. Se disuelve el colorante en agua: metanol: y ácido acético glacial en una relación 5:5:2. Esta solución cumple la función de fijar las proteínas y teñirlas. Se puede dejar toda la noche y desteñir al día siguiente.

### **Solución decolorante**

Metanol 150 mL, Ácido acético 50 mL y Agua 300 mL. Se sumerge el gel con agitación durante varias horas.

## **ANEXO II. SOLUCIONES UTILIZADAS EN EL TEST DE ELISAI-S y ELISAI-L / MEZCLA DE ANTIBIOTICOS/ MEDIO LÍQUIDO M7H9 SUPLEMENTADO CON YEMA DE HUEVO Y MICOBACTINA J/ MEDIO DE HERROLD.**

### **Preparación de soluciones para el test de ELISAI-S y ELISAI-L.**

Todas las soluciones se preparan con agua tridestilada, las probetas, pipetas, Erlenmeyer y utensilios de vidrios a utilizar deberán estar limpios y secos, libres

de residuos. Al pesar controlar que la balanza este nivelada, y que el Peachimetro este calibrado con los buffers de referencia, controlar pH, en el caso de no ser el correcto desechar y volver a realizar la solución.

**Solución buffer carbonato-bicarbonato (pH: 9,5-9,6).**

**Pesar en balanza de precisión:**

Bicarbonato de sodio		0,015gr.
Carbonato de sodio	0,072 gr.	

Disolver esta cantidad de sales a 50 mL de agua tridestilada.

**Sensibilización de la placa.**

Diluir el antígeno 1:486 en solución buffer carbonato-bicarbonato, homogeneizar y adicionar a la placa 100 µL por pocillo con pipeta multicanal. Una vez cubierta refrigerar en la heladera durante toda la noche.

**Solución de lavado/diluyente (PBS-T)** (solución salina bufferada fosfato 0,01 M más tween 20 al 0,05% V/V) **PH: 7 – 7,2**

**Para 1 L de solución, pesar en balanza de precisión:**

Cloruro de sodio	8,5 gr.	
Fosfato de sodio monobásico		0,32 gr.
Fosfato de sodio dibásico	1,1 gr.	

Añadir 500 µL de tween 20, con micropipeta monocanal, disolver y medir pH. Para conservar dicha solución esterilizar 121°C 20 min.

**Solución de urea (8 Molar)**

Cada 10 mL de agua tridestilada, pesar en balanza de precisión 4,8 gr. de urea.

**Solución buffer de revelado (citrate de sodio/ ácido cítrico PH: 5)**

**Para 25 mL de solución, pesar en balanza de precisión:**

Ácido cítrico	0,24 gr.
Citrato de sodio	0,4-0,5 gr.

Agregar al buffer estos dos reactivos en el momento de revelar.

ABTS 5 mg y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% 9 µL.

### **Descontaminación.**

#### **Mezcla de antibióticos para descontaminación**

Anfotericina B	50 mg
Vancomicina	100 mg
Ácido nalidíxico	100 mg
Medio de caldo cerebro corazón al 1,85%	1000 mL

El caldo se prepara y se esteriliza a 120°C durante 20 minutos. Una vez enfriado se le agregan los antibióticos en cabina de esterilidad. Se fracciona y congela hasta su uso.

#### **Solución decontaminante de cloruro de hexadecilpiridinio (HPC)**

Cloruro de hexadecilpiridinio	9 g
Caldo cerebro corazón	18,5 g
Agua destilada	1000 mL

Disolver con agitador magnético y fraccionar 25 mL en tubos Falcon. Esterilizar en autoclave a 120°C durante 20 minutos. Conservar a temperatura ambiente.

### **Preparación de medios para el cultivo de *Map.***

#### **Preparación de los huevos.**

Los huevos deben ser frescos y si es posible de gallinas que no hayan consumido antibióticos. Lavar con agua y detergente. Dejar secar rociar con alcohol etílico 70°. En la CFL flamearlos suavemente con mechero. Separar la clara de la yema e introducir esta última en un vaso de precipitado estéril, repetir el procedimiento hasta obtener el volumen deseado.

### **Preparación de la solución de verde de Malaquita al 2 %**

Pesar 2 gr. de dicho colorante (forma oxálica) y diluir en 100 mL de H<sub>2</sub>O, fraccionar en tubos con tapa y esterilizar en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

### **Preparación de la micobactina.**

La micobactina se conserva en heladera fraccionada en la cantidad de 2 mg que es suficiente para preparar 1 L de medio de Herrold o 2 L de medio líquido, al momento de su uso disolver en 1 mL de alcohol etílico 96°.

### **Preparación de la mezcla de antibióticos para medio de cultivo.**

Los antibióticos se encuentran fraccionados de acuerdo a la dosis, conservados a -20°C y se resuspenden al momento de su uso. La vancomicina se suspende en 1 mL de agua destilada estéril, mientras que el ácido nalidíxico y la anfotericina se suspenden en alcohol etílico 96°.

### **Medio de cultivo Herrold con micobactina**

Cloruro de sodio	4,5 g
Peptona de carne	9,0 g
Extracto de carne bovina	2,7 g
Piruvato de sodio	4,1 g
Agar	15,3 g
Glicerina	34 mL
Agua destilada	840,9 mL
Yemas de huevo frescas	10 (120 mL)
Verde de Malaquita (2%)	5,1 mL
Micobactina	2 mg

### **Método de preparación:**

Mezclar en agitador magnético todos los componentes (excepto las yemas y el colorante) hasta que se disuelva el agar en un Erlenmeyer con capacidad de 2 L. Medir el pH y, de ser necesario, ajustar a 7,5 con Na (OH) 1N. Esterilizar en autoclave durante 20 minutos a 120°C. Enfriar a 56°C y agregar las yemas y en verde de Malaquita en forma estéril, homogeneizar. Fraccionar en CFL en forma

estéril y dejar que solidifique en pico de flauta. Controlar la esterilidad incubando en estufa a 37°C durante 48 horas.

**Medio líquido Middlebrook 7H9 con Micobactina y yema de huevo (1L).**

**Medio base 3,1 gr, contiene los componentes que se detallan a continuación.**

Amonio sulfato	333 mg.
Fosfato monopotásico	667 mg.
Fosfato disódico	1,7 gr.
Citrato de sodio	67 mg.
Sulfato de magnesio	33 mg.
Cloruro de calcio	0,33 mg.
Sulfato de zinc	0,67 mg.
Sulfato de cobre	0,67 mg.
Ácido L glutámico	333 mg.
Citrato de amonio férrico	27 mg.
Piridoxina	0,67 mg.
Biotina	0,33 mg.

**Enriquecimiento**

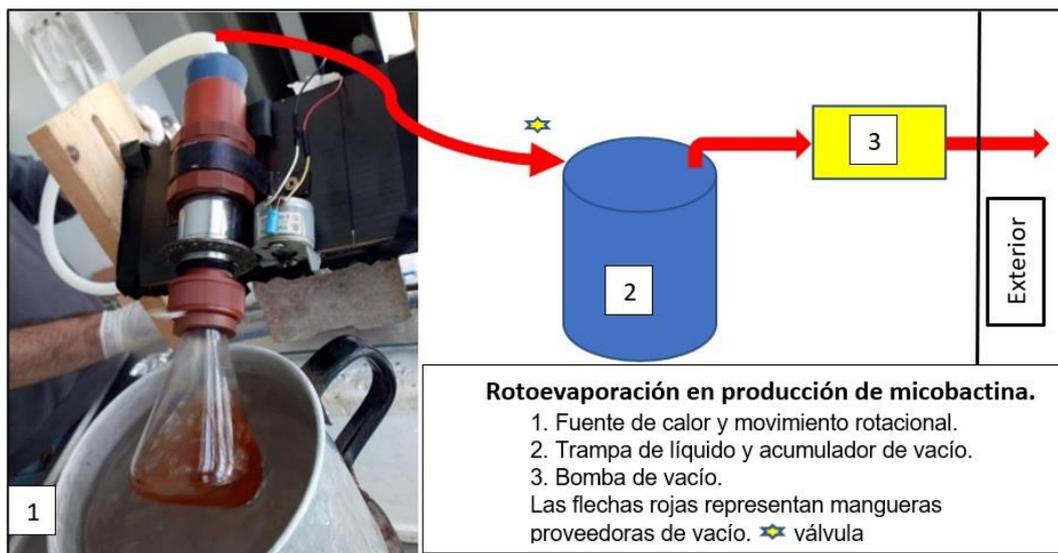
Albumina bovina	1,34 gr.
Casitone	667mg.
Dextrosa	534 mg.
Catalasa	0,8 mg.
Cloruro de sodio	227 mg.
Yema	167 mL.
Micobactina J	1 mg.

**Mezcla de antibióticos**

Anfotericina	50 mg.
Ácido nalidíxico	100 mg.
Vancomicina	100 mg.

### ANEXO III. ROTOEVAPORADOR.

Para realizar la extracción de micobactina se utilizó un rotoevaporador elaborado con caños de PVC, Cuplas, bolilleros entre otros materiales, con la finalidad de evaporar el cloroformo de una forma segura. Se utilizó una fuente de calor, un motor y una bomba de vacío, como se describe en el siguiente esquema.



### ANEXO IV. COMANDOS EMPLEADOS EN R PARA EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

#### Producción y caracterización de antígeno

##### #Introducción de datos#

```
> antigenos<-read.table("clipboard", header= TRUE, sep = "\t", dec = ",")
```

##### #Shapiro test#

```
> shapiro.test(antigenos$pos[antigenos$ag=="WLA CEDIVE"])
```

```
> shapiro.test(antigenos$pos[antigenos$ag=="PPA"])
```

##### #Wilcox test#

```
> wilcox.test(antigenos$pos[antigenos$ag=="WLA CEDIVE"],antigenos$pos[antigenos$ag=="PPA"],paired=TRUE)
```

**#Gráfico boxplot#**

```
>boxplot(pos~ag, data = antígenos, main= "Comparación entre antígenos PPA y
WLA CEDIVE en el ELISAI-S de PTBC", cex.main= 1, notch= TRUE, ylab = "pos",
col= rainbow(ncol(antígenos)))
```

**#Correlación entre antígenos#**

```
>cor.test(corantígenos$poswla,
corantígenos$posppa,alternative="greater",method="pearson",conf.level=0.95)
```

**#Concordancia entre pruebas#**

Se utilizó: [WinEpi: Working IN EPIdemiology](#)

**Análisis ROC.****#Introducción de biblioteca pROC#**

```
>library(pROC)
```

**#Introducción de datos#**

```
>rocantígenos<-read.table("clipboard", header= TRUE, sep = "\t", dec = ",")
```

**#ROC wla#**

```
> wla<-roc(rocantígenos$cultivo, rocantígenos$poswla)
```

**#ROC PPA#**

```
> PPA<-roc(rocantígenos$cultivo, rocantígenos$posppa)
```

**#Comparación de ambas curvas ROC#**

```
> roc.test(wla, PPA)
```

Se describen a continuación las funciones del paquete pROC de R que fueron utilizadas en el apartado 3.2.1.

**#Obtención de ROC, AUC y sus IC#**

```
>porsroc<-roc(rocfin$cult, rocfin$pors)
```

```
>porsroc
```

```
>ci.auc(porsroc)
```

### **#Cálculo de potencia del análisis ROC#**

```
>power.roc.test(porsroc)
```

### **#Cálculos de IC de la Se y Sp#**

```
>ci.sp(porsroc)
```

```
>ci.se(porsroc)
```

### **#Cálculos de puntos de corte y su Se y Sp alta, media y baja#**

```
>ci.thresholds(porsroc)
```

### **#Gráfico de la curva con punto de corte según índice de Youden, y AUC#**

```
>plot(porsroc, main= "ELISAI-S, análisis ROC", xlab= "Especificidad", ylab=
"sensibilidad", print.auc=TRUE, auc.polygon=TRUE, grid=c(0.1, 0.2),
grid.col=c("black", "red"), max.auc.polygon=TRUE, auc.polygon.col="red",
print.thres=TRUE, col= "black")
```

### **#Obtención de tabla de doble entrada para “x” punto de corte en este ejemplo 68,2%#**

```
>table(rocfin$pors>68,2,rocfin$cult)
```

### **#Obtención del punto de corte maximizando Se y Sp mediante el argumento “best”. Arroja como resultado el threshold su Se, Sp, VN, VP, FN, FP, VPP y VPN#**

```
>coords(porsroc,"best",ret=c("threshold","sensitivity","specificity","tp","tn","fn","fp",
"ppv","npv"),as.list=F,drop=F)
```

### **#Sensibilidad y Especificidad para los puntos de corte 55, 65 y 70%#**

```
>coords(porsroc, c(55, 65, 70))
```

### **#Comparacion de dos AUC. En este caso la de los ELISAI-S y en leche##**

```
> roc.test (porsroc, porlroc)
```

## Estadística bayesiana validación diagnóstica

#Comprobación usando el método de Odds o Razón de probabilidades#

### #Datos para modelo#

a = # Enfermos, positivos

b = # Enfermos, negativos

c = # No enfermos, positivos

d = # No enfermos, negativos

### #Totales Parciales#

m1 = (a+b) # Enfermos

m2 = (c+d) # No enfermos

n1 = (a+c) # Positivos

n2 = (b+d) # Negativos

N = (a+b+c+d) # Tamaño muestral (N)

### #Parametros "a priori"#

Se = a/m1 # Sensibilidad

Sp = d/m2 # Especificidad

Pre = m1/N # Prevalencia

### # Razón de verosimilitud#

LRp <- Se / (1-Sp) # LR+

LRn <- (1-Se) / Sp # LR-

### #Odds#

Oapri <- Pre/(1-Pre)

Opostp <- Oapri\*LRp

Opostn <- Oapri\*LRn

### #Valores predictivos posteriores y complementos#

**#Por método de Odds#**

```
VPP<-Opostp/(1+Opostp) # P(E/+)
```

```
FN<-Opostn/(1+Opostn) # P(E/-)
```

```
FP <- (1-VPP) # P(NE/+)
```

```
VPN <- (1-FN) # P(NE/-)
```

**#Prueba de Complementos#**

```
Comple.1<-(VPP+FP)
```

```
Comple.2<-(VPN+FN)
```

**#Tabla 1#**

```
TABLA.1 = data.frame (Oapri,LRp,LRn,Opostp,Opostn)
```

**#Tabla 2#**

```
TABLA.2 = data.frame (Se,Sp,Pre,VPP,FP,VPN,FN)
```

**Análisis de variables y ELISAI-L.**

Se aplicó Kruskal-Wallis y Wilcox para dol y dos en función de los distintos grupos formados para las covariables, litros de leche, días en lactancia y número de lactancia.

**#Introducción de datos#**

```
> variables<-read.table("clipboard",header=TRUE,sep="\t")
```

**## Kruskal-Wallis de densidad óptica en leche en función de los L de leche##**

```
> kruskal.test(dol~quantillts, data=variables)
```

**##Wilcox test##**

```
> pairwise.wilcox.test(variables$dol, variables$quantillts, p.adjust.method = "BH")
```

**#Gráfico boxplot con media#**

```
> ggline(variables, x = "grupdel", y = "dol", add = c("mean_se","boxplot"), color = "blue", order = c("1", "2", "3", "4"), ylab = "densidad óptica en leche", xlab = "días en leche (del)agrupados", main= "ELISAI-L para PTBC en función de los del")
```

Se procedió de igual manera para las variables días en lactancia y número de lactancia.

### **#Introducción de datos para análisis PCA#**

```
> tesispca<-read.table("clipboard",header=TRUE,sep="\t")
```

### **#Apertura biblioteca FactoMineR#**

```
library(FactoMineR)
```

### **#Análisis PCA#**

```
> pcatesis<- PCA(tesispca[,1:4], scale.unit = TRUE, ind.sup = NULL, quanti.sup = NULL, quali.sup = 4,row.w = NULL,col.w = NULL,graph = FALSE,axes = c(1,2))
```

### **#Gráfico bandplot#**

```
>bandplot(tesispca$its,tesispca$porl,sd.col=c("blue","red","black","red","blue"),sd.lty=c(2,1,6,1,2),sd.lwd=c(1,1,2,1,1),pch=1,col="black",cex=0.8,las=1,ylim=c(15,100))
```

### **#Gráfico PCA y generación de elipses de confianza#**

```
> plot.PCA(pcatesis, axes=c(1, 2), choix="ind", habillage=4, cex=0.7)
```

### **#Generación de elipses de confianza#**

```
> concat = cbind.data.frame(tesispca[,4], pcatesis$ind$coord)
```

```
> ellipse.coord = coord.ellipse(concat, bary = TRUE, level.conf = 0.99)
```

```
> plot.PCA(pcatesis, habillage = 4, ellipse = ellipse.coord, cex = 0.5,lwd=3)
```

## **Implementación de ELISAI-L en agrupamiento de muestras individuales**

Los comandos utilizados fueron similares a los del análisis ROC.

### **Análisis ELISAI-LT**

#### **#Introducción de datos#**

```
BTM<-read.table("clipboard", header= TRUE, sep = "\t", dec = ",")
```

#### **#Correlación entre la DOLT y la PA a PTBC obtenida mediante ELISAI-L#**

```
> cor.test(BTM$dots, BTM$pal, alternative="two.sided", method="pearson", conf.level=0.95)
```

### **#Cálculo de potencia#**

```
> library(pwr)
> pwr.r.test(n=nrow(BTM), r=0.8989, sig.level=0.05, power=NULL)
```

### **#Regresión lineal entre DOLT y la PA a PTBC obtenida mediante ELISAI-L#**

```
> lmdots_pal <- lm(dots ~ pal, data=BTM)
> summary(lmdots_pal)
```

### **#anova de la regresión lineal para calcular su potencia#**

```
> anova(lmdots_pal)
> library(pwr)
> pwr.f2.test(u = 1, v = 6, f2 = NULL, sig.level = 0.95, power = NULL)
```

### **#Efecto de la sisa#**

```
> cohen.ES(test = "f2", size = "large")
Conventional effect size from Cohen (1982)
  test = f2
  size = large
  effect.size = 0.35
```

### **#Cálculo de potencia para regresión#**

```
> pwr.f2.test(u = 1, v = 6, f2 = 0.35, sig.level = 0.95, power = NULL)
  power = 0.9876415
```

## **Implementación de *Nocardia* spp. como pre-adsorbente en el ELISAI-S de PTBC**

Los comandos utilizados fueron similares a los del análisis ROC.

### **ELISAI-C de individuos con y sin aislamientos de *Map* en heces.**

Los comandos utilizados fueron similares a los del análisis ROC.

### **Aislamientos de *Map* en leche y su asociación con los diferentes métodos de diagnóstico de PTBC.**

#### **#Comparación de dos proporciones#**

```
> prop.test(propleche$POSITIVOS,propleche$TOTAL,conf.level=0.95)
```

### **#Cálculo de potencia#**

**##h es la magnitud del efecto, necesaria para calcular la potencia##**

```
> h<-2*asin(sqrt(0.4065))-2*asin(sqrt(0.099))
```

```
> library(pwr)
```

```
> pwr.2p2n.test(h=h,n1=91,n2=91,sig.level=0.05,power=NULL)
```

difference of proportion power calculation for binomial distribution (arcsine transformation)

```
h = 0.7425286
```

```
n1 = 91
```

```
n2 = 91
```

```
sig.level = 0.05
```

```
power = 0.99
```

### **#Diferencias entre grupos#**

```
pairwise.prop.test(proplechetotal$POSITIVOS,proplechetotal$TOTAL,conf.level=0.95)
```

### **#Obtención de tabla de doble entrada#**

```
> table(analysisculleche$cultMF., analysisculleche$cultL.)
```

### **#Prueba de Chi<sup>2</sup> con corrección de Yates#**

```
chisq.test(table(analysisculleche$cultMF, analysisculleche$cultL.), correct = T)
```

En los casos donde se encontró asociación entre las variables se estimó el OR y el RR. Utilizando: [WinEpi: Working IN EPIdemiology](#)