



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

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

**“Posibilidades diagnósticas de la PPD Aviar en la Paratuberculosis Bovina en
animales jóvenes”**

AUTORA: ALVARADO PINEDO, María Fiorella.

DIRECTOR: TRAVERÍA, Gabriel Eduardo.

LUGAR DE TRABAJO: Centro de Diagnóstico e Investigaciones Veterinarias (CEDIVE).

Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

MIEMBROS DEL JURADO:

Dra. BERNARDELLI, Amelia.

Dra. GIACOBONI, Gabriela

Dr. SAMARTINO, Luís Ernesto

AÑO: 2015

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de tesis a toda mi familia. A los que están cotidianamente a mi lado y a los que estando alejados, igual están muy presentes en mi corazón. Porque siempre me han acompañado incondicionalmente y me alientan a intentar ser una mejor persona, enseñándome a valorar el esfuerzo constructivo, a mirar con optimismo y esperanza todas las situaciones y a nunca olvidar que siempre es más importante compartir que recibir. Culminar esta tesis es solo una parte del camino de la vida que espero seguir recorriendo junto a ustedes, mis seres muy queridos, mi familia.

“La familia es la única comunidad en la que todo hombre es amado por sí mismo, por lo que es y no por lo que tiene”.

Juan Pablo II

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas a las que agradezco inmensamente por su colaboración en el desarrollo de este plan de tesis. A Gabriel Eduardo Travería por su apoyo, ejemplo y guía incondicional en su rol como director de esta tesis. A todo el personal del Centro de Diagnóstico e Investigaciones Veterinarias (CEDIVE) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, en especial a Jorge Romero, Rodrigo Sanabria, Adrián Di Paolo y Luís María Peralta por toda su gran ayuda en muchas actividades de este trabajo. A María Isabel Romano, Gabriel Costanzo, Andrea Giofrè y Roberto Damián Moyano, investigadores del INTA Castelar, gracias por su cooperación en el procesamiento de algunas muestras de esta investigación, espero continuar trabajando con ustedes en nuevos proyectos.

Gracias a Polychronis Kostoulas por facilitarnos los modelos de análisis de estadística Bayesiana para el estudio de parte de la información de esta tesis, y a María Xose Rodríguez- Alvarez por proporcionarnos un modelo estadístico no paramétrico para trabajar con el programa ROCRegression.

Un especial agradecimiento a Roberto Vaca, Eduardo Espada, Alejandro Vilches y Martín Garriz, quienes facilitaron nuestro trabajo a campo con los bovinos de los establecimientos que administran, su compromiso hizo mucho más sencillo la organización de estas actividades.

Mi sincera gratitud a numerosos alumnos, alumnas, becarios y recién graduados de la carrera de Ciencias Veterinarias que participaron en muchos de los muestreos que realizamos y colaboraron en el análisis de algunas de las muestras, a Emiliano Pomini, Leandro Ríos, Graciela Aizaga, Mariela Scrochi, Lucio Calvet y Mercedes Soriano, seguramente olvidaré mencionar a muchos, espero me perdonen, quiero agradecerles a todos su entusiasmo por el trabajo en equipo y por el valioso tiempo que compartieron con nuestro grupo.

Muchas gracias a todos mis compañeros de la Cátedra de Histología y Embriología de la FCV UNLP por brindarme siempre su colaboración y numerosos consejos, en especial a Claudio Gustavo Barbeito, Alicia Flamini, Norma González, Carolina Zanuzzi y Mónica Diessler, han sido para mí, en muchos momentos de este trabajo de tesis una inspiración y un apoyo invaluable, además de brindarme su reconfortante amistad.

Gracias especiales a Eva, Sandra, Ruth, Paola, Luján y Fabiola, mis “hermanas de la vida”, porque siempre me siento acompañada y querida por todas ustedes y en muchísimos aspectos, han sido un ejemplo para mí de las cosas realmente valiosas de la vida.

Finalmente vuelvo a agradecer a mi familia por su presencia constante y amorosa a lo largo de la realización de este trabajo de tesis, y por compartir la alegría de alcanzar esta meta. Gracias infinitas.

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

- Alvarado Pinedo, M Fiorella.; Carrica Illia, Mariano; Vaca, Roberto; Travería Gabriel. Comparación de la PPD Aviar aplicada en tabla del cuello y pliegue anocaudal en bovinos con paratuberculosis. VI Jornadas Internacionales de Veterinaria Práctica. CD de Trabajos libres área de Microbiología y Enfermedades Infecciosas. (Trabajo con mención especial). Fecha: 14 y 15 de agosto de 2009. Organizado por el Colegio de Veterinarios de la provincia de Buenos Aires. Mar del Plata. Buenos Aires. Argentina.

- Gabriel Costanzo, Fiorella Alvarado Pinedo, Andrea Gioffre, Mariano Carrica Illia, Guillermo Gimanez, Juan Guillermo Cantero, Alicia Arese, Gabriel Travería y María Isabel Romano. Screening of a dairy herd with paratuberculosis: does really exist an accurate technique? Cuarta Reunión de la Sociedad Latinoamericana de Tuberculosis y otras micobacterias (SLAMTB). Organizado por Sociedad Latinoamericana de Tuberculosis. Fecha: del 5 al 8 de octubre de 2009. Rosario. Santa Fe. Argentina.

- Alvarado Pinedo, M. Fiorella; Calvet, Lucio; Soriano, Mercedes; Vaca, Roberto; Moyano, Roberto; Di Paolo, L. Adrián; Travería Gabriel. Potencial diagnóstico de la prueba tuberculínica en dos rodeos lecheros con paratuberculosis bovina. VIII Jornadas Internacionales de Veterinaria Práctica. Fecha: 9 y 10 de agosto de 2013. Organizado por el Colegio de Veterinarios de la provincia de Buenos Aires. Mar del Plata. Buenos Aires. Argentina.

- Roberto Damián Moyano, Luis Peralta, Fiorella Alvarado Pinedo, Marina Forrellard, Gabriel Travería, María Isabel Romano. Evaluación de nuevas técnicas comparadas con el diagnóstico convencional de la enfermedad de Johne generada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). VII Reunión de la Sociedad Latinoamericana de tuberculosis y otras micobacterias (SLAMTB) Fecha: 14, 15, 16 y 17 de septiembre de 2014. Brasil.

- MF. Alvarado Pinedo, RD. Moyano, LM. Peralta, LA. Di Paolo, MA. Romero, MI. Romano, GE. Travería. Plan de trabajo con aplicaciones repetidas de PPD Aviar para mejorar el diagnóstico temprano de la paratuberculosis bovina. XX Reunión Científico Técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico (AAVLD). Fecha: 27, 28 y 29 de Noviembre de 2014. Tucumán, Argentina. Libro de Resúmenes ISBN 978-950-554-903-0 Página 10.

ÍNDICE / TABLA DE CONTENIDOS.

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	3
A) RESUMEN	5
B) PALABRAS CLAVE:	5
D) RESUMEN EN IDIOMA INGLÉS	6
E) KEYWORDS:	6
1. INTRODUCCIÓN.....	7
1.1. Generalidades de la enfermedad	8
1.2. Características generales del agente.....	9
1.3. La enfermedad en los rumiantes	12
1.4. La enfermedad en humanos	17
1.5. Métodos diagnósticos.....	19
1.5.1. Primer estadio (infección silente) y segundo estadio (infección subclínica)	19
1.5.2. Tercer estadio (enfermedad clínica incipiente) y cuarto estadio (enfermedad clínica avanzada).....	22
1.6. Situación de la enfermedad en América Latina y en la Argentina.....	35
1.7. Tratamiento y control de la paratuberculosis	36
1.8. Características de la prueba tuberculínica y de la PPD Aviar.....	38
1.8.1. La PPD Aviar	38
1.8.2. Indicaciones de la aplicación de la PPD en los bovinos	39
1.8.3. Efectos de la aplicación intradérmica de la PPD	43
1.9. Objetivos del presente plan de tesis	46
1.9.1. Objetivos generales	47
1.9.2. Objetivos particulares	47
2. MATERIALES Y MÉTODOS	48
2.1. Animales	49
2.2. Tuberculinización con la PPD Aviar.....	51
2.3. Cultivo bacteriológico.....	55
2.4. Bacterioscopía	57
2.5. Pruebas serológicas	58
2.5.1. ELISA.	58
2.5.2. AGID.....	60
2.6. Pruebas para medir proteínas de fase aguda	61
2.6.1. Método colorimétrico para el dosaje de haptoglobina bovina	62
2.6.2. Determinación de fibrinógeno con el uso de refractómetro.....	63
2.7. Producción de una masa adecuada de Mycobacterium avium subespecie avium para la elaboración de reactivos.....	65
2.8. Análisis estadístico.....	66
2.8.1. Curvas de ROC.	66
2.8.2. Prueba de χ^2 (X^2).....	70
2.8.3. Prueba de T pareada.....	70
2.8.4. Análisis bayesiano.....	71
3. RESULTADOS.....	81
3.1. Formación de los lotes de animales a estudiar	82
3.2. Estimación final de las prevalencias reales a partir de los cultivos positivos de Map..	88

3.3. Primeros ensayos con la PPD Aviar: edades y diferencias en los pliegues cutáneos en los animales reactantes	89
3.4. Efecto del uso de diferentes vías de aplicación de PPD Aviar	92
3.5. Estudio de la respuesta local utilizando diferentes concentraciones de PPD Aviar	94
3.6. Estudio de la presencia de Map en la materia fecal de los animales reactores a la PPD Aviar.....	97
3.7. Estudio del efecto de covariables en la capacidad operativa de la prueba intradérmica con la PPD Aviar.....	99
3.7.1. Influencia del número de aplicaciones y del tiempo de intervalo entre cada aplicación de la PPD Aviar	100
3.7.2. Influencia de la edad del animal y el estadio de la enfermedad al momento de la aplicación de la PPD Aviar	106
3.7.4. Comparación de las covariables: número de aplicaciones, intervalo entre aplicaciones, edad de aplicación y prevalencia en los rodeos.....	111
3.8. Estudio de la asociación del pedigree en los resultados obtenidos a las pruebas que determinan la infección con Map.....	113
3.9. Estudio de la respuesta sistémica a la aplicación de la PPD Aviar.....	115
3.9.1. Niveles de Inmunoglobulinas G.....	115
3.9.2. Niveles de proteínas totales, de fibrinógeno y de haptoglobina plasmática	117
4. DISCUSIÓN.....	120
5. CONCLUSIONES	134
6. BIBLIOGRAFÍA	136
ANEXO I	158
ANEXO II.....	160
ANEXO III.....	162
ANEXO IV	165
ANEXO V	166
ANEXO VI	167
ANEXO VII	169

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ABTS: 2, 2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate).

ADN: ácido desoxirribunucleico.

AGID: inmunodifusión en gel de agar.

AUC: área bajo la curva.

BAAR: bacilos ácido alcohol resistentes.

CD4: "Cluster of Differentiation 4", Grupo de diferenciación 4.

CD8: "Cluster of Differentiation 8", Grupo de Diferenciación 8.

CO²: dióxido de carbono.

CHP: cloruro de hexadecilpiridinio.

DS: desvío estandar.

ELISA: ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima.

FC: fijación del complemento.

°C: grados centígrados.

IC 95%: intervalo de confianza del 95%.

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

Ig: inmunoglobulinas.

IL: interleuquinas.

IFN- γ : interferón gamma.

IHQ: inmunohistoquímica.

IS: secuencia de inserción.

LAM: lipoarabinomananos.

LAMP: amplificación isotérmica mediada por un bucle.

LR+: Likelihood Ratio positivo o razón de verosimilitud positiva.

LR-: Likelihood Ratio negativo o razón de verosimilitud negativa.

Map: *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*.

M.: *Mycobacterium*.

μ L: microlitros.

mg/ dL: miligramos por decilitro.

mg/ mL: miligramos por mililitro.

mm: milímetros.

NK: natural killer.

O²: oxígeno.

PACI: pliegue anocaudal interno.

PBS: solución fisiológica bufferada.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PFA: proteínas de fase aguda.

PPD: derivado proteico purificado.

RFLP: polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción.

ROC: características operativas del receptor.

r.p.m: revoluciones por minuto.

TC: tabla del cuello.

Th: linfocitos helper.

UFC: unidad formadora de colonia.

UI: unidades internacionales.

VNTR: número variable de repeticiones en tándem.

VPP: valor predictivo positivo.

VPN: valor predictivo negativo.

A) RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue establecer un protocolo de aplicaciones de PPD Aviar que permita el diagnóstico temprano de la paratuberculosis bovina. Con este propósito se estudiaron animales de dos rodeos lecheros con una prevalencia real de 30% y 7%, y de un rodeo de cría negativo.

No se encontraron diferencias significativas, con la prueba de ROC ($P=0,14$) entre la aplicación intradérmica en la tabla del cuello (TC) y el pliegue anocaudal interno (PACI), aunque la TC detectó mayor número de reactivos. Al analizar el uso de distintas concentraciones de PPD Aviar (0,5 mg/mL y 2 mg/mL) con la prueba de diferencia de medias Bayesianas se encontraron diferencias en el tamaño de los pliegues cutáneos, especialmente al aplicar 2 mg/mL ($P=0,0031$); sin embargo, con la prueba de ROC no existieron diferencias significativas ($P=0,931$) con un AUC de 0,718 y 0,719 para cada concentración. Además, con el análisis Bayesiano de modelos latentes, se definió al punto de corte óptimo de la prueba con una diferencia en los pliegues cutáneos > 0 mm. La prueba de ROC determinó una sensibilidad del 69% y una especificidad del 86,2%. Con estadística Bayesiana se calculó un VPP de 42,5%, un VPN de 91,6%, un LR+ de 3,3 y el LR- de 0,4. Con ROCRegression se estableció que es recomendable realizar entre 3 y 5 aplicaciones de tuberculina aviar, con un intervalo de tiempo entre aplicaciones no mayor a 3 meses para detectar al mayor número de enfermos con infección silente y subclínica.

Algunos animales infectados presentaron periodos de inmunidad celular y humoral superpuestos con la liberación de Map detectables al cultivo. Se observó en pocos casos, que las PFA, después de la aplicación intradérmica de la PPD aviar, poseían niveles de concentración levemente elevados, pero de corta duración.

B) PALABRAS CLAVE: Paratuberculosis, diagnóstico, tuberculina aviar, bovinos jóvenes.

C) TÍTULO EN IDIOMA INGLÉS: The diagnostic possibilities of bovine paratuberculosis using avian PPD in young animals

D) RESUMEN EN IDIOMA INGLÉS

The objective of this work was to lay down a protocol for Avian PPD applications that allow early diagnosis of bovine paratuberculosis. For this purpose two positives dairy herds (with a real prevalence of 30% and 7%), and one negative beef herd were studied.

No significant differences were found, with ROC ($P= 0,14$) between cervical tuberculin skin test (CTST) and caudal fold tuberculin skin test (CFTST), although CTST detected more reactants. Bayesian approach found differences ($P= 0,0031$) between the means of two different concentrations of Avian PPD (0,5mg/mL and 2 mg/mL), showing higher skin fold differences with 2 mg/mL, however with ROC no differences were evident ($P= 0,931$) between both concentration $AUC= 0,718$ and $AUC= 0,719$. With bayesian latent model the optimal cut off was set at $>0\text{mm}$. The ROC test estimate a sensitivity of 69% and a specificity of 86,2%. Bayesian inference calculate 42,5% for positive predictive value (PPV), 91,6% negative predictive value (NPV), 3,3 for positive likelihood ratio (LR+) and 0,4 negative likelihood ratio (LR-). ROCRegression recommends 3 and 5 Avian skin tests with an elapsed time not superior to 3 months to detect the higher number of subclinical diseased animals.

There were also found some infected animals with overlapping humoral and cellular immunity shedding Map detectable in the culture. In some animals it was found a slight raise on acute phase proteins levels after Avian skin test, with short duration

E) KEYWORDS: Paratuberculosis, diagnosis, avian tuberculin, cattle.

1. Introducción

*"Los intelectuales resuelven los problemas;
los genios los previenen"*
Albert Einstein



En este apartado se presentarán las generalidades de la paratuberculosis abarcando las características más relevantes del agente etiológico, las lesiones que produce, el tratamiento, profilaxis y el diagnóstico, con énfasis en la importancia del uso potencial de la tuberculina Aviar como método diagnóstico precoz; finalmente se presentan los objetivos planteados en esta investigación.

1.1. Generalidades de la enfermedad

La paratuberculosis, también conocida como enfermedad de Johne, es una enfermedad crónica que afecta principalmente a los rumiantes domésticos (vaca, oveja, cabra, camélidos y búfalos) y otros no domésticos como el ciervo. Está caracterizada por ocasionar una ileocolitis granulomatosa difusa con compromiso de los ganglios y vasos linfáticos asociados al colon y al íleon (Chiodini y col., 1984).

También se ha descrito en otras especies como caballos, cerdos, mulas, perros, pollos y primates (Hermon-Taylor y El-Zaatari, 2004; Committee on Diagnosis and Control of Johne's Disease, 2003)

En los bovinos se caracteriza por producir baja de la producción láctea, mala condición corporal y diarrea intermitente. No se puede tratar con quimioterápicos y una vez que se presenta la diarrea en forma continua los animales mueren emaciados en lapso de meses. Se distingue de otros desórdenes intestinales por la ausencia de signos clínicos generales de enfermedad, los animales infectados conservan el buen apetito se encuentran alertas y no presentan fiebre, sin embargo se observa adelgazamiento importante y edema mandibular (Clarke, 1994). Es producida por el *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (Map), también conocido como bacilo de Johne.

Esta enfermedad tiene distribución mundial, fue descrita por primera vez en Alemania en 1895 por Johne y Frothingham (Valentin-Weigand y Goethe, 1999). En Brasil hay pocos informes de la enfermedad, la cual fue descrita en 1915 por primera vez. (Lilenbaum y col.,

2007). En 1932 Rosenbusch describe la presencia de paratuberculosis por primera vez en la Argentina, (Rosenbusch, 1937). Los datos de la serología por la prueba de ELISA, demostraron una seroprevalencia de 50% de establecimientos afectados en la provincia de Buenos Aires (Moreira y col.; 1994; Paolicchi y col., 2002).

1.2. Características generales del agente

El Map pertenece al género *Mycobacterium* que en la actualidad presenta 169 especies y 13 subespecies descritas, las mismas se mencionan en la lista de nombres procariotas con base en la nomenclatura (*List of prokaryotic names with standing in nomenclature*) de J. P. Euzéby's (<http://www.bacterio.net/mycobacterium.html>).

Los requisitos mínimos necesarios para la inclusión de una especie dentro de éste género son la ácido-alcohol resistencia, la presencia de ácidos micólicos con 60-90 átomos de carbono de longitud y un 61-71% de GC en su genoma (Lévy-Frebault y Portaels, 1992).

Otra característica a considerar en la clasificación es el tiempo requerido para la formación de colonias visibles en medio sólido. Así, los miembros del género se clasifican comúnmente en dos grandes grupos: micobacterias de “crecimiento rápido” y de “crecimiento lento”. Como excepción a estos grupos se debe mencionar al *Mycobacterium leprae* que no es cultivable. En el caso de las de rápido crecimiento, la aparición de colonias visibles se produce en un período inferior a siete días mientras que las de lento crecimiento, presentan desarrollo posterior a los siete días de cultivo.

A su vez, las especies de “crecimiento lento” se han subdividido en tres grupos diferentes en base a la producción de pigmentación visible (Timpe y Runyon, 1954): fotocromógenas (Grupo I de Runyon), escotocromógenas (Grupo II de Runyon) y no fotocromógenas (Grupo III de Runyon). Esta clasificación no tiene validez taxonómica pero sí clínica, ya que las especies de crecimiento lento son generalmente patógenas para los animales y el hombre (Tabla 1).

Otra manera de agrupar a la micobacterias, es de acuerdo a si pueden o no, producir tuberculosis. Se hace referencia al complejo *Mycobacterium tuberculosis*, estando incluidas en este grupo el *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae*; *M. canetti*, *M. bovis* cepa BCG, *M. mungi* y *M. pinnipedii*. El otro grupo es el complejo *Mycobacterium avium*, integrado por las siguientes subespecies: *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *hominissuis*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* y *M. avium* subsp. *sylvaticum*. Las micobacterias de este complejo se encuentran en el medio ambiente y son potencialmente patógenos para los animales y el hombre.

Existen otras micobacterias que son consideradas saprófitas como el *M. flavum*, *M. fortuitum*, *M. smegmatis*, *M. vaccae*, entre otras, que son raramente patógenas.

Tabla 1. Principales grupos de micobacterias agrupadas según el criterio de la velocidad de crecimiento y de la producción de pigmento (adaptado de Runyon, 1959 y de Bernardelli, 2007).

Velocidad de crecimiento	Grupo de Runyon	Ejemplos de especies de micobacterias
Crecimiento lento (más de 7 días)	Grupo I. Fotocromógenas	<i>M. asiaticum</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. marinum</i> , <i>M. simiae</i>
	Grupo II. Escotocromógenas	<i>M. flavescens</i> , <i>M. gordonae</i> , <i>M. scrofulaceum</i> , <i>M. szulgai</i>
	Grupo III. No cromógenas	<i>M. avium</i> , <i>M. avium</i> subespecie <i>paratuberculosis</i> , <i>M. bovis</i> , <i>M. gastri</i> , <i>M. haemophilum</i> , <i>M. intracellulare</i> , <i>M. malmoense</i> , <i>M. terrae</i> , <i>M. triviale</i> , <i>M. tuberculosis</i> , <i>M. ulcerans</i> , <i>M. xenopi</i>
Crecimiento rápido (menos de 7 días)	Grupo IV. No cromógenas	<i>M. abscessus</i> , <i>M. chelonae</i> , <i>M. fortuitum</i> , <i>M. goodii</i> , <i>M. immunogenun</i> , <i>M. mucogenicum</i> , <i>M. peregrinum</i> , <i>M. phlei</i> , <i>M. senegalense</i> , <i>M. septicum</i> , <i>M. smegmatis</i> , <i>M. wolinskyi</i>

La mayoría de las micobacterias son patógenos intracelulares de crecimiento lento, poseen la capacidad de sobrevivir en los macrófagos de los hospedadores y debido a la presencia en su pared de ácidos micólicos hidrofóbicos, son bacilos ácido alcohol resistente. Este componente es específico de la pared bacteriana de las micobacterias, los lípidos llegan a conformar el 50% de su peso seco. El espesor de la pared por un lado compromete el ingreso de los nutrientes y por otro, le otorga resistencia a la degradación de las enzimas

lisosomales de los macrófagos. Los ácidos micólicos, los lipoarabinomananos (LAM) y los lípidos acilados se encuentran en la parte exterior de la pared celular. Internamente se encuentran péptidoglicanos, arabinogalactanos y los manósidos de fosfatidil inositol los cuales juntamente con los lipomananos son los precursores de LAM. Los LAM poseen biomoléculas que contienen manosa formando los LAM-manosa o arabinomananos constituyendo LAM-arabinomananos. La manosa es una molécula característica presente en la mayoría de las micobacterias patógenas. Los mananos y los arabinomananos se encuentran en la parte más externa de las micobacterias (Hett y Rubin, 2008; Thirunavukkarasu y col., 2014). Un dibujo esquemático de la estructura de la pared micobacteriana se muestra en la Figura 1.

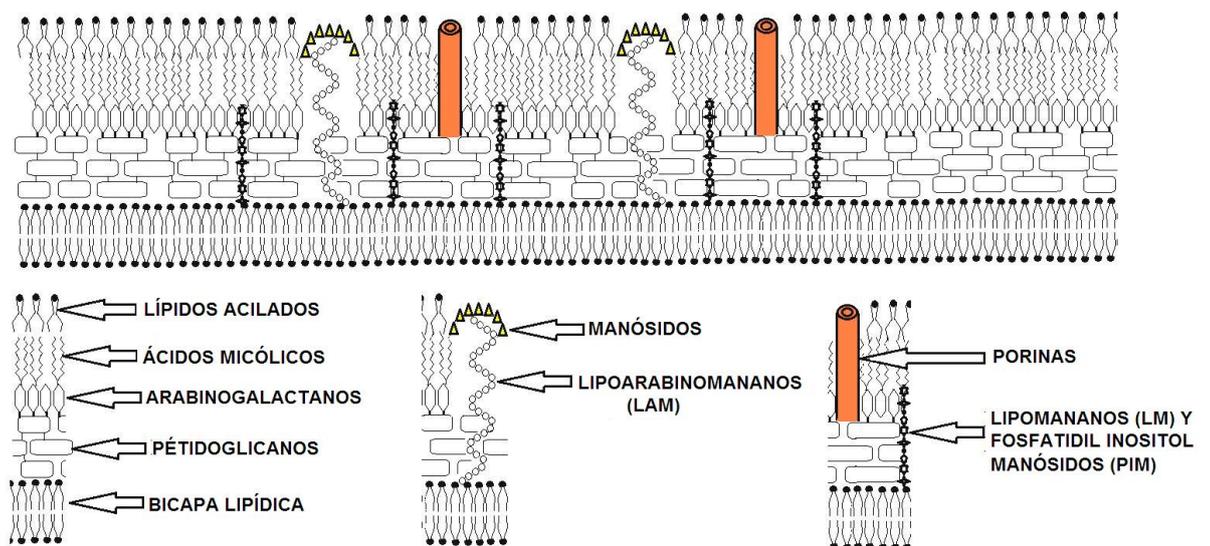


Figura 1. Esquema de la pared micobacteriana del *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*. Arriba se observa como se disponen las biomoléculas estructurales en la pared y abajo se encuentran las referencias de esos componentes.

El Map es un patógeno intracelular facultativo, bacilo ácido alcohol resistente, Gram positivo, aerobio y que, como otras micobacterias, no presenta esporos, cápsula ni toxinas, y se diferencia por depender de la micobactina, un agente sideróforo quelante del hierro para su crecimiento *in vitro*. La temperatura óptima de crecimiento es 37°C. Con un tiempo de generación mayor a 20 horas, es una bacteria de crecimiento lento que requiere varias semanas de incubación antes de que sus colonias sean detectables en los medios de

cultivo, (Chiodini y col., 1984; Chacón y col., 2004) y se suele esperar 6 meses para considerar un cultivo negativo. Se lo puede cultivar en los medios de Löwenstein-Jensen y Herrold con el agregado de micobactina (Snow, 1970; Bernardelli, 2000).

Bioquímicamente es relativamente inactivo y la identificación se basa: en el crecimiento lento, la presencia de acúmulos de bacilos positivos a la coloración de Ziehl Neelsen, la dependencia por la micobactina y la detección de la secuencia de inserción específicas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Bernardelli, 2000; Englund y col., 1999; Stabel, 1997).

La sobrevivencia que presenta el Map en el medio ambiente es variable, depende de diversos factores, se favorece por el pH ácido, la presencia de hierro y de materia orgánica en el suelo; en estas condiciones y al abrigo de los rayos solares, puede llegar a subsistir por un período de 1 año o más en las heces, en el agua de los canales, en las pasturas y en los silos. También se reconoce una presentación durmiente, caracterizada por una forma de resistencia de las bacterias no esporuladas, en donde en 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).

1.3. La enfermedad en los rumiantes

Los rodeos se infectan al ingresar animales enfermos y suelen pasar años hasta que se reconoce la presencia de la enfermedad. La vía de ingreso es fundamentalmente fecal-oral (Whitlock y Buergelt, 1996; Clarke, 1997). Los vacunos se infectan con mayor facilidad cuando son terneros, ya sea por contacto directo con las heces infecciosas en el parto, o al ingerir calostro o leche contaminados provenientes de un animal enfermo (Clarke, 1997; OIE, 2014). Los animales suelen infectarse a partir de las primeras semanas de vida, momento en el que poseen la mayor susceptibilidad.

El período de incubación es variable, pudiendo oscilar de 2 a 8 años, este tiempo depende de la edad inicial de exposición, de la dosis infectiva y del estado general del animal, de manera tal que a mayor dosis infectiva y a menor edad al momento del contacto, el período de tiempo se acorta; y a menor carga bacteriana y a mayor edad, el período se alarga. (Körmendy, 1988). Las micobacterias ingeridas que alcanzan la luz intestinal son captadas por las células M y los enterocitos, siendo posteriormente fagocitados por los macrófagos de la submucosa (Momotani y col., 1988; Sigurðardóttir y col., 2004). El Map sobrevive dentro de los macrófagos mediante la inhibición de la maduración del fagosoma (Cheville y col., 2001; Woo y Czuprynski, 2008). Diversos estudios demostraron que en etapas tempranas de la infección existe una respuesta inmune mediada por células (tipo Th1) con gran expresión de interferón gamma, el cual promueve la lisis de micobacterias en el interior de los macrófagos; en este estadio las lesiones son leves y se las denomina lesiones paucibacilares (Begg y col., 2011; Stabel, 2000; Hostetter y col., 2002; Zurbrick y col., 1988). En etapas posteriores la respuesta inmune es predominantemente Th2 que se caracteriza por la producción de inmunoglobulinas G1 específicas contra Map, esta producción es promovida por la liberación de interleuquinas 4 o 10 por parte de los linfocitos T CD4; en este estadio es característico la presencia de lesiones multibacilares (Stabel, 2000). El cambio de la respuesta Th1 a Th2 en la patogenia de la paratuberculosis ha sido muy estudiado y en investigaciones recientes se postula que dicho cambio puede ser consecuencia de la acumulación a nivel extracelular de bacterias de larga vida, como las micobacterias (Magombedze y col., 2014)

Desde el punto de vista de las lesiones histopatológicas, se pueden categorizar de acuerdo a la presencia de granulomas y su localización a nivel intestinal, intensidad y distribución de las lesiones, tipos celulares presentes en el infiltrado inflamatorio y la presencia de micobacterias. Se describen *lesiones focales* con granulomas pequeños y bien delimitados, hay macrófagos (de 5 a 30), escasos linfocitos y células gigantes multinucleadas tipo Langhans, en la periferia de los granulomas no se observa tejido fibroso

ni necrosis, el número de BAAR es escaso; estas lesiones pueden aparecer preferentemente en la pared intestinal ileal, válvula íleocecal o en los linfonodos regionales. Se pueden encontrar *lesiones multifocales* que pueden estar en el tejido linfoide o en la lámina propia intestinal, se tratan de pequeños granulomas o células gigantes tipo Langhans rodeados por un ligero infiltrado de linfocitos y células plasmáticas en el eje de las vellosidades sin modificar la arquitectura normal del intestino, la presencia de BAAR es moderada. En las enteritis granulomatosas difusas severas se describen *lesiones difusas* en varias áreas intestinales causando un marcado engrosamiento de la pared; estas lesiones a su vez pueden ser de tres tipos, *difusas multibacilares* cuando presentan infiltrados difusos de macrófagos con citoplasma espumoso y células epitelioides, las vellosidades intestinales frecuentemente se fusionan y las glándulas se encuentran muy separadas por la presencia del infiltrado y en sus luces pueden observarse BAAR, los vasos quilíferos se encuentran dilatados y contienen macrófagos con BAAR, la submucosa y la zona más interna de la túnica muscular también puede verse afectada, la serosa puede presentar lesión en relación a los vasos linfáticos, en todos los casos no se observa necrosis. Existen *lesiones difusas linfocíticas (paucibacilares)* en donde los linfocitos son las células predominantes que infiltran la lámina propia del intestino, hay pocos macrófagos y células gigantes; ocasionalmente se observan granulomas entre los linfocitos, el compromiso de la submucosa y serosa es menor, con presencia de células gigantes aisladas o pequeños granulomas. Finalmente se mencionan *lesiones difusas intermedias* en enteritis granulomatosas difusas donde se observan pequeños granulomas aislados formados por abundantes linfocitos, células plasmáticas, células gigantes y macrófagos, este infiltrado puede deformar las vellosidades y separar las glándulas intestinales (González y col., 2005).

Por lo tanto, durante el período de incubación se desarrollan respuestas inmunes innatas y adaptativas, estas últimas al comienzo serán celulares y luego humorales, en el transcurso de la enfermedad se produce una ileocolitis granulomatosa que culminará con la muerte del animal (Clarke, 1994).

De acuerdo a los signos clínicos, la diseminación de la bacteria por la materia fecal y la respuesta inmunológica, los animales afectados pueden ser categorizados en 4 grupos:

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

-En el segundo estadio (infección subclínica) el animal podría diseminar escaso número de bacterias que están por debajo del límite de detección del cultivo, no presenta signos clínicos e inmunológicamente se puede detectar mediante el estudio de la inmunidad mediada por células.

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

-El cuarto estadio (enfermedad clínica avanzada) se caracteriza por la presencia de diarrea acuosa, emaciación y edema submandibular. Los animales eliminan abundante cantidad de micobacterias y generalmente tienen elevada cantidad de anticuerpos y escasa o nula respuesta celular. (Whitlock y Buergelt, 1996)

Por cada animal que se detecta con manifestación clínica avanzada debemos suponer la presencia de 1 a 2 con enfermedad clínica incipiente, de 4 a 8 animales subclínicos y de 10 a 14 con infección silente; de esta manera se llega a tener un total de 16 a 25 animales enfermos por cada animal con enfermedad clínica avanzada (Whitlock y Buergelt, 1996; Sweeney, 1996).

El desarrollo de la respuesta inmune que se presenta en un animal enfermo de paratuberculosis se muestra en la Figura 2. La elección de los métodos diagnósticos debería basarse en esta respuesta para aumentar las posibilidades de controlar la presencia de esta enfermedad en el rodeo.

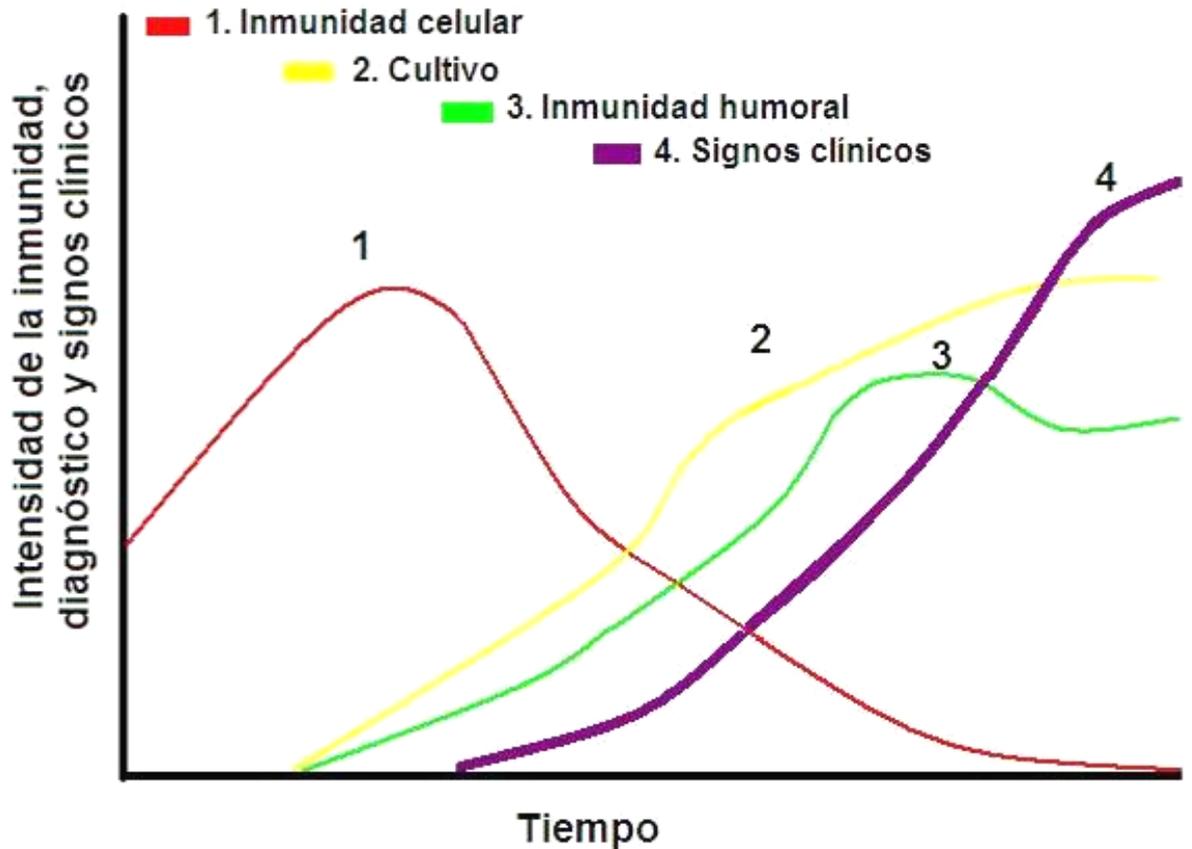


Figura 2: Progresión de la inmunidad celular, humoral, presencia de signos clínicos y utilización del cultivo en la paratuberculosis. Adaptado de Chiodini (Ruminant paratuberculosis (Johne's disease) the current status and future prospects. Cornell Vet 1984).

Se describe en relación a esta enfermedad la posibilidad de la existencia de animales súper-eliminadores de micobacterias, estos animales eliminan más de 10.000 bacterias por gramo de materia fecal. El fenómeno de súper eliminadores se menciona en otras enfermedades bacterianas como la *Escherichia coli* verotoxigénica H7 O157 y virales como SIDA, SARS (Stein, 2011).

Los factores que se combinan para que un organismo enfermo se convierta en súper eliminador son variados, se mencionan las infecciones intercurrentes, la genética del hospedador y del germen. En un rodeo con paratuberculosis del 2 al 20% de los cultivos positivos corresponden a animales súper-eliminadores. En esta enfermedad los super-eliminadores se dan como consecuencia del progreso natural de la enfermedad, cualquier

animal que elimina micobacterias puede convertirse con el tiempo en súper-eliminador si no se elimina del rodeo (Whitlock y col., 2005).

Algunos investigadores han postulado que existe un fenómeno conocido como “pasaje” que sugiere que en algunos bovinos adultos es probable que se elimine Map por las heces durante 1 a 7 días después de la ingesta, estas bacterias no colonizarían la mucosa gastrointestinal y serían responsable de aislamientos positivos en materia fecal clasificados como eliminadores de escasa cantidad de micobacterias en rodeos muy infectados. Estos animales serían eliminadores pasivos de micobacterias en la materia fecal. Estas micobacterias transitan por el tracto digestivo y se aíslan en los cultivos de bovinos sanos como si fueran enfermos eliminadores (Sweeney y col., 1992). El número de estos animales depende de la presencia de animales súper-eliminadores. La cantidad de materia fecal que necesitaría ingerir un adulto para convertirse en un eliminador pasivo sería de aproximadamente 1 gramo de materia fecal con una concentración de 3×10^6 UFC/gr. Para diferenciar un eliminador pasivo de un activo, el pasivo deja de eliminar a los 14 días de detectado el cultivo, en cambio el activo continúa eliminando en el tiempo (Hines y col., 2007). Un animal súper-eliminador elimina al medio ambiente más bacterias que 2.000 eliminadores moderados y más que 20.000 eliminadores escasos

Sin embargo, algunos autores sugieren que el fenómeno de pasaje que se describe en los eliminadores pasivos, podría ser poco factible ya que consideran difícil que un número suficiente de bacterias logre atravesar todo el complejo sistema digestivo de los rumiantes (rumen, redecilla, librillo, abomaso, intestino delgado y grueso) sin ser degradadas (Gilardoni y col., 2012).

1.4. La enfermedad en humanos

Probablemente la paratuberculosis tiene su correlato en los humanos con la enfermedad de Crohn (Chiodini y col., 1984; Hermon-Taylor y Bull, 2002), un padecimiento

muy similar desde el punto de vista patológico y sintomático. La posible asociación entre Map y esta enfermedad fue sugerida desde 1913, en la actualidad los trabajos de investigación ponderan esta asociación mediante la detección de Map a partir de biopsias intestinales o linfonódulos por la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el cultivo y aislamiento de micobacterias, la seroreactividad para antígenos de Map y por la remisión de la enfermedad tras antibiótico terapia específica en estos pacientes (Greenstein, 2003)

Si bien esta enfermedad no es considerada una zoonosis, las evidencias sobre su etiología señalan al Map como el agente causal (Chiodini y col., 1984; Lisby y col., 1994; Hermon-Taylor, 2000; Hermon-Taylor y Bull, 2002; Chiodini y col., 1984) siendo la ingestión de leche contaminada una de las principales vías de ingreso (Chiodini R y van Kruiningen, 1985; Sweeney y col., 1992). Aunque algunas investigaciones sugieren que Map es sensible a la pasteurización (Stabel y col., 2001) muchos autores describen una mayor resistencia del Map a la pasteurización a 72°C durante 15 segundos, condiciones bajo las cuales el *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) y el *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) no logran sobrevivir (Nauta M y Van der Giessen, 1998; Chiodini y Hermon-Taylor, 1993). Resultados de estudios realizados en nuestro país, relacionados con intentos de aislamiento de Map en diferentes alimentos, se presentarán en el apartado “Situación de la enfermedad en América Latina y en la Argentina”.

También se menciona una posible asociación etiológica de Map con el síndrome de Melkersson-Rosenthal, producido por la parálisis del nervio facial con granulomas caseosos en la región facial y oral. La Tiroiditis de Hashimoto, la diabetes tipo 1 en donde se generan linfocitos T autoinmunes contra las células beta productoras de insulina de los islotes pancreáticos, la esclerosis múltiple (una enfermedad neurodegenerativa con desmielinización crónica del sistema nervioso central), la sarcoidosis (una enfermedad granulomatosa sistémica de carácter autoinmune) y el síndrome de Blau (una forma de sarcoidosis juvenil) son enfermedades autoinmunes en donde la patogenia se podría

relacionar con la expresión por parte de los patógenos (en este caso Map) de proteínas similares a ciertas proteínas humanas (mimetismo molecular) desencadenando una reactividad inmune cruzada y como consecuencia enfermedades autoinmunes. Las proteínas micobacterianas responsables del mimetismo molecular serían las proteínas de choque térmico HSP65 (Dow, 2012; Liverani y col., 2014).

1.5. Métodos diagnósticos

Las pruebas diagnósticas que se emplean en la actualidad están dirigidas a la detección de Map de forma directa, o a la detección de la respuesta inmune del hospedador. Por lo tanto, para el diagnóstico de la paratuberculosis se utilizan distintas técnicas cuya aplicación dependerá del estadio clínico de la enfermedad. Aunque existen numerosas opciones, las características de la patogenia de la enfermedad hacen que sea muy limitada la cantidad de pruebas diagnósticas útiles en las etapas tempranas de la infección, y múltiples cuando ha transcurrido mucho tiempo de la enfermedad. Además, la mayoría de las técnicas diagnósticas disponibles son costosas y, en algunos casos, de cierta complejidad, siendo limitados los centros diagnósticos que realizan dichas pruebas; todo esto limita la accesibilidad por parte del médico veterinario que desee implementar medidas de control predial.

A continuación se mencionan los métodos diagnósticos disponibles según el momento o estadio que cursa la enfermedad en los bovinos.

1.5.1. Primer estadio (infección silente) y segundo estadio (infección subclínica)

En estos estadios el diagnóstico es difícil y solo se podrían utilizar técnicas que permitan detectar la inmunidad celular, entre ellas la prueba tuberculínica intradérmica *in vivo* y la prueba de interferón gamma *in vitro*. La inmunidad mediada por células precede a la producción de anticuerpos detectables y por lo general, los animales que se encuentran

subclínicamente infectados con Map no reaccionan a las pruebas serológicas pero si pueden reaccionar a las técnicas que miden la inmunidad celular (Körmendy, 1988; Sikes y Groth, 1950; OIE, 2008). Estas pruebas miden la hipersensibilidad de tipo retardada que es consecuencia de la inmunidad celular (Pennimpe y col., 2004).

- La prueba tuberculínica intradérmica es también conocida como prueba cutánea intradérmica, reacción cutánea a la tuberculina, reacción intradérmica a la PPD (Derivado Proteico Purificado) de la Tuberculina Aviar o prueba intradérmica de Johnina (PPD derivado de Map). La PPD Aviar y la Johnina se utilizan de forma alternada debido a que presentan las mismas aptitudes diagnósticas gracias a que comparten el 99% del genoma, encontrándose estrechamente relacionados antigénicamente (Chiodini, 1984; Körmendy, 1988; Sikes y Groth, 1950).

La respuesta se manifiesta a las 72 horas de realizada la inoculación intradérmica del antígeno y la reacción se reconoce por una tumefacción en el sitio de aplicación. Se puede aplicar a nivel del tercio medio de la tabla del cuello o en el pliegue anocaudal interno; el engrosamiento de la piel se mide con un calibre antes de la inoculación y en el momento de la lectura (Figura 3).

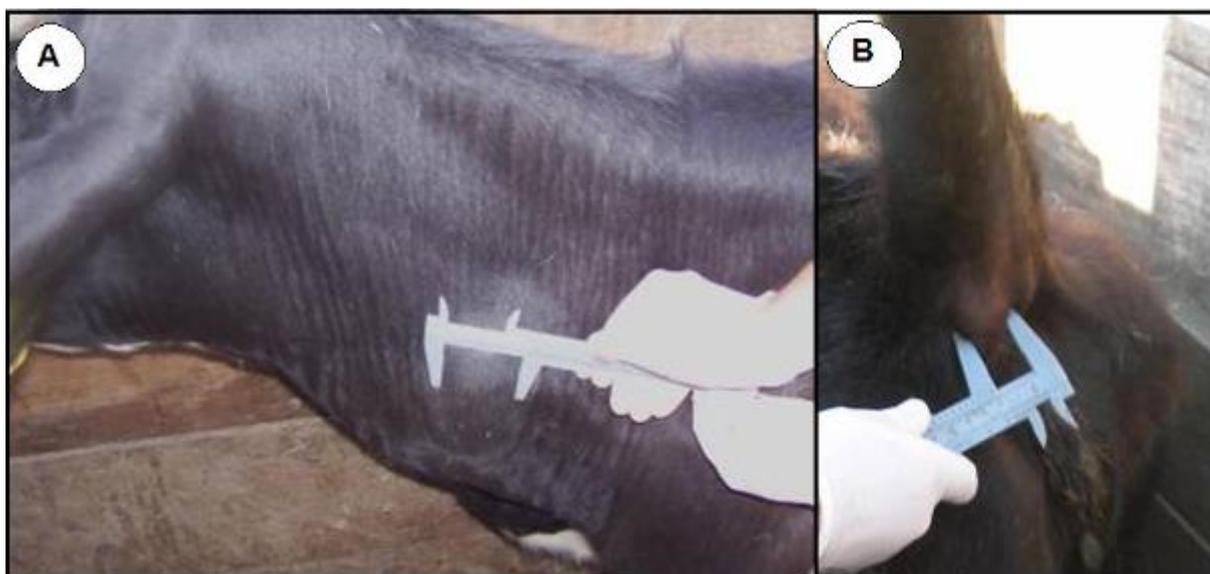


Figura 3. Reactantes a la prueba intradérmica con PPD Aviar luego de 72 hs. de inoculación. En A se aprecia una importante reacción en la tabla del cuello, mientras que en B se observa un reactante a la prueba en el pliegue anocaudal interno izquierdo.

Esta prueba no interfiere con los planes de control de la tuberculosis, se ha estimado una sensibilidad del 54% y una especificidad del 79% (Ayele y col., 2001; Kalis y col., 2003), un valor predictivo positivo bajo (22%) y un valor predictivo negativo bueno (95%) (Cicuta, 1999; Kalis y col., 2003). Sin embargo, debido a que la presencia de reactantes a la prueba indica sensibilización de los animales a Map o al complejo *M. avium*, se sugiere utilizar esta técnica como una prueba preliminar a la iniciación de un programa de control (Bernardelli, 2000; OIE, 2014).

Una descripción más detallada sobre las características de la Tuberculina Aviar y de la prueba intradérmica se realizará más adelante en este capítulo.

- *La prueba de interferón gamma* es el equivalente 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 interferón gamma (IFN- γ) producido por los linfocitos T específicos presentes en cada muestra.

En la fase subclínica, la sensibilidad de esta prueba es superior a la de las pruebas serológicas, sin embargo, es baja en términos absolutos (41%) (Gwozdz y col., 2000; Stabel, 1996) pudiendo disminuir a un 20% en rodeos con infecciones mixtas con tuberculosis, probablemente por las características de las cepas (Álvarez y col., 2009; Aranaz y col., 2006.).

La mayor ventaja de la prueba de IFN- γ es que durante los primeros estadios de la enfermedad, la secreción de IFN- γ es importante, pudiendo ser de utilidad esta técnica para detectar animales en la etapa subclínica. Sin embargo, tiene varias desventajas, como las posibles reacciones cruzadas, es necesario procesar rápidamente la muestra ya que las células deben estar vivas (Stabel, 1996), el costo es elevado y la baja sensibilidad. Por todos estos motivos, esta prueba no es ampliamente utilizada.

1.5.2. Tercer estadio (enfermedad clínica incipiente) y cuarto estadio (enfermedad clínica avanzada)

A medida que transcurre el tiempo y los animales pasan a los siguientes estadios de la enfermedad (clínico incipiente y clínico avanzado), la inmunidad celular comienza a decaer indicando un aumento de la carga bacteriana en el organismo, momento a partir del cual se puede empezar a detectar la inmunidad mediada por anticuerpos con las técnicas más sensibles como la prueba de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA), prueba de Fijación del complemento (FC). En los animales con signos clínicos evidentes resulta de utilidad diagnóstica la prueba de inmunodifusión en gel de agar (AGID) que es menos sensible pero más específica.

- *La prueba de ELISA se caracteriza por presentar una mayor sensibilidad en comparación con las técnicas de Fijación del complemento y AGID en cuanto a la detección de animales subclínicamente infectados que actúan como portadores de la enfermedad (OIE, 2014).* La sensibilidad de esta prueba dependerá del nivel de liberación de Map en la materia fecal. Esta técnica es capaz de detectar entre un 30-40% del ganado vacuno identificado como positivo por el cultivo de heces en medio sólido (Whitlock y col., 2000). Sin embargo, esta sensibilidad también depende de la edad del animal, existen numerosos artículos que mencionan diferentes porcentajes de sensibilidad, aunque hay estudios en los que se ha calculado que la sensibilidad global total estimada para los diferentes grupos de edad es del 15% (Whitlock y col., 2000; Jubb y col., 2004).

La técnica se ha desarrollado en un formato de placa de microtitulación en el que el antígeno recubre los 96 pocillos de las placas. Los sueros se pueden cargar por duplicado y posteriormente se incorporan a los pocillos y los anticuerpos específicos contra Map forman un complejo con los antígenos ligados a los pocillos. Después de lavar para eliminar los materiales no unidos en los pocillos, se añade inmunoglobulina G anti-bovina marcada con peroxidasa. Esto reacciona con las inmunoglobulinas unidas al antígeno de la fase sólida. El

color desarrollado luego del agregado de una solución reveladora, es medido espectrofotométricamente a 450 nm y es proporcional a la cantidad de anticuerpo presente en la muestra problema (Travería, 2003; OIE, 2014). En la Figura 4 se muestra el aspecto de una placa de ELISA al momento de la lectura.

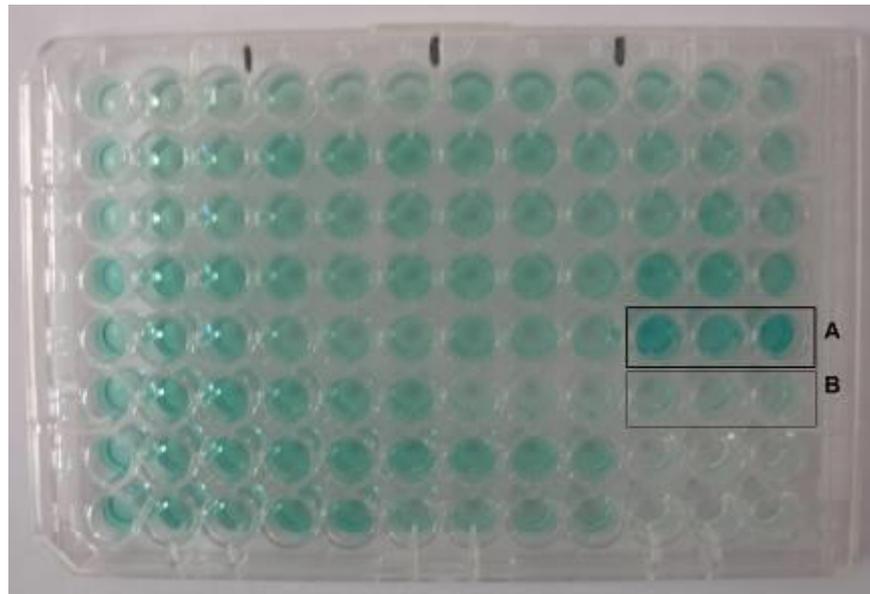


Figura 4: Placa de ELISA luego de ser revelada. Las muestras de suero se sembraron por triplicado. En A y en B se observa la coloración que toman respectivamente los controles positivos y negativos.

Con el fin de mejorar la sensibilidad de esta técnica se realiza un ELISA de absorción en donde los sueros a analizar son diluidos en un buffer que contiene antígenos soluble de *M. phlei* antes de realizar la prueba de ELISA indirecto; este procedimiento elimina los anticuerpos que provocan reacciones cruzadas inespecíficas (OIE, 2014).

- *La prueba de Fijación del complemento* ha sido la prueba estándar empleada en bovinos durante muchos años, siendo una técnica apropiada en los animales clínicamente sospechosos de tener paratuberculosis, pero no presenta suficiente especificidad para usarse en planes de control de la enfermedad. Sin embargo, algunos países importadores de bovinos exigen su realización. Aunque los protocolos son variables, básicamente se trata de una técnica en donde se realizan diluciones en razón 2 de los sueros, previamente inactivados a 60°C durante 30 minutos, se enfrentan con un antígeno conocido y se incuban

con suspensiones de complemento y de eritrocitos. El título del suero es la recíproca de la dilución más alta que contiene antígeno y en la cual el 50% de los glóbulos rojos están hemolizados. El 50% ó más de hemólisis será interpretado como negativo (Bernardelli, 2000; OIE, 2014).

- *La prueba de AGID* es de utilidad para confirmar la enfermedad en bovinos, ovinos y caprinos clínicamente sospechosos, aunque presenta baja sensibilidad en los estadios subclínicos de la paratuberculosis, siendo de 18,9% - 30%, mientras que en los estadios avanzados alcanza el 90% - 95% (Ayele y col., 2001). Es una técnica operativamente sencilla, rápida y de bajos costos, basada en la precipitación de inmunocomplejos formados por los anticuerpos producidos en la infección, frente a un antígeno protoplasmático soluble de *M. avium* en un soporte de agar gel. La prueba se puede realizar en placas de Petri y el agar se perfora con un sacabocados según un modelo hexagonal, en los pocillos periféricos se añaden los sueros problemas intercalados con los sueros controles positivos y en el pocillo central se carga el antígeno. Después de 24 – 48 horas de incubación en cámara húmeda a temperatura ambiente, se pueden observar las líneas de precipitación. La aparición de una o más líneas de precipitación claramente definidas, que sean idénticas a la de un suero positivo control, dentro de las 48 horas siguientes, se considera un resultado positivo. La ausencia de cualquier línea de precipitación es considerada como un resultado de prueba negativo. En la Figura 5 se observa un dibujo esquemático de reacciones de AGID negativas y positivas.

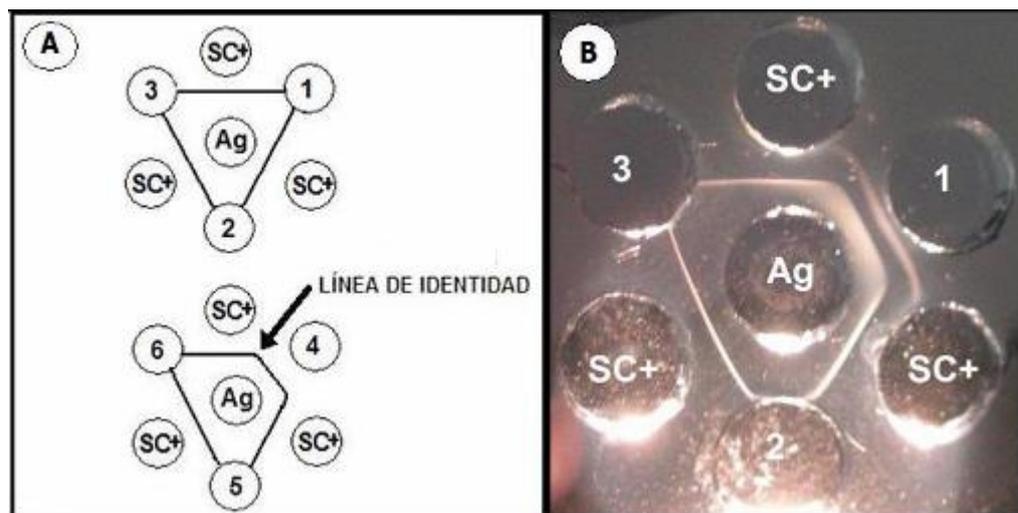


Figura 5: En A dibujo de reacciones de la prueba de inmunodifusión en gel de agar de paratuberculosis; arriba una roseta con todos los sueros negativos (1, 2 y 3); abajo una roseta con un suero problema positivo (4), se señala la línea de identidad que se forma con la línea de precipitación del control positivo (SC+). En B fotografía de una roseta real; entre el pocillo 1 y el antígeno (Ag) se observa una doble banda de precipitado, se evidencia la línea de identidad con el SC+ en la banda más cercana al Ag; el suero en el pocillo 2 se consideró positivo débil y el número 3 negativo.

- *El cultivo bacteriológico* es considerado la prueba de oro o “gold standard”, a partir de la cual se comparan los otros métodos diagnósticos. En el estadio de infección subclínica la eliminación de micobacterias por la materia fecal es intermitente y es a partir de este momento donde los cultivos comienzan a ser positivos (Whitlock y col., 1991 y 2000; Sherman, 1989) siendo el límite de detección mínimo de 100 UFC/gramo de materia fecal (Merkal, 1970).

La mayor desventaja de este método es la característica lentitud con la que crece el Map, siendo necesario esperar aproximadamente unos 6 meses para dar como negativo el cultivo. Además, la realización de todo el protocolo de esta técnica presenta cierta dificultad técnica, así como también requiere de tiempo, pero es la única prueba que no da resultados falsos positivos, considerándose que posee un 100% de especificidad. La prueba permite detectar animales infectados 6 meses o más, antes de que desarrollen los síntomas clínicos y durante la fase clínica su sensibilidad se aproxima al 100% (OIE, 2014). También se debe tener en cuenta que los medios sólidos, por los largos tiempos de incubación, pueden sufrir deshidratación, lo que sumado al efecto de la descontaminación química previa, pueden

reducir el desarrollo de las micobacterias, todo esto debe tenerse en cuenta al interpretar los posibles resultados negativos (Reddacliff y col., 2003).

En los animales vivos se puede efectuar el cultivo a partir de muestras de materia fecal, de leche, calostro o raspados de mucosa intestinal. Se estima que el método del cultivo fecal por el procedimiento de la doble incubación para la descontaminación de las muestras en cultivo en medio sólido, es la prueba más apropiada y detecta entre un 30 - 40% del ganado infectado (Whitlock y col., 2000).

En los animales muertos, al practicar la necropsia se puede realizar el cultivo a partir de muestras de linfonodos cercanos a las lesiones macroscópicas, también se pueden sembrar raspados de mucosa de las regiones de la válvula íleocecal, yeyuno, colon o de recto y otros linfonodos mesentéricos (Bernardelli, 2000). Los cultivos a partir de tejidos de intestino y/o linfonodos regionales tienen una sensibilidad del 70% y una especificidad del 100% (Tiwari y col., 2006)

Los diferentes medios de cultivo descritos para el aislamiento de Map se caracterizan por la presencia de micobactina J, siendo los medios de cultivo recomendados por la OIE el Herrold's con yema de huevo (Herrold's egg yolk medium, HEYM), Middlebrook 7H9, 7H10 y 7H11, medio Dubos y el Löwestein-Jensen (LJ). Existen dos métodos básicos para el cultivo convencional de Map en medio sólido: el método en el que se emplea ácido oxálico y NaOH para la descontaminación y el medio LJ para el crecimiento, y el método en el que se emplea cloruro de hexadecilpiridinio (CHP) para la descontaminación en combinación con el HEYM para el crecimiento. Ambos medios contienen micobactina (OIE, 2014).

Las colonias primarias de cepas bovinas de Map en HEYM son muy pequeñas, convexas (semiesféricas), de aspecto suave y no mucoide, e inicialmente translúcidas e incoloras. El tamaño inicial de las colonias es puntual pudiendo medir entre 0,25–1 mm de diámetro cuando son numerosas en el cultivo en superficie. Los bordes son redondeados y uniformes, y su superficie es lisa y brillante. Las colonias llegan a alcanzar un tamaño mayor y se abomban, son opacas y de color blanco-parduzco a medida que la incubación se

alarga. Las colonias de aislamientos más viejos pueden alcanzar los 2 mm. La morfología de la colonia cambia con la edad pasando de lisa a rugosa y de semiesférica a irregular (Cousins y col., 2002; Thorel, 1984). En la Figura 6 puede apreciarse el aspecto de las colonias de Map en el medio de Herrold con micobactina.

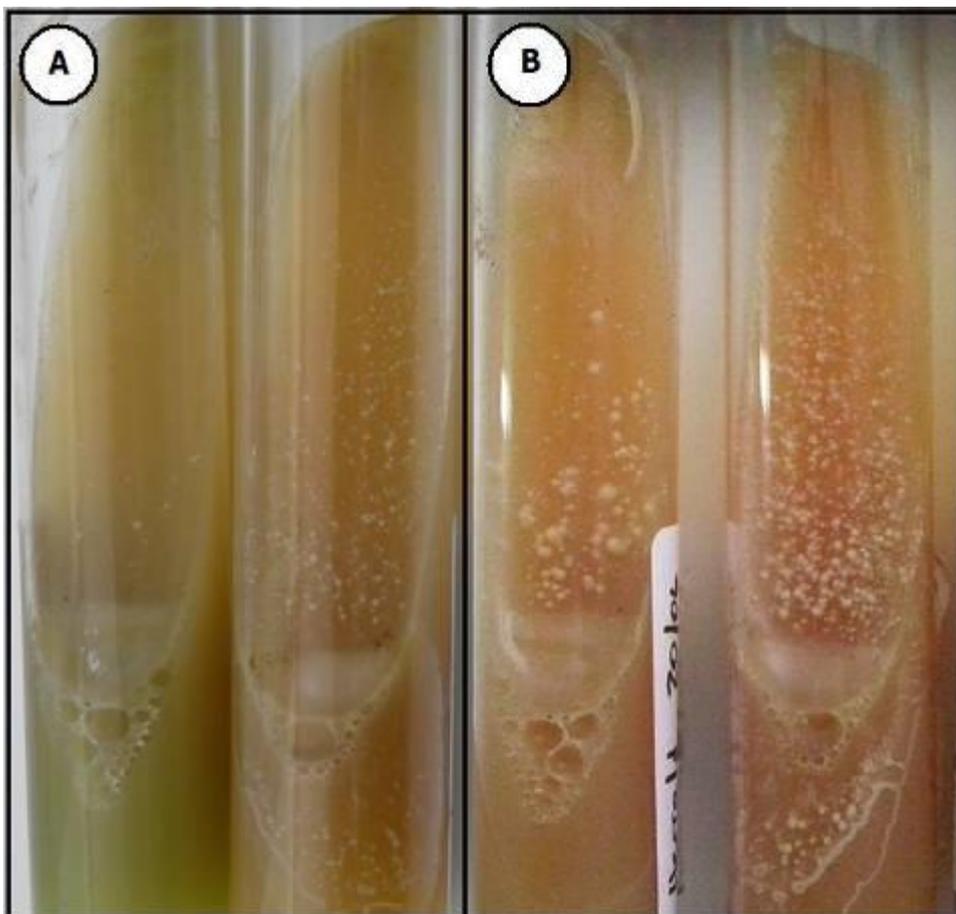


Figura 6: Características de las colonias de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* en medio de Herrold con micobactina. En A se observan colonias aisladas de bordes lisos en diferente cantidad luego de un mes de incubación. En B aspecto rugoso de las colonias luego de tres meses de incubación.

Debido a la intermitencia con la que los animales liberan las micobacterias, es recomendable repetir los cultivos a lo largo del tiempo para aumentar la sensibilidad de la prueba. Esta estrategia, sin embargo, es muy costosa como para ser aplicada de forma rutinaria en los planes de diagnóstico y control de la enfermedad (Gilardoni y col., 2012).

También se han utilizado sistemas automatizados que utilizan medios líquidos para acortar el tiempo de determinación de Map, se pueden mencionar el sistema BACTEC MGIT

960 (con un tiempo de detección de 4 a 7 semanas) y que puede llegar a ser positivo a partir de 10 UFC/mL (Shin y col., 2007).

El cultivo radiométrico BACTEC™ 12B, es un método que está basado en la detección del isótopo CO_2^{14} , el cual es liberado como consecuencia del metabolismo bacteriano, a partir del ácido palmítico que contiene C^{14} . Este método detecta con mayor rapidez la presencia de crecimiento de Map en comparación con el cultivo tradicional en medio sólido, habiéndose descrito aislamientos positivos en nueve días tras la inoculación del medio de cultivo (Damato y Collins, 1990). Sin embargo, el empleo de isótopos radiactivos no es posible en muchos laboratorios, además de ser un método de diagnóstico altamente costoso (OIE, 2014). En Australia, Nueva Zelanda, Estados Unidos y algunos otros países, el sistema BACTEC 460 con medio modificado BACTEC 12B (Becton, Dickinson) ha sido el sistema de cultivo líquido más utilizado, pero su producción fue descontinuada en el año 2012. Por lo tanto, en estudios recientes se desarrolló y probó el uso de un nuevo medio de cultivo líquido, el M7H9C. Se compone de una base de medio Middlebrook 7H9 con adición de caseína, albúmina, dextrosa, catalasa, yema de huevo, micobactina J, y un cóctel de antibióticos. Al comparar ambos medios de cultivo no se encontraron diferencias significativas con respecto a la recuperación de Map. (Whittington R y col., 2013). La mayor desventaja de estos sistemas es la necesidad de un equipo caro, los elevados costos de los medios de cultivo y la dificultad de identificación que puede existir por el desarrollo de microorganismos contaminantes.

- El *diagnóstico patológico* cuando los animales han muerto resulta de gran ayuda; ya sea macroscópico como así también, el microscópico. En ocasiones no existe correlación entre la gravedad de los signos clínicos de la paratuberculosis y la extensión de las lesiones intestinales, por eso la inspección de la mucosa intestinal debe realizarse cuidadosa y minuciosamente desde el íleon hacia el recto. Los hallazgos anatomopatológicos que pueden observarse en la necropsia de los animales son linfangitis, linfangiectasia, mucosa intestinal edematizada, ileocolitis, adenopatias de nódulos mesentéricos ileocecales y

compromiso de la válvula íleocecal. Algunas de estas lesiones se muestran en la Figura 7. Se recomienda realizar frotis o improntas de la mucosa afectada y los cortes superficiales de los nódulos linfáticos deben teñirse por el método de Ziehl–Neelsen y examinarse microscópicamente para observar la presencia de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) que tienen la morfología característica de Map. Sin embargo, estos microorganismos no están presentes en todos los casos. Por lo tanto, se debe confirmar el diagnóstico recolectando múltiples muestras de la pared intestinal y de los linfonodos mesentéricos en formol al 10% para el subsiguiente examen histológico (OIE, 2014).

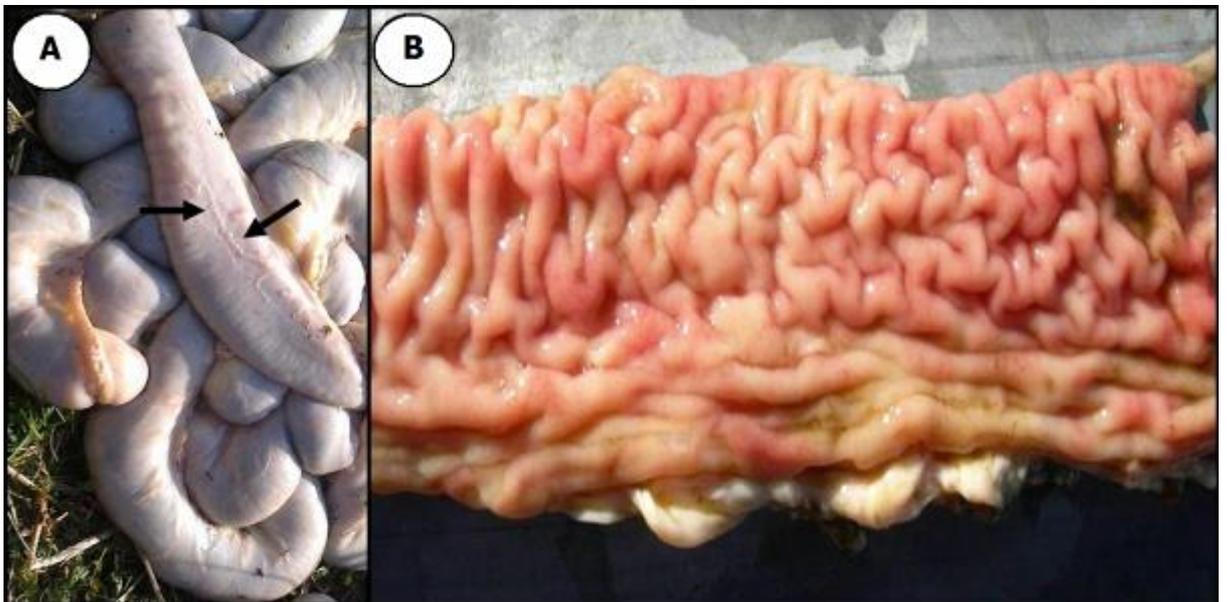


Figura 7: Posibles hallazgos anatomopatológicos en bovino con paratuberculosis. En A se señala la linfangiectasia en la pared superficial de la serosa intestinal. En B engrosamiento y edema de la mucosa intestinal.

El diagnóstico microscópico, tanto histopatológico (con el uso de la técnica convencional de coloración con hematoxilina-eosina y la coloración de Ziehl-Neelsen) como utilizando pruebas inmunohistoquímicas a partir principalmente de muestras de intestino (segmento del íleon, válvula íleocecal, colon y recto) permite observar un granuloma difuso con grandes macrófagos, conocidos como células epiteloides, células multinucleadas tipo Langhans y linfocitos (Buergelt y col., 1978; Clark, 1997). Las lesiones típicas consisten en la infiltración de la mucosa y submucosa intestinal, las placas de Peyer y la corteza de los

linfonodos mesentéricos con células epiteloideas, y células multinucleadas gigantes, en las que se encuentran habitualmente, pero no invariablemente, BAAR en agregados o de forma aislada (OIE, 2014).

De acuerdo al tamaño, a la cantidad y al tipo de células presentes, las lesiones pueden ser clasificadas como tuberculoide (focal, multifocal y linfocítica o paucibacilar), lepromatosa (multibacilar difusa) y de tipo intermedio (González y col., 2005). Las lesiones focales se supone que son las primeras en aparecer y se asocian con una fuerte respuesta inmune celular. Las lesiones tuberculoides y multifocales progresan hasta confluir llegando a comprimir y borrar las criptas intestinales; las vellosidades intestinales se fusionan causando la disminución de la superficie de absorción, conduciendo a la pérdida de peso y causando hipoproteinemia y edema. El tipo lepromatoso aparece en algunos animales, se relaciona con cambios del perfil de la respuesta inmune (Gilardoni y col., 2012).

- La *bacterioscopía* mediante la observación del microorganismo con las técnicas de coloración de Ziehl Neelsen, Kinyoun o fluorescencia puede realizarse a partir de todas las muestras antes mencionadas. El uso de la coloración de Ziehl Neelsen se basa en la resistencia que tienen las micobacterias a la decoloración con una solución alcohol-ácida después de ser teñidas con fucsina. Es un método sencillo, rápido y barato. La desventaja que presenta es su baja sensibilidad en las muestras de materia fecal, calostro y leche, pudiendo dar falsos negativos. En las muestras provenientes de casos clínicos de paratuberculosis es característico observar cúmulos o grupos de bacterias que miden entre 0,5–1,5 μm , esta disposición las diferencia de otras micobacterias (Chiodini y col., 1984; Bernardelli, 2000; OIE, 2014). En la Figura 8 se muestra una coloración de Ziehl Neelsen con la presencia de BAAR agrupados de manera característica en casos de paratuberculosis.

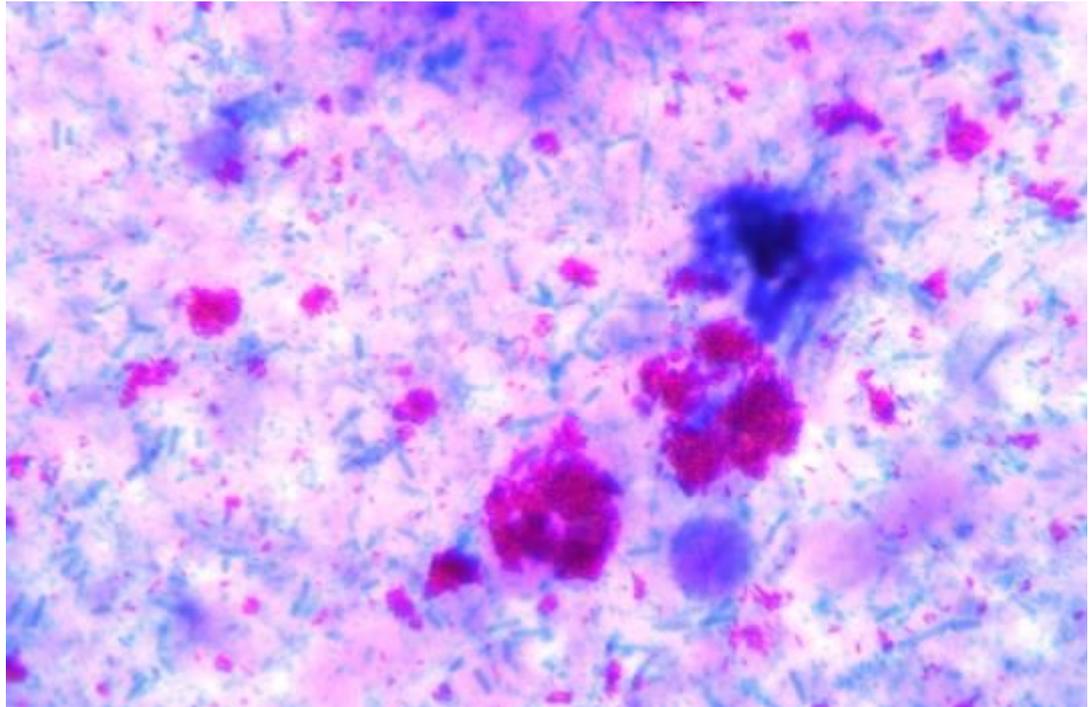


Figura 8: Microfotografía 100X de una coloración de Ziehl Neelsen de una muestra de materia fecal bovina. Se logra apreciar los BAAR de color fucsia y formando grupos compatibles con *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*.

- Entre las *pruebas genéticas* que se pueden utilizar para complementar el diagnóstico de paratuberculosis se encuentran la pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional, PCR en tiempo real, PCR múltiple y sondas de hibridación (Motiwala y col., 2003; Dohmann y col., 2003; Collins y col., 1990). Estas pruebas se pueden realizar a partir de las muestras clínicas o de los aislamientos obtenidos.

El gen 16S rRNA se encuentra en todas las micobacterias y con la secuencia de inserción (IS) IS1311 se logra identificar a todos los miembros del complejo *Mycobacterium avium*. Para detectar específicamente al Map se utiliza una secuencia de inserción específica, la IS900, presente en múltiples copias (entre 18 a 20) en el genoma de la bacteria (McFadden y col., 1987a y 1987b; Moreira y col., 1999). Se han elaborado sondas de ADN que hibridan con esta secuencia y que permiten detectar de manera rápida al Map en las muestras de diagnóstico (Vary y col., 1990; Ellingson y col., 1998; Merkal, 1984).

Secuencias de ADN derivadas de IS900 se utilizaron para preparar cebadores de ADN para la detección y la identificación de Map por el método de PCR (Collins y col., 1989; Li y col., 2005). Posteriormente se logró la identificación de nuevas secuencias que se consideran exclusivas de Map, como ISMav2, F57, y ISMap02, ISMap04 e IS1311 ofrecen posibilidades adicionales para la identificación rápida de este microorganismo utilizando la tecnología de PCR (Stabel y Bannantine, 2005; Strommenger y col., 2001; Vansnick y col., 2004; Li y col., 2005).

Una vez que se ha identificado la presencia de Map se pueden realizar otros estudios genéticos que permiten detectar inserciones y deleciones, otorgando información adicional relacionada con aplicaciones en epidemiología. Mediante el uso de la técnica de digestión por enzimas de restricción de IS900 (IS900-RFLP) se lograron identificar tres patrones de Map conocidos como tipo bovino (C: cattle), tipo ovino (S: sheep) y tipo intermedio (I: intermediate), de acuerdo a su aparente preferencia por las especies en las que se aíslan; estos patrones se han encontrado en rumiantes domésticos, como así también, en el bisonte americano y cabras de la India (Collins y col., 1990; Moreira y col., 1999; Dohmann y col., 2003; Juan y col., 2005).

Cuando se utiliza la técnica de electroforesis en campo pulsado, estos tres grupos se denominan tipo I al ovino, tipo II al bovino y tipo III al intermedio. Entre los inconvenientes que presentan las técnicas mencionadas, es que se deben realizar sobre cepas aisladas, por la cantidad de material genómico que necesita la prueba, y no directamente a partir de las muestras clínicas, por lo tanto requieren de mucho tiempo.

Para evitar estas desventajas se han desarrollado otras técnicas que requieren menos tiempo, menor cantidad de ADN y se pueden utilizar sobre cepas de difícil crecimiento, como la prueba de PCR-REA (enzimas de restricción seguidas de pruebas de PCR) utilizando la secuencia de inserción IS1311 (IS1311-PCR/REA) y la digestión con las enzimas de restricción *Hinfl* y *MseI* (Marsh y col., 1999).

Una limitante para el uso de estas pruebas es la presencia de inhibidores en la materia fecal que pueden dificultar su utilización (Vary y col., 1990; Garrido y col., 2000). Sin embargo, para sortear este inconveniente, se eliminan estos inhibidores mediante un paso de purificación del ADN (Leite y col., 2013) o mediante diluciones del ADN extraído (Garrido y col., 2000).

También se han descrito patrones moleculares que permiten identificar diferencia genéticas entre micobacterias, mediante el análisis de distintos locus con unidades repetidas interespaciadoras o MIRU (por Unidades Repetitivas Interespaciadoras de Micobacterias) y secuencias de ADN repetidas en tandem (VNTR) que demuestra las variaciones en el número de reediciones entre los diferentes aislamientos (Paolicchi y Romano, 2007; van Hulzen y col., 2011). La prueba de MIRU-VNTR puede diferenciar entre los tipo S y C pero no puede diferenciar entre los tipo S y el I (intermedio).

Entre las variantes a la prueba de PCR convencional se puede mencionar a la PCR anidada (nested PCR), que implica la amplificación en dos rondas de la misma secuencia de ADN con diferentes pares de cebadores, por lo que permite aumentar la sensibilidad de la reacción. La PCR múltiplex utiliza varios pares de cebadores en la misma reacción para amplificar múltiples secuencias diana simultáneamente, se utiliza para diferenciar infecciones micobacterianas mixtas (Moravkova y col., 2008). La PCR en tiempo real (RT-PCR) es cuantitativa, utiliza una sonda marcada con fluorocromo que es complementaria a la secuencia diana que amplifica; la cantidad de ADN será proporcional a la cantidad de fluorescencia emitida durante cada ciclo de PCR (Gilardoni y col., 2012).

Otra variante de la PCR es el método de amplificación isotérmica mediada por un bucle (LAMP) que no requiere de termociclador, es una técnica poco laboriosa y no requiere un equipamiento especial (Enosawa y col., 2003).

Se han mencionado brevemente algunos de los numerosos avances en los conocimientos de la biología molecular del Map que han permitido seguir mejorando las pruebas genéticas disponibles, no solo a nivel de su sensibilidad y especificidad, sino

también en lo referido a la velocidad y relativa simplicidad operativa; la gran desventaja de todos estos métodos son los elevados costos que siguen limitando su uso solamente para investigación.

El carácter insidioso de la paratuberculosis y el desarrollo a nivel intestinal del granuloma difuso, la hace prácticamente una enfermedad incurable. Además, por su prolongado período de incubación es de difícil diagnóstico en sus etapas iniciales (Buergelt y col., 1978). La única forma de detectar a los animales en las primeras etapas de la enfermedad es mediante el uso de la prueba tuberculínica y la prueba del interferón gamma (Whitlock y Buergelt, 1996; Sweeney, 1996; Stabel y col., 2007).

Por lo tanto, el control de la enfermedad se basa en el manejo de los animales, el diagnóstico, la eliminación de los animales detectados y en controlar su difusión tratando de evitar el contacto de los animales más susceptibles, los jóvenes, con la micobacteria en el medio ambiente y con los animales que diseminan estos microorganismos. Las estrategias eficientes de control tienen como pilares la detección y eliminación de los animales enfermos (Harris y Barletta, 2001).

En cada rodeo bovino, según la prevalencia de la enfermedad, la elección de los métodos diagnósticos se verá fuertemente influenciada por los costos, siendo de gran importancia implementar los métodos de control con aquellas pruebas que hayan demostrado tener una buena sensibilidad y especificidad.

A continuación y a modo de resumen, se presentan en la Tabla 2 los métodos diagnósticos recomendados en los bovinos de acuerdo a la etapa en la que los animales estén cursando esta enfermedad.

Tabla 2: Pruebas diagnósticas de paratuberculosis bovina más recomendadas agrupadas según el estadio de la enfermedad.

Estadio	Características del estadio	Pruebas
Infección silente	Animales jóvenes, sin signos clínicos, no hay diseminación bacteriana, ni anticuerpos circulantes detectables.	- ID con PPD Aviar - Gamma Interferón
Infección subclínica	Los enfermos podrían diseminar escaso número de bacterias, sin signos clínicos, la inmunidad mediada por células puede evidenciarse.	- ID con PPD Aviar - Gamma Interferón - Cultivo - ELISA
Enfermedad clínica incipiente	Los animales pierden peso y tienen diarrea acuosa al principio intermitente. Se pueden detectar las bacterias y los anticuerpos.	- Cultivo - Ziehl Neelsen - ELISA
Enfermedad clínica avanzada	Los enfermos tienen diarrea acuosa, emaciación y edema submandibular. Eliminan abundante cantidad de micobacterias y generalmente tienen elevada cantidad de anticuerpos y escasa o nula inmunidad celular.	- AGID - Histopatología - Inmunohistoquímica - PCR - LAMP

Referencias: ID: Prueba intradérmica; PPD: Derivado proteico purificado; ELISA: Ensayo de Inmunoadsorción Ligado a Enzima; AGID: Inmunodifusión en gel de agar; PCR: Reacción en cadena de la polimerasa; LAMP: Amplificación isotérmica mediada por un bucle.

1.6. Situación de la enfermedad en América Latina y en la Argentina

Los datos en América Latina y el Caribe sobre la prevalencia en bovinos indican que aproximadamente el 76% de los rodeos presentan la enfermedad, con una prevalencia individual del 17%, en ovinos es del 16% a nivel individual y en los caprinos de 7,4% a nivel de rodeo y de 3,7% a nivel individual (Fernández-Silva y col., 2014).

En nuestro país, Rosenbusch realiza por primera vez la descripción de esta afección en los bovinos en 1932, hacia 1942 se describe en los ovinos, en 1995 en las cabras y en los ciervos en el año 2000. Recientemente se informó la primera caracterización molecular de la cepa S en ovinos (Travería y col., 2013). Los datos de la serología por la prueba de ELISA, demostraron una seroprevalencia de 50% de establecimientos afectados en la

provincia de Buenos Aires (Paolicchi y col., 2002). Se han descrito numerosos casos clínicos compatibles con esta enfermedad, representando una de las principales causas infecciosas de muerte en los bovinos adultos (Costa y col., 2004; Späth y col., 2012).

Además, en la Argentina, en relación al posible papel zoonótico de Map, se han realizado diversos ensayos para determinar la presencia viable de este agente en diferentes tipos de alimentos, con resultados diversos.

Se evaluó la sobrevivencia de Map en quesos de origen caprino y bovino, encontrándose respectivamente, que puede permanecer viable hasta 60 y 45 días después de la maduración con un tratamiento térmico de 37°C en quesos elaborados con leche infectada con Map (Cirone, 2004). Posteriormente, Paolicchi y colaboradores informan el aislamiento de Map en un 2,86% de 70 muestras estudiadas de leche pasteurizada y ultra pasteurizada, dichos aislamientos fueron positivos a IS900 y correspondieron al patrón C17 RFLP, el más frecuente en nuestro país (Paolicchi y col., 2005 y 2012). Sin embargo, otros estudios que quisieron aislar Map en 98 muestras de leche comercial homogeneizada y ultrapasteurizada para consumo humano en supermercados de la ciudad de Río Cuarto, en la provincia de Córdoba, fueron negativos (Magnano y col., 2009). Estos resultados dispares demuestran que es necesario seguir investigando este aspecto bromatológico en nuestro país.

Otros numerosos temas relacionados con la investigación científica de esta patología, son desarrollados arduamente por diversos profesionales en diferentes centros, universidades e institutos de nuestro país, demostrando el interés actual por optimizar el conocimiento de esta enfermedad.

1.7. Tratamiento y control de la paratuberculosis

El tratamiento de esta enfermedad raramente se lleva a cabo, o solo de manera excepcional en el caso de animales de compañía o de elevado valor genético. Estos tratamientos se deben realizar a diario y solamente aminoran los signos clínicos de la

enfermedad, pero éstos animales siguen excretando microorganismos al medio ambiente (Larsen y Vardaman, 1953; Merkal y Larsen, 1973).

Entre los fármacos más comúnmente empleados en el tratamiento se encuentran los agentes antimicobacterianos como la cicloserina, el etambutol, la etionamida, la isoniazida, el ácido paraaminosalicílico, la tiocarlida y los tiosemicarbazonos, las fenamidas y la pirizinamida. Entre los antibióticos clínicamente activos se encuentran los aminoglucósidos (como la gentamicina, kanamicina, neomicina, estreptomycin), la capreomicina, la rifabutina, la rifampicina y la viomicina. Sin embargo, los resultados obtenidos tras la aplicación de estos fármacos en modelos *in vivo* no son equiparables a los obtenidos en modelos *in vitro*, puesto que estas micobacterias en la mayoría de los casos se encuentran inaccesibles ya que se multiplican en el interior de los macrófagos y otras células de la mucosa intestinal de las placas de Peyer (Cocito y col., 1994).

Actualmente se encuentran en evaluación los tratamientos con probióticos (Karunasena y col., 2013; Click, 2011)

Las vacunas desarrolladas hasta la fecha para la prevención de la paratuberculosis han sido realizadas a partir de cepas vivas atenuadas, de cepas inactivadas, o de fracciones de Map (Saxegaard y Fodstad, 1985; Cocito y col., 1994). La mayor ventaja de la vacunación es la prevención de casos clínicos. La desventaja principal es que el uso de estas vacunas puede interferir con los programas de erradicación de la tuberculosis bovina basados en las pruebas inmunológicas y en la eliminación de los animales identificados como infectados y puede interferir con la interpretación de los resultados de las pruebas cutáneas. La vacunación puede causar una reacción en el punto de la inyección. En los humanos, la inyección accidental de la vacuna provoca reacciones inflamatorias crónicas que podrían requerir un tratamiento quirúrgico. (OIE, 2014).

Debido a su discutida eficacia y a la sensibilización que produce su aplicación a la prueba de PPD bovina para el control de la tuberculosis bovina, en nuestro país por el momento no se ha aprobado la aplicación de vacunas y no existe producción comercial de

las mismas. A nivel experimental se están desarrollando distintos estudios científicos (Viale, 2014).

El riesgo de infección es máximo en los animales jóvenes, por lo tanto es crucial un buen manejo de los recién nacidos. Los terneros deben ser separados de los adultos inmediatamente después de nacidos, solo deberían tomar calostro de sus propias madres o de animales sin infección ni enfermedad (Collins, 1994).

En la Argentina las formas de control se basan en el diagnóstico y la eliminación de los enfermos en conjunto con medidas de bioseguridad tendientes a evitar el contacto de los animales eliminadores de micobacterias con los animales más jóvenes en sus primeras semanas de vida (Bastida y Juste, 2011; Kennedy, 2011; Kreeger, 1991).

1.8. Características de la prueba tuberculínica y de la PPD Aviar

En una enfermedad como la paratuberculosis la detección de una respuesta inmune mediada por células precede a la producción de anticuerpos detectables. Los animales que están infectados a un nivel muy bajo, con frecuencia no dan reacciones positivas en las pruebas serológicas. En poblaciones infectadas, es esperable que reaccione a las pruebas que miden la inmunidad mediada por células un número muy superior de animales, en comparación con lo que ocurre al utilizar pruebas que determinan la presencia de anticuerpos. Así, la inmunidad mediada por células es indicativa de exposición, mientras que los anticuerpos indican el avance de la infección (OIE, 2014).

1.8.1. La PPD Aviar

El reactivo PPD tuberculina aviar es un extracto antigénico de una preparación de productos tratados térmicamente, derivados del crecimiento y lisis de *M. avium* subespecie *avium* cepa D4ER en un medio sintético (Torres, 2012; OIE, 2014).

Las tuberculinas utilizadas en las técnicas diagnósticas son preparadas de acuerdo con los requerimientos de la Organización Mundial de la Salud en lo que respecta a:

orígenes de los materiales, métodos de producción, precauciones, sustancias agregadas libres de contaminantes, identidad, seguridad, potencia, especificidad y ausencia de agentes sensibilizantes. El bioensayo para la actividad biológica tiene especial importancia, y la potencia deberá expresarse en Unidades Internacionales (UI); El Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) produce PPD Aviar que contiene 25.000 UI por mililitro y una concentración de proteína de 0,5 mg/mL.

La producción de este reactivo necesita controles de viabilidad y de pureza de las cepas utilizadas. En las series de tuberculina se realizan controles de calidad que incluyen determinación de la potencia biológica (se realiza en cobayos previamente sensibilizados), controles de esterilidad, de ausencia de gérmenes, de toxicidad, de pH, control químico (para determinar la concentración de proteínas) y control de presencia de fenol y otros conservadores. Por lo tanto, la calidad del PPD siempre debe ser controlada, no siendo digna de confianza ninguna prueba, si se desconoce la potencia de la tuberculina con la que se efectuó (Bernardelli, 2007; Torres, 2012).

Las tuberculinas PPD deben ser transportadas y conservadas en frío entre 2°C a 8°C y protegidas de la luz solar directa durante el trabajo de campo, así como también del congelamiento, ya que puede causar la precipitación de las proteínas. Una vez utilizado parte del reactivo, debe descartarse el resto si no se va a usar en el mismo día, ya que puede sufrir contaminación y desnaturalización, con precipitación y turbidez. Se deben tomar las precauciones en su manejo, para evitar la introducción de contaminantes dentro del frasco (Torres, 2000; Bernardelli, 2007).

1.8.2. Indicaciones de la aplicación de la PPD en los bovinos

La prueba intradérmica con la inoculación de PPD Bovina es utilizada en estos animales principalmente para el control oficial de la tuberculosis. Diferentes estudios confirman que las vías de aplicación de la tuberculina que se pueden usar son en el pliegue

anocaudal interno y en el tercio medio de la tabla del cuello, siendo esta última la zona con mayor sensibilidad para la prueba (Baisden y col., 1951; Paterson, 1959; Good y col., 2011a); en cada aplicación se deben utilizar jeringas especiales con agujas hipodérmicas que permitan inocular un volumen de 0,1 mL. Previamente se deberán medir con calibre los pliegues cutáneos en los lugares de inoculación, con el fin de comparar a las 72 horas de aplicación cualquier engrosamiento que se produzca localmente en los pliegues cutáneos (Kerr y col., 1949; Lepper y col., 1977; Francis y col., 1978a; Körmendy, 1988; Gilot y Cocito, 1993). En el diagnóstico de la tuberculosis bovina la interpretación de los resultados es epidemiológica, tomando en cuenta la totalidad del rodeo. La prueba se lee de la siguiente manera, cuando se inocula en el pliegue anocaudal interno se reconocen tres interpretaciones: reactor positivo con una reacción \geq a 5 mm y el rodeo se considera infectado; reactor sospechoso cuando la reacción se encuentra entre 3 – 5 mm y el rodeo se considera sospechoso; el reactor sospechoso se vuelve a repetir en un lapso no menor de 60 días y no mayor a 6 meses, si sigue dando sospechoso se considera el rodeo positivo. Cuando la reacción es menor de 3 mm, el animal se considera reactor negativo; para considerar un rodeo negativo se debe tener no menos de 2 pruebas consecutivas negativas en todos los animales que componen el rodeo en un periodo no mayor a un año y no menor a los 60 días. Cuando la reacción se realiza en la tabla del cuello tiene sólo dos interpretaciones: reactor positivo mayor a 3 mm y reactor negativo menor a 3 mm (Torres, 2012). Para observar algunas imágenes de ejemplos de reacciones positivas a la prueba intradérmica se puede ver la Figura 3.

En medicina veterinaria se suele utilizar la PPD Aviar en la prueba tuberculínica comparada en la tabla del cuello en los rodeos en donde se sospecha de la presencia de falsos positivos a la prueba tuberculínica utilizada en el diagnóstico de tuberculosis bovina. La dosis recomendada para la aplicación intradérmica de la PPD Aviar es de 0,5 mg/mL, con esta concentración de antígeno, la dosis se encuentra balanceada de manera tal que, comparando las reacciones cutáneas a las 72 horas en un diagrama de puntos (Figura 9),

podemos establecer la presencia de animales reactantes positivos a la tuberculosis bovina, cuando la diferencia entre la reacción a la PPD Aviar y la PPD Bovina es 4 mm superior, a favor de la PPD Bovina; reactantes negativos a la tuberculosis bovina, cuando las reacciones son menores a 3 mm; animales sospechosos cuando la diferencia no supera los 4 mm a favor a la PPD Bovina; y por último reactante inespecífico cuando la diferencia entre las dos reacciones es mayor de 4 mm a favor de la PPD Aviar, es decir cuando está infectado por otra micobacterias distintas a *M. bovis* (OIE, 2004).

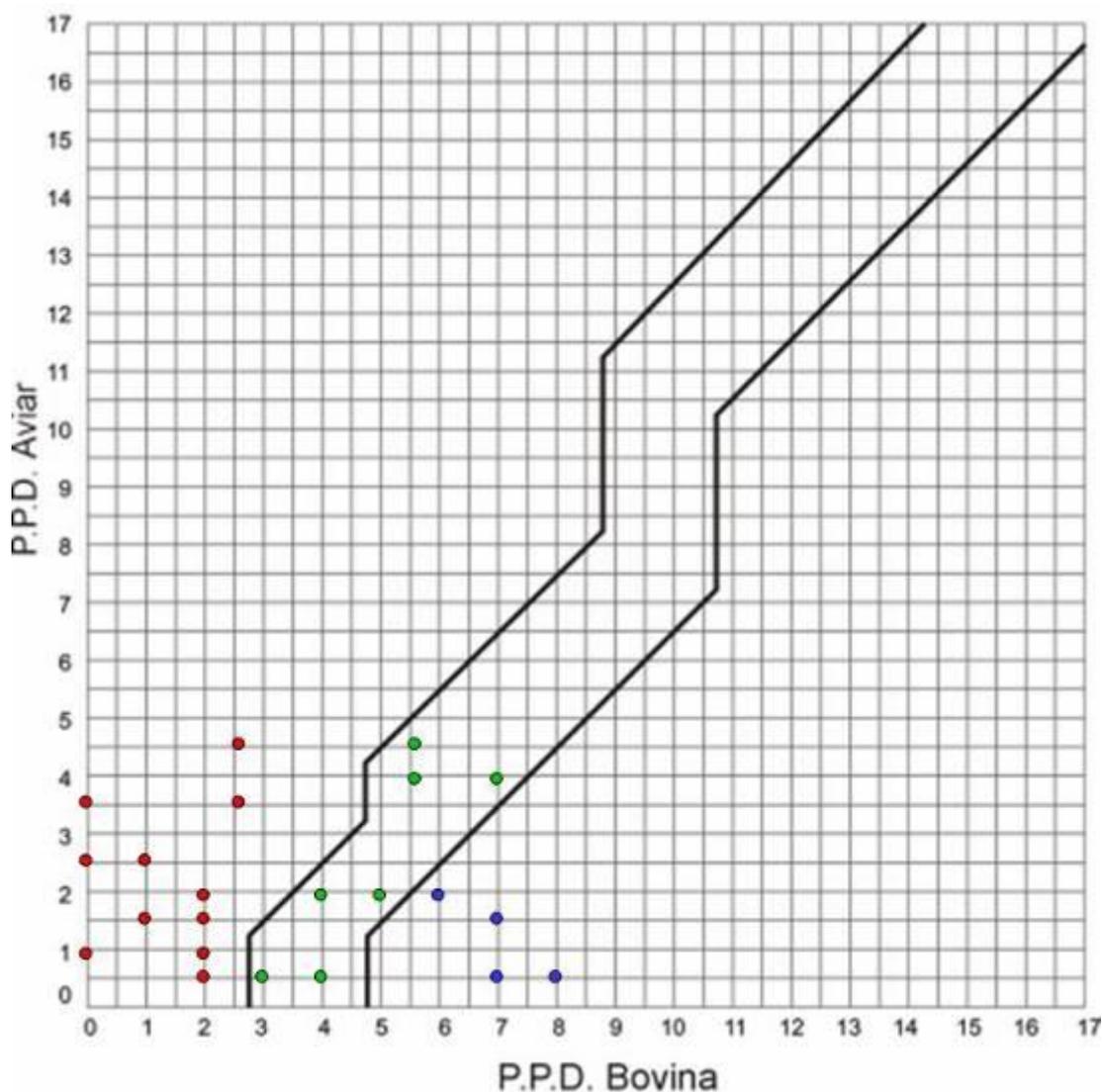


Figura 9: Ejemplo de un diagrama de puntos que se utiliza para analizar los resultados obtenidos de la prueba intradérmica cervical comparada. La escala numérica indica los milímetros de los pliegues cutáneos. Los puntos rojos marcan los reactores positivos a la PPD Aviar, los puntos verdes son los sospechosos y los puntos azules son los reactores positivos a la PPD Bovina (Elaborado a partir de Bernardelli, 2007).

Por lo tanto, en la prueba cervical comparada la aplicación de la tuberculina aviar se utiliza como índice de sensibilidad paraespecífica a la tuberculina bovina y las reacciones a esta última se consideran como de poco significado, en presencia de reacciones mayores a la tuberculina aviar (Guanziroli y Cicuta, 2005). Los agentes sensibilizantes paraespecíficos son más comunes en algunas regiones que en otras, por ejemplo, en un estudio realizado para determinar la presencia de micobacterias no tuberculosas en los suelos de la Provincia de La Pampa de nuestro país, se encontraron diferencias de desarrollo dependientes de las características de textura, concentración de materia orgánica y pH de los suelos (Oriani y Sagardoy, 2002).

A modo de resumen, se presentan a continuación en la Tabla 3 las pruebas tuberculínicas utilizadas con mayor frecuencia en el diagnóstico de la tuberculosis bovina.

Tabla 3: Pruebas tuberculínicas usadas en bovinos (elaborado a partir de Torres, 2000 y Bernardelli, 2007).

Vía de aplicación	PPD usada	Dosis de PPD	Tiempo de lectura	Intervalo de aplicación entre pruebas	Interpretación de los resultados positivos
Pliegue Anocaudal interno	PPD Bovina: 1 mg/mL (35.500 UI/mL)	0,1 mL (equivale a 3.250 UI)	72 hs.	No menos de 60 días.	Reacción \geq a 5 mm (rodeo infectado)
Tabla del cuello Cervical simple	PPD Bovina: 1 mg/mL (35.500 UI/mL)	0,1 mL (equivale a 3.250 UI)	72 hs.	No menos de 60 días.	Reacción \geq a 3 mm (rodeo infectado)
Cervical comparada	PPD Bovina: 1 mg/mL (35.500 UI/mL)	0,1 mL (equivale a 3.250 UI)			Diferencia mayor a 4 mm a favor de la PPD Bovina (rodeo infectado)
	PPD Aviar: 0,5 mg/mL (25.000 UI/mL)	0,1 mL (equivale a 2.500 UI)			

Con respecto al uso de la PPD Aviar, además de utilizarse en la prueba cervical comparada para confirmar el diagnóstico de tuberculosis, se puede utilizar para determinar la infección con Map. El SENASA sugiere que un incremento mayor de 3 mm puede ser considerado positivo (Bernardelli, 2000), la OIE considera que los aumentos del grosor de la piel superiores a 2 mm serán indicativos de la presencia de hipersensibilidad cutánea retardada (OIE, 2014). La prueba tiene valor limitado, su utilización en un rodeo indica la sensibilización de los animales a Map ó al complejo *Mycobacterium avium* y por ello se propone que deberá ser utilizada solamente como un test preliminar a la iniciación de un programa de control de la paratuberculosis (Bernardelli, 2000).

En un estudio, en el que se usó johnina en las pruebas intradérmicas con ganado bovino, la especificidad de la prueba cutánea fue del 88,8% a un valor de corte \geq a 2 mm, 91,3% a un valor de corte \geq a 3 mm y de 93,5% a un valor de corte \geq a 4 mm. No se determinó el efecto de estos valores de corte sobre la sensibilidad. El rendimiento de esta prueba también puede estar afectado de modo significativo por pequeñas diferencias antigénicas en los diferentes lotes de antígeno (Kalis y col., 2003).

1.8.3. Efectos de la aplicación intradérmica de la PPD

Cuando se aplica la tuberculina se obtienen efectos locales y sistémicos. El efecto local se manifiesta cuando se inocula la PPD Aviar en forma intradérmica en los animales que se han sensibilizados previamente, por haber tenido contacto con la micobacteria. El aumento de espesor de la piel ocurre principalmente debido al edema inflamatorio contenido por una malla de fibrina depositado alrededor de los haces de colágeno de la dermis reticular presente en la zona inoculada. En el lugar de la inyección, el grosor de la piel aumenta, este incremento es máximo posterior a las 72 horas de la aplicación (Sikes y Groth, 1950; Lepper y col., 1977; Francis y col., 1978a; Körmendy, 1988; Gilot y Cocito, 1993; Doherty y col., 1996).

En las primeras horas no se observan modificaciones apreciables en el lugar de inyección, pero luego se instala una vasodilatación con aumento de la permeabilidad vascular, con eritema e inflamación, que tiene como característica especial su dureza. La interpretación de los resultados de la prueba cutánea resulta complicada por la falta de acuerdo sobre los criterios de interpretación. Microscópicamente la lesión presenta en las primeras cuatro horas una acumulación celular transitoria de neutrófilos y linfocitos T a nivel perivascular, pero a las doce horas pasan a ser principalmente mononucleares (monocitos y linfocitos T) y aumento en los niveles de interleuquina 2. La reacción tuberculínica es una reacción inmunológica específica mediada por linfocitos T. Estas células sensibles a los antígenos que se encuentran en la circulación, entran en contacto con el antígeno inyectado, respondiendo al mismo por movilización de otros linfocitos y por división, diferenciación y liberación de linfoquinas. En el sitio de la inoculación tuberculínica, se acumula el producto de la multiplicación de los linfocitos y de nuevas generaciones de células linfocitarias. Los macrófagos fagocitan el antígeno inyectado y finalmente lo destruyen, desapareciendo así el estímulo para que continúe la producción de linfoquinas, con lo cual los tejidos vuelven al estado normal (Doherty y col., 1995; Doherty y col., 1996; Platt y col., 1983; Beck y col., 1988; Torres, 2012).

Las pruebas tuberculínicas deben ser aplicadas a intervalos no menores de sesenta (60) días, ya que el sitio alrededor del tejido inoculado previamente con la tuberculina puede estar temporalmente desensibilizado. Se ha demostrado que inyecciones cutáneas repetidas en períodos inferiores de tiempo, causa una pérdida progresiva de la respuesta originando reacciones menos marcadas o haciendo a la zona insensible durante 6-8 semanas. Esta situación debería tenerse en cuenta a la hora de confirmar la situación de un animal ya que puede ser considerado erróneamente como negativo (Paterson, 1959; Ritchie, 1959; Coad y col., 2010; Good y col., 2011b).

No ha sido demostrado que la actividad biológica de la PPD sea debida a un solo componente antigénico específico, pero se conoce que distintas fracciones en varias

especies tienen igual potencia biológica. Debido a que las micobacterias contienen componentes antigénicos comunes, existen respuestas cruzadas, es decir, producidas por sensibilizaciones a una micobacteria diferente a aquella con la que se preparó la PPD. Así hay micobacterias que pueden originar en el ganado bovino, reacciones débiles a las tuberculinas bovina y aviar; son micobacterias denominadas escotocromógenas, de rápido desarrollo (Bernardelli, 2007).

En el diagnóstico de la tuberculosis en bovinos se observó que a mayor dosis de la PPD bovina aplicada en forma intradérmica, se obtenían reacciones más grandes en los animales infectados, pero no se observa esta diferencia en los animales sin infectar (Francis y col., 1978b; Thurston y col., 1966).

Además del efecto local también se puede producir, luego de la aplicación intradérmica de la PPD Aviar, un efecto sistémico, que se puede presentar con aumento en la temperatura corporal, cambios sanguíneos por alteración en la relación de los neutrófilos con los linfocitos, cambios en las inmunoglobulinas y en otras proteínas séricas. Los trabajos científicos que describen los efectos sistémicos de la aplicación de la tuberculina son escasos y se refieren principalmente a la tuberculosis (Gradmann, 2005; Cross y col., 1991; Palmer y col., 2006; Körmendy y col., 1990; Kopecky y col., 1971).

Los primeros esfuerzos en la detección de la tuberculosis en el ganado bovino se basaron en el examen físico, incluida la auscultación, percusión, termometría clínica y palpación de la glándula mamaria y de los ganglios linfáticos superficiales. A pesar del hecho de que había muchos animales con tuberculosis clínica, la remoción de los mismos no tenía efecto en la prevalencia de la enfermedad. En 1882 y 1890 Robert Koch describe el bacilo de la tuberculosis y la tuberculina, respectivamente; esta última ahora conocida como tuberculina vieja de Koch. Posteriormente se supo que se la podría usar para diagnosticar la tuberculosis en las personas. Las inyecciones de la tuberculina en individuos infectados fueron seguidas por episodios de fiebre, escalofríos y vómitos los cuales duraban varias horas, tales síntomas no ocurrían en los sujetos no tuberculosos. La técnica fue adaptada

para su uso en los bovinos cuando se descubrió que los animales tuberculosos presentaban una respuesta térmica seguidas a las inyecciones subcutáneas de 0,2 – 0,5 mL de tuberculina (Monaghan y col., 1994).

En ciervos se pudo observar después de la aplicación intradérmica de tuberculina un aumento en la concentración en el plasma sanguíneo de proteínas de fase aguda como el fibrinógeno (Cross y col., 1991).

Otros efectos sistémicos descritos son el incremento en la respuesta al interferón gamma después de la inyección de la PPD en los animales infectados con *M. bovis* tres a siete días después de la inoculación, pero no en los animales controles no inoculados; la prueba tuberculínica también resultó en un aumento de los anticuerpos (efecto booster) contra los antígenos MPB83 y ESAT-6 presentes en la PPD, pudiéndose observar una correlación directa entre los niveles de anticuerpos y la severidad de la enfermedad (Palmer y col., 2006; Lyashchenko y col., 2004; de la Rúa-Domenech y col., 2006).

La importancia de conocer estos efectos sistémicos pos inoculación de la PPD en los animales enfermos radica en que mejora la sensibilidad de las pruebas de interferón gamma y las pruebas que detectan anticuerpos. Probablemente la detección de este efecto sistémico en los animales enfermos de paratuberculosis posteriormente a la inoculación de la PPD Aviar, pueda en un futuro cercano complementar el diagnóstico de esta patología.

1.9. Objetivos del presente plan de tesis

Las características complejas de la inmunopatogenia de la paratuberculosis bovina y siendo el diagnóstico el pilar fundamental en el que se apoya el control de esta enfermedad, plantea un desafío arduo que es el de optimizar el uso de los métodos diagnósticos. Además, el aislamiento por medio del cultivo de Map que es la prueba de referencia, necesita requerimientos especiales, es lento y en muchas ocasiones los animales infectados no liberan por materia fecal cantidades detectables de micobacterias durante muchos años.

Por estas razones, en el presente plan de tesis nos propusimos trabajar en los rodeos bovinos libres de tuberculosis, con el uso de rutinas que utilicen la prueba tuberculínica intradérmica con PPD Aviar para diagnosticar la paratuberculosis en la categoría de animales jóvenes, a continuación se plantean los objetivos planteados:

1.9.1. Objetivos generales

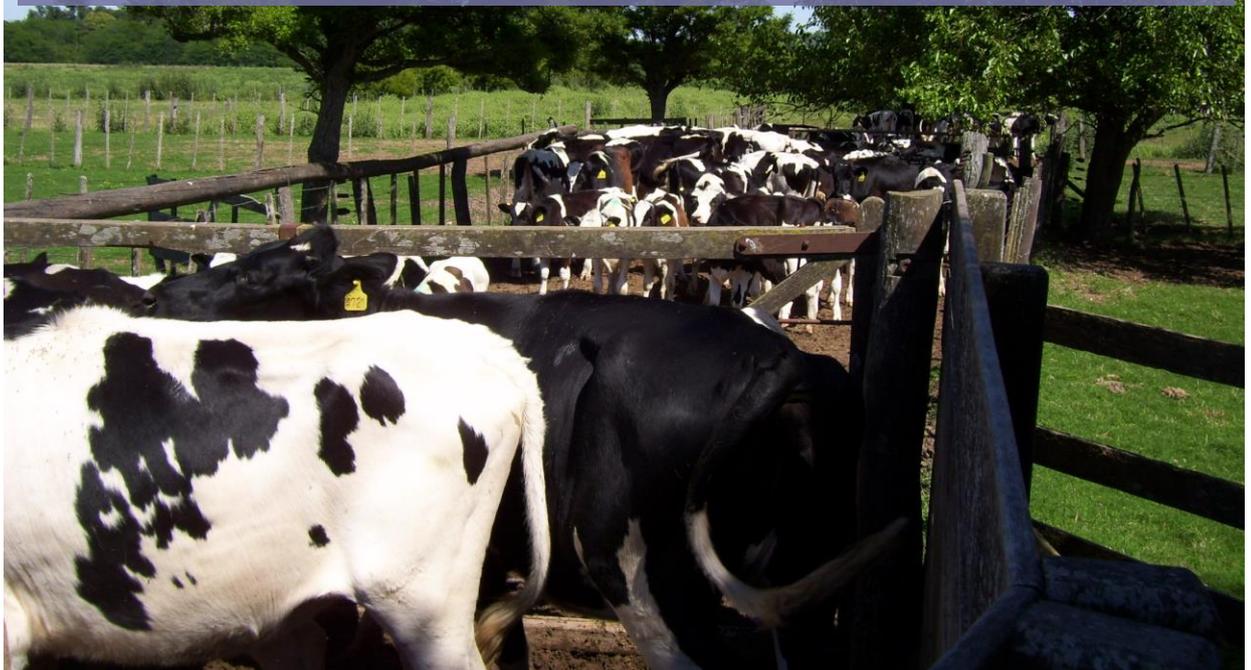
1. Estudiar el impacto del uso de la PPD Aviar en el diagnóstico de la paratuberculosis bovina en los animales jóvenes, por representar una categoría especialmente dificultosa en el diagnóstico, y por el alto impacto que tendría en el control de la transmisión del agente causal.
2. Estudiar el efecto local y sistémico en animales jóvenes enfermos de paratuberculosis y en animales jóvenes sanos de la aplicación de la PPD Aviar.

1.9.2. Objetivos particulares

1. Comparar el efecto local de la aplicación intradérmica de la PPD Aviar con distintas concentraciones (0.5 mg/mL - 2mg/mL) en el tercio medio del cuello y en el pliegue anocaudal interno en animales jóvenes.
2. Evaluar el efecto sistémico de la aplicación intradérmica de la PPD Aviar en la respuesta inmune humoral en animales jóvenes, enfermos y sanos, detectado con la prueba de ELISA y AGID.
3. Evaluar el efecto sistémico de la aplicación intradérmica de la PPD Aviar en las proteínas del suero sanguíneo de los animales sanos y enfermos.

2. Materiales y métodos

*"El talento gana partidos, pero el trabajo en equipo
y la inteligencia, gana campeonatos"*
Michael Jordan.



2.1. Animales

Se buscaron rodeos bovinos con reposición propia, sin signos clínicos compatibles con paratuberculosis y rodeos naturalmente enfermos. En ambos casos, para confirmar el estatus sanitario con respecto a esta enfermedad, se realizaron análisis serológicos con prueba de ELISA y AGID, además de cultivo de muestras de materia fecal en medios de cultivo de Herrold con micobactina. Los rodeos naturalmente enfermos poseían animales con signos clínicos compatibles de paratuberculosis, en estos bovinos se comprobó la presencia de esta enfermedad con pruebas serológicas y, como confirmatorio, se realizó el cultivo de la materia fecal de los animales positivos a la serología.

Al llevar a cabo los primeros estudios en los distintos establecimientos, y por una cuestión de disponibilidad limitada de insumos, se realizaron la mayor cantidad de toma de muestras seleccionando los animales al azar, de manera aleatoria estratificada. De esta forma, a partir de los grupos en los que se separaba a los animales en cada establecimiento, por ejemplo: recría 1, 2 y 3, vacas secas, vacas preñadas, vacas paridas, etc; se eligió aleatoriamente a los animales participantes de los muestreos (Corva y col., 2010).

En todos los casos se trabajó con rodeos pertenecientes a establecimientos ubicados en la provincia de Buenos Aires.

Originalmente al iniciar los trabajos a campo, y tomando en cuenta que los animales hijos de positivos tienen mayor probabilidad de estar enfermos y que los hijos de animales negativos tienen menor probabilidad de estar enfermos, se planteó la selección al azar de aproximadamente 20 hembras negativas a la serología y 20 hembras positivas a la serología y se trabajó con sus hijos, animales entre los 4 y 15 meses de edad, los cuales fueron divididos en los siguientes lotes:

1. Lote de hijos de madres positivas tuberculinizados: conformado por 10 animales.
2. Lote de hijos de madres positivas no tuberculinizados: conformado por 10 animales.

3. Lote de hijos de madres negativas tuberculinizados: conformado por 10 animales.

4. Lote de hijos de madres negativas no tuberculinizados: conformado por 10 animales.

De todos estos animales se tomaron muestras de sangre para realizar las pruebas de ELISA y AGID y se cultivó la materia fecal en el medio de cultivo de Herrold con micobactina; además se efectuaron pruebas para medir la concentración de fibrinógeno y de haptoglobina plasmáticas, siguiendo el cronograma de actividades propuesto. En la Figura 10 se presenta un esquema del tipo de estudio epidemiológico experimental propuesto en este plan de tesis.

Sin embargo, transcurrido el primer año de actividades realizadas con los animales y debido a la presencia de problemas inherentes al manejo de los mismos, y a situaciones limitantes en los establecimientos elegidos para participar en estos estudios, se consideró necesario aumentar el número de animales de estos lotes para disminuir el riesgo de pérdida de información y para fortalecer estadísticamente los resultados. De esta manera se decide conformar distintos lotes a partir de grupos de bovinos que, de acuerdo a la prevalencia aparente de paratuberculosis, se denominaron “rodeo positivo” (constituido por dos rodeos lecheros) y “rodeo negativo” en donde se practicaron todos los análisis programados previamente.

En los rodeos lecheros que participaron en este trabajo, se lleva a cabo regularmente el control de tuberculosis bovina, siendo confirmada su condición de libre a esta enfermedad por SENASA al momento en el que nosotros iniciamos nuestros ensayos. El rodeo considerado negativo se trata de un rodeo de cría que no presentó reactantes a la prueba tuberculínica bovina, no confirmada por SENASA.

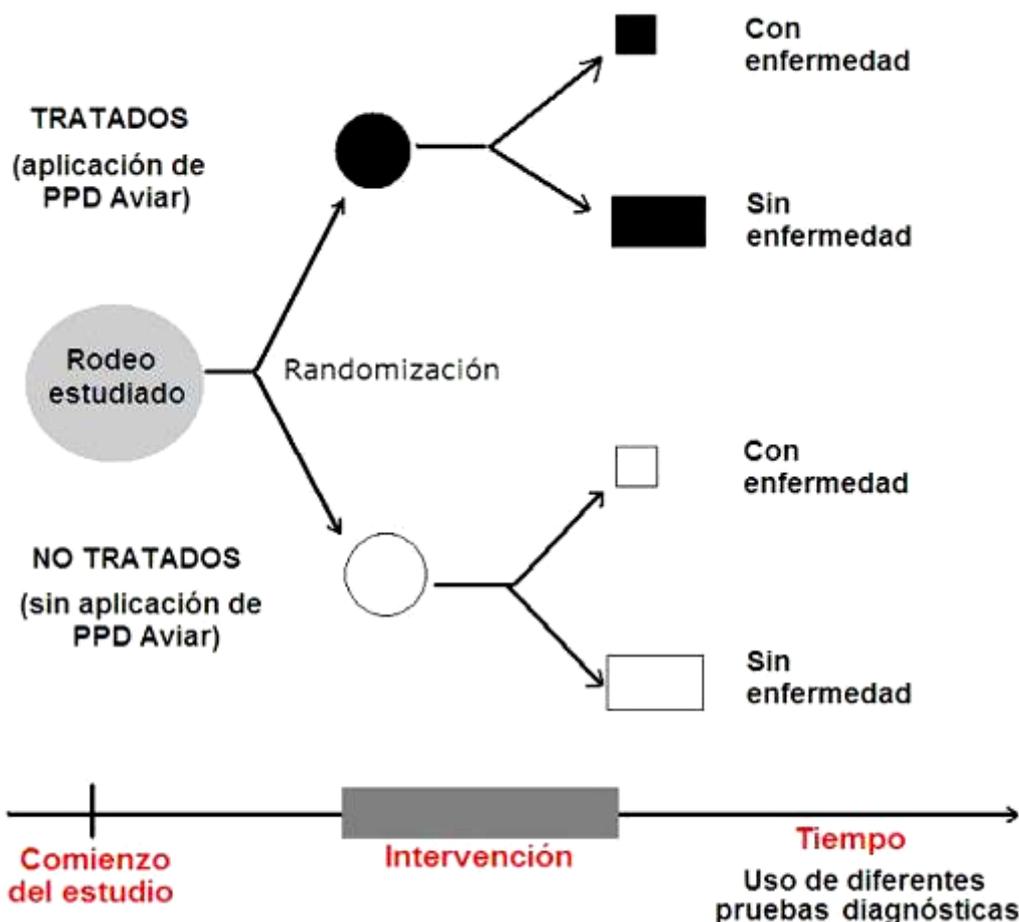


Figura 10: Esquema del tipo de estudio epidemiológico experimental realizado. Se muestra como a partir del rodeo estudiado (negativo o positivo a la presencia de paratuberculosis) se generaron los lotes de estudio y el uso de diferentes métodos de diagnósticos posteriores a la aplicación de la PPD Aviar de acuerdo al cronograma propuesto. Adaptado de Veterinary Epidemiology-An Introduction. Pfeiffer, 2002.

2.2. Tuberculinización con la PPD Aviar

Esta técnica se basa en la inoculación intradérmica de la tuberculina o PPD Aviar para determinar la hipersensibilidad de tipo retardada. Esta prueba se llevó a cabo usando PPD Tuberculina Aviar DILAB-SENASA, serie N° 17, 18 y 19 de concentración 0,5 mg/mL, 25.000 UI/mL, con fecha de vencimiento septiembre de 2011; noviembre de 2013 y septiembre de 2015 respectivamente. Además se utilizó PPD Tuberculina Aviar DILAB-SENASA concentrada (5X), serie 17, con una concentración de 2 mg/mL. Previamente a la inoculación, se mide con un calibre el grosor de un pliegue de la piel, se inyecta PPD Aviar en forma intradérmica en el área medida y a las 72 horas de la inyección se vuelve a medir

el engrosamiento de la piel en el sitio de la inoculación, la interpretación se basa en la observación del incremento del grosor de la piel (Francis y col., 1978a y 1978b; OIE, 2014).

La aplicación intradérmica se efectuó con una jeringa semiautomática McLintock (Figura 11) la misma está diseñada para cargar hasta 20 dosis, cada una de un volumen de 0,1 mL. Ensayos previamente realizados por el Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET) de la Universidad Complutense Madrid en 2011 para analizar, entre otras variables, la precisión de los volúmenes de cada aplicación de esta jeringa, demostraron que en el primer y el último disparo de cada carga los valores eran más altos y más bajos que el resto, respectivamente. Por lo tanto, en todos los ensayos realizados no se utilizaron dichas descargas.

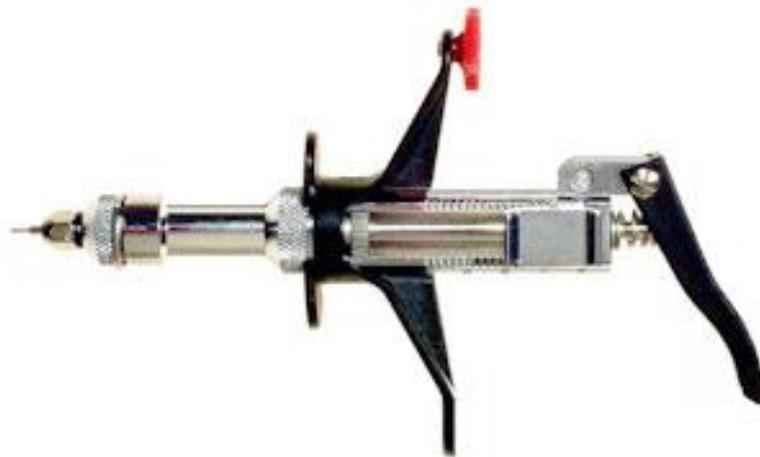


Figura 11: Jeringa semiautomática McLintock utilizada en la aplicación intradérmica de la PPD Aviar. Imagen obtenida del sitio web <http://www.bkmclintock.com/>

Al realizar cada aplicación se logró observar o percibir al tacto en el punto de inoculación, un leve aumento del espesor de la piel; (Figura 12) de no presentarse, se interpretaba que la inyección no se había aplicado correctamente y se repetía la maniobra.



Figura 12: En A se observan en la tabla del cuello dos lugares de aplicación de la tuberculina; mientras que en B también se logra apreciar el sitio de inoculación en el pliegue anocaudal derecho.

Durante el desarrollo de este plan de tesis se realizó el estudio de la aplicación de la PPD Aviar realizando variaciones en:

- a. Vías de aplicación
- b. Uso de diferentes concentraciones de PPD Aviar
- c. Intervalo entre cada aplicación y número de inoculaciones

En los primeros estudios se inocularon intradérmicamente dos concentraciones diferentes de PPD Tuberculina Aviar DILAB-SENASA: 0,5mg/mL y 2 mg/mL, comparando los resultados de las distintas concentraciones a las 72 hs. de la inoculación midiendo los pliegues cutáneos (Steadman y col., 2002).

Las aplicaciones de la PPD Aviar se efectuaron utilizando dos lugares de inoculación: en la tabla del cuello (TC) y en el pliegue anocaudal interno (PACI). En la tabla del cuello del lado izquierdo y a nivel del tercio medio se aplicó la tuberculina de concentración de 0,5 mg/mL y aproximadamente a 5 cm por debajo y en línea recta de este punto de inoculación, se inyectó la de 2 mg/mL. En el PACI se usó un esquema similar, la tuberculina de menor

concentración se aplicó en el PACI izquierdo y en el PACI del lado derecho se inoculó la tuberculina de mayor concentración. En la Figura 13 se muestran dibujos que esquematizan los lugares de aplicación utilizados y en la Figura 12 se logra observar los puntos de inoculación luego de la inyección de la tuberculina.

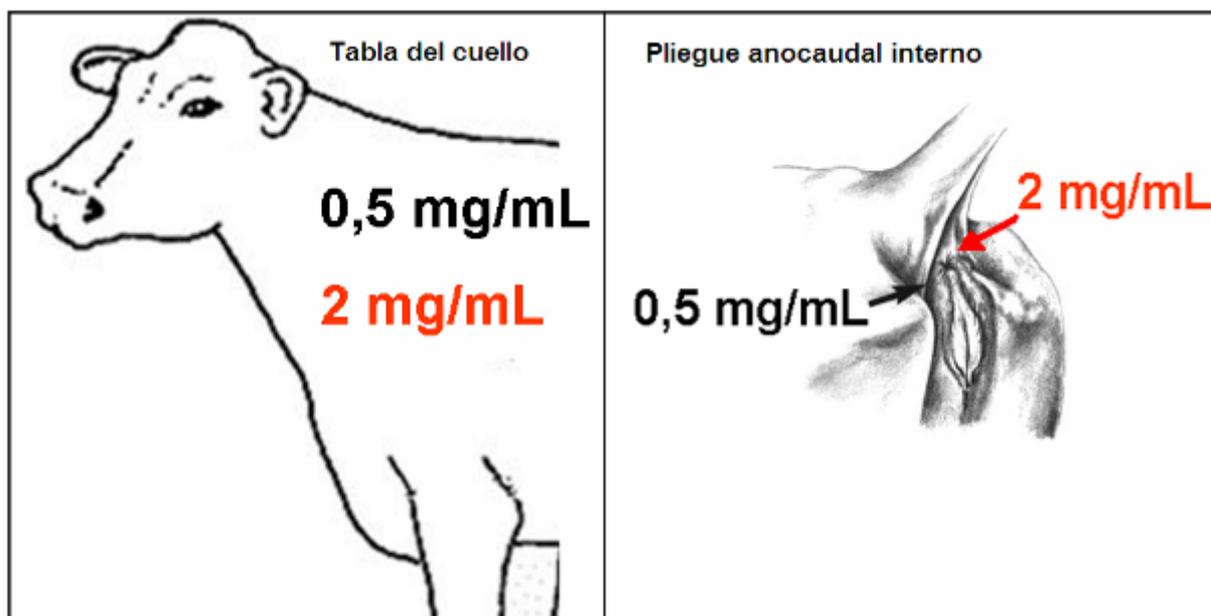


Figura 13: Esquemas de los lugares de aplicación de la PPD Aviar, a la izquierda en la tabla del cuello y a la derecha, en el pliegue anocaudal interno con las diferentes dosis de concentración de tuberculina. Dibujos adaptados y tomados de <http://vetlabel.com/lib/vet/meds/posilac>

Se registraron todas las diferencias en los pliegues cutáneos observadas y en los primeros ensayos, un animal con incremento mayor a 2 mm (Bernardelli, 2000; Pinedo y col., 2008; OIE, 2014) o a 3 mm en el pliegue cutáneo fue considerado como reactante a la prueba. Posteriormente, el valor de límite para considerar a un animal reactante a la PPD Aviar, se ajustó de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo de tesis. En la Figura 3 se muestra ejemplos de reacciones a la inoculación intradérmica de PPD Aviar.

En cada establecimiento todos los protocolos de tuberculinización con PPD Bovina quedaron a cargo de los médicos veterinarios acreditados que trabajan con esos rodeos en el control de la tuberculosis bovina. Durante el desarrollo de esta investigación solamente se

presentaron 2 reactantes en el rodeo lechero A, siendo uno de ellos posteriormente confirmado como positivo al cultivo de Map.

2.3. Cultivo bacteriológico

La materia fecal se obtuvo directamente del recto de cada animal usando un guante de tacto rectal nuevo para cada muestra. A partir de cada muestra se procesaron 2 gramos de materia fecal en tubos de 50 mL de capacidad conteniendo 35 mL de agua destilada estéril (tubo de materia fecal). Se agitó vigorosamente por 30 minutos, se dejó en reposo en posición vertical a temperatura ambiente por un período de 30 minutos para decantar las fibras vegetales en el fondo del tubo. Se tomaron 5 mL del tubo de materia fecal con una pipeta estéril a partir del borde superior de la suspensión y se transfirió a un segundo tubo de plástico cónico de 50 mL de capacidad conteniendo 25 mL de una solución inicial al 0,9% de cloruro de hexadecilpiridinio (CHP). Los tubos fueron incubados a 37°C durante 18-24 horas, luego se centrifugaron a 900 r.p.m. durante 30 minutos, posteriormente se descartó el sobrenadante y se resuspendió el material sedimentado en un mililitro de solución de antibióticos (ácido nalidíxico, vancomicina y anfotericina B) y se volvieron a incubar a 37°C durante 24 horas. Finalmente se inocularon 200 µL del culot en tubos con medio de cultivo de Herrold con el agregado de micobactina, estos tubos se incubaron a 37°C durante seis meses, siguiendo el protocolo descrito por Whitlock y col. (1991 y 2000). La utilización del CHP como decontaminante en una concentración final de 0,75% permite inhibir el desarrollo no solo de los gérmenes contaminantes comunes, sino también de otras micobacterias atípicas (Glanemann y col., 2004). La doble incubación demostró una mayor sensibilidad de detección de Map y una reducción de contaminación más efectiva (Stabel, 1997).

En el presente trabajo, solamente se cultivaron las muestras analizadas en el medio de Herrold con micobactina para favorecer el desarrollo de Map.

Durante el desarrollo de estos ensayos, además de utilizar el medio de cultivo fraccionado en tubos de vidrio, se prepararon frascos de cultivo CELLSTAR® Standard de poliestireno, libre de metales pesados, de 50 mL de volumen máximo y área de crecimiento de 25 cm², en cada frasco se agregó 10 mL de medio de Herrold y directamente se sembró 800 µL del sobrenadante de cada muestra problema. Por lo tanto, cada frasco equivale a una muestra de materia fecal de un animal.

En todos los casos los cultivos fueron observados minuciosamente a partir del primer mes de incubación para detectar la aparición de colonias y evaluar sus características fenotípicas de color y tamaño; para mejorar esta observación se utilizó lupa y luz en una incidencia tangencial a la superficie del cultivo, A partir de las colonias se realizaron coloraciones de Ziehl Neelsen para corroborar la presencia de BAAR y su disposición en grupo. Se esperó 6 meses de incubación para descartar como negativo a los cultivos.

En las Figuras 6, 14 y 15 se muestran tubos y frascos con medios de cultivo de Herrold con micobactina y el aspecto de las colonias compatibles con Map luego de transcurrido un periodo de incubación de por lo menos 2 meses y hasta 6 meses.

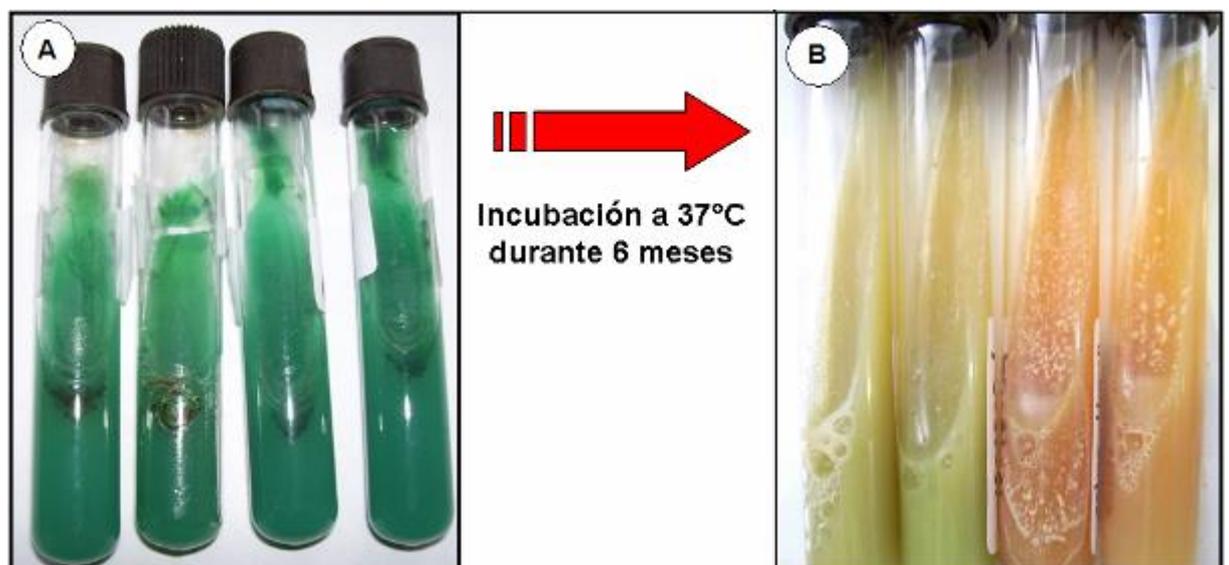


Figura 14: En A se muestran tubos de cultivo de Herrold inoculados con materia fecal bovina. En B se puede observar desarrollo en diferente cuantía de colonias con las características morfológicas compatibles con *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*.



Figura 15: Frascos de poliestireno con medio de cultivo de Herrold con micobactina, cada uno fue inoculado con muestra de materia fecal bovina. Todos los frascos presentan desarrollo de numerosas colonias compatibles con *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*.

En el ANEXO I se describe detalladamente la preparación de la solución de CHP y del medio de cultivo de Herrold con micobactina.

2.4. Bacterioscopía

Con el objetivo de lograr la observación de micobacterias en las muestras de materia fecal o de improntas obtenidas a partir de necropsias de animales con signología compatible con paratuberculosis, se realizó la coloración de Ziehl Neelsen. Los miembros del género *Mycobacterium* se tiñen muy pobremente con las técnicas clásicas de coloración a causa de la elevada proporción de material lipídico de la pared de sus somas. La coloración de Ziehl Neelsen usa un colorante concentrado, la fucsina fenicada de Ziehl, posteriormente con el agregado de calor, se tiñen de un color fucsia a las células bacterianas que son resistentes

a la decoloración con alcohol ácido (bacilos ácido alcohol resistentes o BAAR); luego se hace actuar al colorante azul de metileno, que logra contrastar y colorear a las bacterias no ácido alcohol resistentes, que se decoloraron previamente.

Esta coloración se llevó a cabo en todas las muestras de necropsia, en las de materia fecal de los bovinos participantes de este estudio, previo al cultivo bacteriológico, y en todas las colonias desarrolladas en los cultivos. Además, se realizó la coloración del material de superficie presente en aquellos medios de cultivo que no evidenciaron desarrollo de colonias después de los 6 meses de incubación, para definirlos como negativos al cultivo. Los BAAR fueron considerados compatibles con Map cuando se observaron en disposición agrupada (Figura 8).

En el ANEXO II se describe detalladamente la preparación de los colorantes y la técnica de coloración de Ziehl Neelsen utilizada.

2.5. Pruebas serológicas

Las técnicas de ELISA y AGID que se describen a continuación son pruebas que se realizan rutinariamente en el CEDIVE, lugar en donde se desarrolló el presente plan de tesis y que, en el caso particular de la prueba de ELISA, formó parte del tema de una tesis doctoral previa (Travería, 2003). El antígeno de paratuberculosis utilizado en ambos análisis es producido en el CEDIVE.

Las muestras de sangre de los animales a estudiar fueron centrifugadas aproximadamente a 3.000 rpm para la obtención del suero, estas muestras se procesaron lo más pronto posible de acuerdo a los siguientes protocolos.

2.5.1. ELISA. Las placas utilizadas se sensibilizaron con 100 μ L por pocillo de antígeno protoplasmático de *M. avium* subespecie *avium* con una concentración de 20 μ g/mL en solución buffer de carbonato 0,05 M (pH 9,6) con 0.05 % de Tween 80. Las placas con el antígeno se incubaron toda la noche en heladera a 8°C. Al día siguiente, después de lavar 3

veces con una solución bufferada de fosfatos (PBS) con 0,05% de Tween 80, se bloqueó con 200 µL por pocillo de PBS conteniendo 0,2% de gelatina bacteriológica. Las placas se incubaron durante 1 hora a 37°C, luego se lavaron 3 veces y se agregó 100 µL de los sueros controles positivos y negativos testeados previamente, y suero problema diluidos 1:520 en solución de ELISA-PBS, cada suero se cargó por duplicado y se incubaron a 37°C durante 1 hora. Posteriormente cada placa fue lavada 3 veces y se agregó 100 µL por pocillo de inmunoglobulinas anti Ig G bovina (Dako Denmark) con una dilución de 1:10.000 en ELISA-PBS. Después de incubar durante 1 hora a 37°C, las placas se lavaron 3 veces y a continuación se agregó 100µL de solución de revelado en cada pocillo. Finalmente se realizó la lectura entre los 20 y 30 minutos posteriores al agregado del revelador utilizándose un espectrofotómetro (Labsystems Multiskan® Plus) con un filtro de 405nm. (Figura 4). Para obtener un valor asociado al porcentaje de positividad de la muestra analizada en relación a los controles (PPRC) se realizó un cálculo a partir de la densidad óptica (DO) promedio obtenida en cada muestra, dicho cálculo se muestra en la Figura 16. Se consideraron como positivos a aquellos valores de PPRC iguales o superiores al 70%. (Yokomizo y col., 1970; 1983; 1984; 1986; 1991).

$$PPRC = \frac{(\text{DO } \bar{X} \text{ de la muestra} - \text{DO } \bar{X} \text{ del control negativo})}{(\text{DO } \bar{X} \text{ del control positivo} - \text{DO } \bar{X} \text{ del control negativo})} \times 100$$

PPRC: porcentaje de positividad en relación a los controles
 DO: densidad óptica
 \bar{X} : promedio

Figura 16: Fórmula utilizada en el cálculo del porcentaje de positividad de las muestras de suero analizadas por la prueba de ELISA indirecto.

Durante el desarrollo del presente plan de tesis se efectuaron algunas modificaciones a esta técnica de ELISA con el objetivo de mejorar algunos aspectos operativos de la prueba. Básicamente se trabajó sobre el protocolo original de la prueba de ELISA

previamente descrito, realizándose cambios en las condiciones de temperatura y tiempos de incubación de acuerdo al protocolo desarrollado por Cox en 1991.

Se trabajó con el mismo antígeno, pero diluido 1/486. Luego de incubar toda la noche en heladera las placas sensibilizadas fueron lavadas con solución ELISA-PBS y se las incubó con solución bloqueante durante 30 minutos en estufa a 37°C. Los sueros analizados se diluyeron 1/180 y se incorporaron luego de lavar las placas con solución ELISA-PBS. A partir de este paso todos los tiempos de incubación son de 30 minutos y las placas permanecen a temperatura ambiente, aproximadamente a 20°C. El conjugado y la solución de revelado se prepararon siguiendo el mismo protocolo del ELISA clásico.

En el ANEXO III se describe detalladamente la preparación de las soluciones y reactantes utilizados, como así también los pasos de las técnicas realizadas.

2.5.2. AGID. Para esta técnica se usó una solución de agar noble al 1% en buffer de boratos (se puede ver la forma de preparación en ANEXO IV). Con esta solución se prepararon placas de Petri de 9 mm de diámetro en las que se depositó 17 mL; se dejó enfriar hasta que adquirieran consistencia firme. Posteriormente se utilizó un sacabocado para realizar rosetas de un orificio central con 6 periféricos de 5,3 mm de diámetro y 2,4 mm de separación. En el pocillo central de cada roseta se sembró 35 µL de antígeno protoplasmático de *M. avium* subespecie *avium* (10mg/mL) y en los pocillos periféricos se sembró por triplicado el suero control positivo y los sueros problemas flanqueados por los sueros controles positivos (Sherman y col., 1984; 1989; 1990). Las placas se incubaron en cámara húmeda a temperatura ambiente de aproximadamente 20°C y las reacciones con la consecuente formación de líneas o bandas de precipitación se hicieron visibles a partir de las 24 horas de incubación. En todos los casos se interpretaron las reacciones de acuerdo a los protocolos de trabajo sugeridos por el SENASA para este tipo de pruebas serológicas.

En la prueba de AGID de paratuberculosis puede evidenciarse en algunas muestras la presencia de más de una banda de precipitado, en estos casos siempre se ratificó el resultado por la observación de la línea de identidad. En la Figura 5 se muestra un esquema y una roseta de AGID para el diagnóstico serológico de paratuberculosis. En el ANEXO IV se describe detalladamente la preparación de las soluciones y reactantes utilizados, como así también los pasos de las técnicas realizadas.

2.6. Pruebas para medir proteínas de fase aguda

Las proteínas de fase aguda (PFA) que se evaluaron fueron la haptoglobina y el fibrinógeno, las que han demostrado ser algunas de las más importantes en los bovinos (Smith y col., 2010; Eckersall y Bell, 2010, Gruys y col., 2005a y b.). En este plan de tesis se realizó el análisis de los plasmas sanguíneos extraídos de los animales en los que se aplicó la PPD Aviar. Las muestras fueron obtenidas al momento de la aplicación, en el día de lectura (luego de 72 horas de realizada la inoculación), a los 14 y, en algunos casos, a los 20 días post aplicación. En las ocasiones en donde se utilizó anticoagulante se usó heparina sódica 50.000 UI inyectable (Marca Northia®) o heparina cálcica 12.500 UI inyectable (Marca Croneparina Syntex®) a razón de 10cc de sangre en aproximadamente 50 µL de anticoagulante.

Los valores de las concentraciones plasmáticas de las PFA obtenidos se compararon con aquellos de referencia descritos en bovinos (ver Tabla 4)

Tabla 4: Valores de referencia de la concentración de las proteínas totales y las proteínas de fase aguda en los bovinos. Adaptado a partir de The Merck Veterinary Manual (2008) y de Takahashi y col. (2007)

Tipo de biomolécula	Rangos de referencia en g/dL	Valores expresados en µg/mL
PT	Entre 6-8	Entre 60.000 - 80.000
Haptoglobina	Menos de 0.000010	Entre 0-10

Fibrinógeno	Entre 0.1 – 0.6	Entre 1000 - 6000
-------------	-----------------	-------------------

Referencias. PT: proteínas totales; g/dL: gramos por decilitro; µg/mL: microgramos por mililitro.

A continuación se describen los protocolos utilizados en la determinación de la concentración de estas PFA.

2.6.1. Método colorimétrico para el dosaje de haptoglobina bovina.

Se realizó un protocolo basado en la prueba descrita por Cooke y Arthington (2012). Este método permite detectar a partir de 25,6 microgramos de haptoglobina por mililitro de plasma sanguíneo.

El fundamento de esta técnica es determinar las concentraciones de haptoglobina a partir de su capacidad peroxidante al unirse con la hemoglobina. La haptoglobina presente en la muestra de plasma del animal en estudio se encuentra libre, en la prueba se agrega hemoglobina que se conjugará con dicha haptoglobina y el complejo hemoglobina-haptoglobina se revelará *in vitro* en la prueba al utilizar peróxido de hidrógeno como revelador de su actividad peroxidante; finalmente se determina la concentración al medir la DO de cada muestra. Es importante recordar que en los bovinos sanos los valores de haptoglobina son prácticamente indetectables.

Al realizar la prueba se tomaron 5 µL de plasma a analizar, de plasma control positivo obtenido a partir de un ternero con neumonía y de agua destilada (para la determinación del blanco), y en un tubo de borosilicato cada una de las muestras fue homogenizada en 7,5 mL de solución de O-dianisidina (0,6 g/L de O-dianisidina, 0,5 g/L de EDTA y 13,8 g/L de fosfato monobásico de sodio en agua destilada; pH ajustado a 4,1). Posteriormente se añadió en cada tubo 25 µL de una solución de hemoglobina (0,3 g/L de hemoglobina bovina en agua destilada). Todos los tubos se incubaron en un baño de María

(# 2845, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) a 37 °C durante 45 minutos. Después de la incubación, se añadió a cada tubo 100 μ L de una solución recién preparada de peróxido de hidrógeno 156 mM. Todos los tubos se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalizada la incubación, se tomó de cada tubo 200 μ L y se depositaron en un pocillo correspondiente a una microplaca de poliestireno de fondo plano de 96 pocillos (Figura 17); posteriormente se realizó la lectura de DO se leyó inmediatamente a 450 nm en espectrofotómetro (Labsystems Multiskan® Plus).

A cada valor de DO se lo multiplicó por 100 para obtener los valores expresados en μ g/mL de haptoglobina. (1 μ g equivale a 0,001 miligramos)

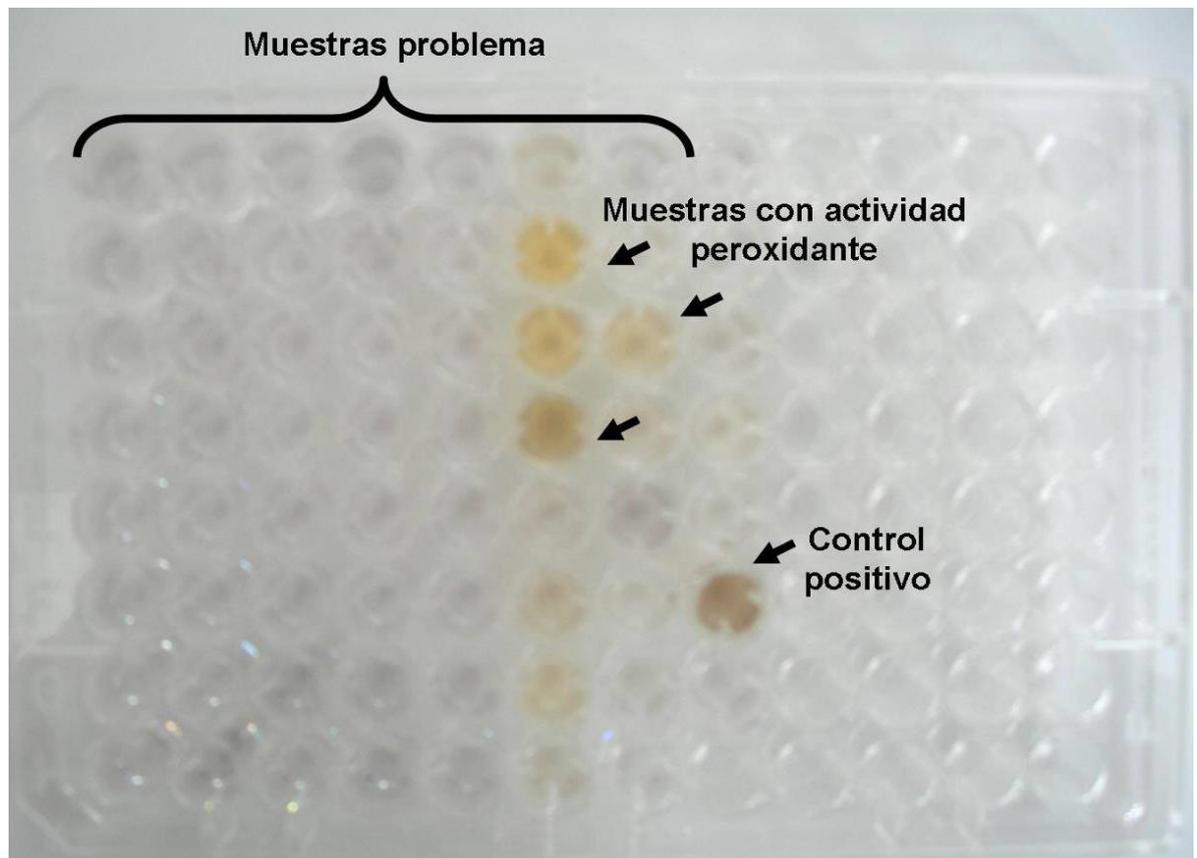


Figura 17: Microplaca de 96 pocillos utilizada para la lectura del método colorimétrico del dosaje de haptoglobina plasmática. Se señalan algunos pocillos con color que indican actividad peroxidante.

2.6.2. Determinación de fibrinógeno con el uso de refractómetro. Para la medición de esta PFA se utilizó un Refractómetro a mano (Arcano, hecho en China) de 3

escalas (SP para proteínas séricas en g/dL; ND para el índice de refractometría y UG para la densidad de la orina). Se siguieron las especificaciones de uso sugeridas por el fabricante (Figura 18). El rango de medición de proteínas es de 0 - 12 g/dL y mínima escala de 0.2 g/dL. En un primer momento se realizó la lectura de todos los plasmas, el valor obtenido correspondió a la concentración total de proteínas plasmáticas presente en cada muestra. A continuación se acondicionaron 100 μ L de cada plasma en tubos eppendorf y se llevaron a un baño de María (# 2845, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) a 60°C durante 10 minutos. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 12.000G por 3 minutos, utilizando una centrífuga HERMLE Z160M. Finalmente se toma el sobrenadante de cada muestra y se vuelve a llevar a cabo la lectura en el refractómetro; el nuevo valor conseguido se resta al obtenido en la primera lectura realizada, dicha diferencia equivaldrá a la concentración de fibrinógeno en el plasma. En todos los casos los valores obtenidos se expresan en g/dL.



Figura 18: Esquema del uso del refractómetro usado para la cuantificación de fibrinógeno a partir del plasma bovino. Se muestra la forma de depositar la muestra y como se realizaría la lectura con la observación de la escala que posee el aparato.

2.7. Producción de una masa adecuada de *Mycobacterium avium* subespecie *avium* para la elaboración de reactivos

Todos los antígenos utilizados en las pruebas de ELISA y de AGID derivaron de antígeno protoplasmático de *M. avium* subespecie *avium*. La cepa bacteriana D4ER fue cedida por SENASA. Para su mantenimiento y desarrollo se utilizó el medio sintético de Dorset-Henley y caldo glicerinado fraccionado en botellas de vidrio estériles, se incubó el material durante aproximadamente 3 meses para obtener una capa superficial de desarrollo bacteriano de aproximadamente 2 cm de espesor (ver Figura 19). Posteriormente se realizó la cosecha de cada botella siguiendo el protocolo previamente desarrollado (Costanzo y col., 2012).

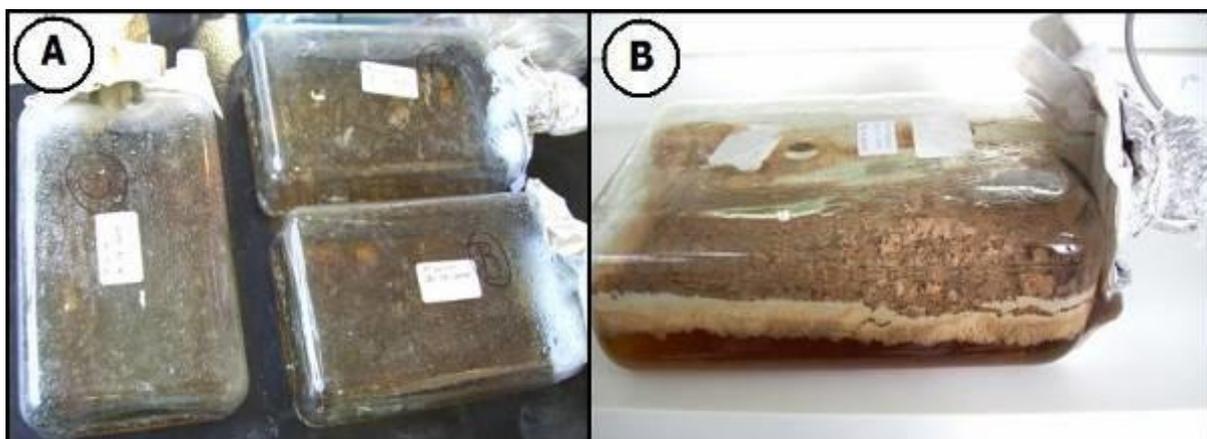


Figura 19: Producción de antígeno para reactivos de diagnóstico a partir del cultivo de *M. avium* subespecie *avium*. En A, botellas con caldo glicerinado en el momento de la siembra. En B, botella con desarrollo bacteriano luego de tres meses de incubación.

Finalmente se logró una concentración de 20 µg/mL en solución buffer de carbonato 0,05 M (pH 9,6) con 0.05 % de Tween 80. Esta es la concentración de antígeno que se utilizó en todas las pruebas de ELISA y AGID.

En el ANEXO V se describe detalladamente la preparación de los medios de cultivo utilizados y los pasos de la técnica seguidos.

2.8. Análisis estadístico

El presente plan de trabajo combina estudios observacionales de tipo transversal y longitudinal. Los estudios transversales o verticales, permitieron estimar la prevalencia de la paratuberculosis en los rodeos que participaron en los ensayos de esta tesis. Los estudios longitudinales o prospectivos presentan mayor complejidad en su puesta en marcha, pero aportan valiosa información al realizar el seguimiento en el tiempo de los individuos y permite estudiar sus generaciones precedentes y siguientes, además de la influencia de los factores medioambientales y de manejo. Además, los resultados obtenidos facilitaron realizar estudios retrospectivos que permitieron asociar la presencia y/o exposición de diferentes factores de riesgo, con la probabilidad de que los animales sufran de paratuberculosis.

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 sus características más relevantes.

2.8.1. Curvas de ROC. Las siglas son de las palabras en inglés: Receiver Operating Characteristic o Características Operativas del Receptor. Las curvas ROC se desarrollaron en los años cincuenta como herramientas para el estudio de detección e interpretación de señales de radar. El objetivo de los operadores de radar era distinguir 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 con una condición particular y los de aquellos que no la tienen. Por este motivo, las aplicaciones de las curvas

ROC se extendieron a múltiples sistemas diagnósticos, incluidas las pruebas de laboratorio (Robertson y Zweig, 1981).

En este caso, al utilizar este análisis se elabora un gráfico o curva que representa la sensibilidad y la (1-especificidad) de una prueba diagnóstica. Se debe recordar que la sensibilidad de una prueba diagnóstica es la probabilidad de obtener un resultado positivo cuando el individuo tiene la enfermedad. Mide su capacidad para detectar la enfermedad cuando está presente. La especificidad de una prueba 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 o gold standard de la enfermedad en la población a estudiar (Pfeiffer, 2002).

En la curva ROC se observan todos los pares sensibilidad/especificidad resultantes de la variación continua de los puntos de corte en todo el rango de resultados observados. En el eje y de ordenadas se sitúa la sensibilidad o fracción de verdaderos positivos. En el eje x de abscisas se ubica la fracción de falsos positivos o 1-especificidad.

En la Figura 20 podemos observar dos gráficos o curvas de ROC que explican el análisis de una prueba diagnóstica en función de su sensibilidad y especificidad expresada en porcentaje. Idealmente, una prueba de diagnóstico posee un 100% de sensibilidad y un 100% de especificidad, o valor 1 (sector superior izquierdo del gráfico). 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 sensibilidad y

especificidad es lineal; por lo tanto, siguiendo esa línea, al querer aumentar la sensibilidad o mayor número de positivos, proporcionalmente disminuirá la especificidad.

El dibujo de la curva ROC entre la sensibilidad y la especificidad para una típica prueba diagnóstica se ubica entre el punto ideal y la línea sin valor predictivo. Se utiliza el concepto de *área bajo la curva ROC* que permite discriminar correctamente entre individuos elegidos al azar, a los sanos y a los enfermos, o expresado de otra manera, negativos o positivos a una prueba diagnóstica (Bargueño y col., 1995). Los valores del área bajo la curva se encuentran entre 0.5 (igual al azar) y el 1 como máximo. Se suele aceptar como valor aceptable de discriminación de una prueba cuando supera el 0.7.

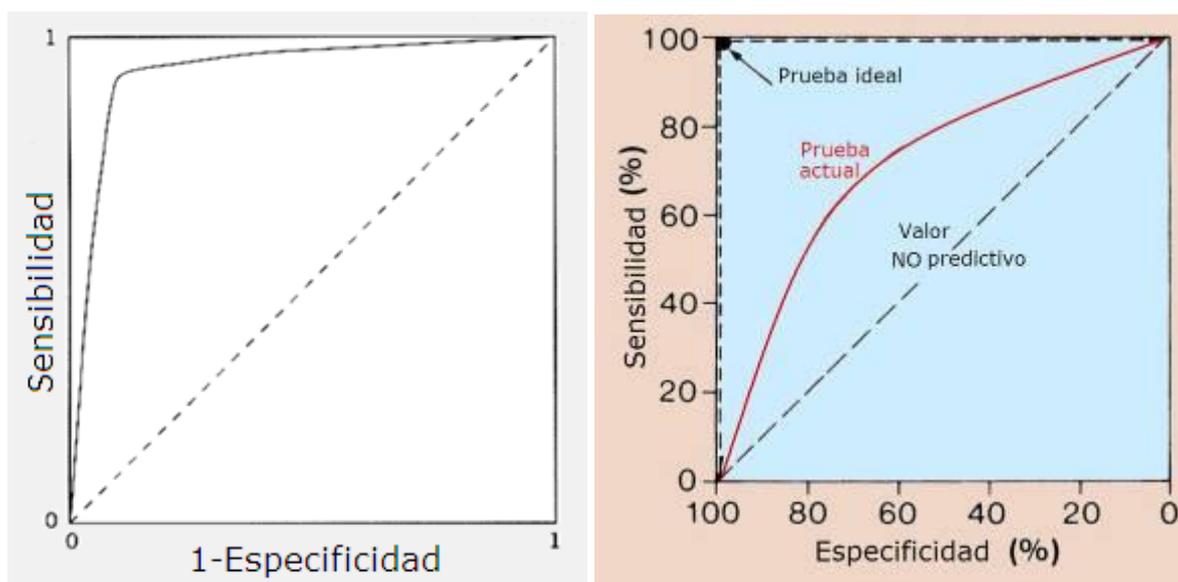


Figura 20: Curvas ROC. A la izquierda la sensibilidad y la 1-especificidad se expresan en valores entre el 0 y el 1. A la derecha otra curva con los valores expresados en porcentaje. El valor máximo de sensibilidad y especificidad se encuentra en el extremo superior izquierdo (modificado a partir de Bargueño M y col., 1995 y de <http://www.sprawls.org/ppmi2/IMGCHAR/>).

En el caso del presente estudio, se comparó la sensibilidad y especificidad de la prueba intradérmica con PPD Aviar con la prueba de referencia, el cultivo de micobacterias.

Este análisis permitió determinar los puntos de corte al considerar la diferencia de los pliegues cutáneos en la prueba intradérmica.

Para este análisis estadístico se utilizó el programa de MedCalc® versión 9.3.9.0. Además se utilizó el software R versión 3.1.2 (R Core Team, 2013) con el paquete ROCRegression versión 1 (Rodríguez-Alvarez, 2010), que permite estimar el efecto de covariables en las curvas ROC, como la edad en la que los animales son reactantes a la tuberculina y el número de repeticiones de la prueba a lo largo del tiempo, es decir en estudios longitudinales. Además este paquete acepta datos no disponibles conocidos como NA, por *not available*, este paquete trabaja con curvas ROC con análisis de regresión, permite trabajar con métodos paramétricos y no paramétricos. Las covariables pueden ser continuas o categóricas. Utiliza el método normal descrito por Faraggi (2003), el semiparamétrico desarrollado por Cai y Pepe (2002) y el paramétrico detallado por Alonso y Pepe (2002).

En este trabajo de tesis, el paquete estadístico utilizado fue enviado por la investigadora María Xose Rodríguez-Alvarez (Rodríguez-Alvarez y col., 2011a y 2011b). A continuación se muestran los modelos utilizados en esta investigación:

```
fit.roc.sm <- ROCreg(method = "SM", model = c("~age", "~age"),
+ group = "status", tag.healthy = 0, marker = "PPD", data = PPD2,
+ control=controlROCreg(FPFint=NULL, nboot=100000,
resample.m="outcome", ROC.model="binormal",
+ step.h=0.1, card.T=10, est.surv="empirical"))
> plot(fit.roc.sm)
plot(fit.roc.sm,
accuracy=c("AUC", "YI", "TH"))
```

```
fit.auc.sm <- ROCregAUCci(method = "SM", model = c("~Inter1", "~Inter1"),
+ group = "status", tag.healthy = 0, marker = "PPD", data = PPD2)
```

```

> plot(fit.auc.sm$data$Inter1, fit.auc.sm$AUC, xlab="Inter1", ylab="AUC",
+ ylim=c(0,1), xlim=c(0,20),type="l", lwd=2)
> lines(fit.auc.sm$data$Inter1, fit.auc.sm$AUC.l, col="red",lty=2)
> lines(fit.auc.sm$data$Inter, fit.auc.sm$AUC.ul, lty=2)
> abline(v=c(1,2,3,4,5,6),col="green")
> abline(h=0.5, col="black")

```

En el ANEXO VI se mencionan los significados de algunas abreviaciones en estas fórmulas para su mejor comprensión.

2.8.2. Prueba de χ^2 (X^2). 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 X^2 ; 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 X^2 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.

2.8.3. Prueba de T pareada. Esta prueba permite analizar uno de los diseños experimentales más comunes de “antes y después” y consiste en tomar dos medidas sobre el mismo individuo, una antes y otra después de la aplicación de un tratamiento cualquiera. La hipótesis nula sostiene que no hay diferencia entre ambas muestras; esto es, si el tratamiento no tiene efecto la diferencia de los promedios entre las medias es igual a 0 y en ese caso decimos que no hay diferencia entre ambos tratamientos. Por otro lado, si el tratamiento tiene efecto, la diferencia de los promedios antes y después del tratamiento, será diferente de cero, por lo que se rechazará la hipótesis nula. Trabaja con un intervalo de confianza del 95% (IC 95%) para la diferencia promedio, siendo el nivel de significancia de $P < 0.05$.

2.8.4. Análisis bayesiano. Para complementar el análisis de los datos presentados en esta tesis se decidió utilizar el método Bayesiano, a continuación se plantean algunas características y fundamentos de este enfoque estadístico.

La estadística Bayesiana a diferencia de la estadística frecuentista o clásica, permite priorizar el muestreo (independientemente del tamaño de la muestra) frente a la “diferencia significativa” o “valor P”. Para justificar este método se debe recordar que dada la naturaleza de los valores P, la decisión de rechazar o no una hipótesis resulta ser un reflejo del tamaño de la muestra. Obviamente, si lo que se observa es una parte muy reducida de la realidad o una muestra muy pequeña, quizás no se pueda obtener conclusión alguna; tal limitación conduce a que muchos investigadores cuyos resultados no alcanzan la esperada “significación estadística” declaren que con un tamaño mayor de muestra, lo hubieran logrado. Desafortunadamente, tampoco se puede concluir nada novedoso si se trabaja con una muestra muy grande, puesto que en tal caso el rechazo de la hipótesis nula queda virtualmente asegurado, de modo que la respuesta a la pregunta formulada depende más de los recursos de que dispongamos que del fenómeno estudiado. (Savage, 1957; Silva y Benavides, 2001)

La metodología bayesiana propone especificar un modelo de probabilidad que incluya algún tipo de conocimiento previo (*a priori*) sobre los parámetros del modelo dado. Posteriormente actualizará el conocimiento sobre los parámetros desconocidos condicionando este modelo de probabilidad a los datos observados y finalmente evaluará el ajuste del modelo a los datos y la sensibilidad de las conclusiones a cambios en los supuestos del modelo. 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; es decir, computar nuevas asignaciones condicionadas por nuevas observaciones. El teorema de Bayes es el puente para pasar de una probabilidad a priori o inicial, prueba de

hipótesis o $P(H)$, de una hipótesis H a una probabilidad a posteriori o actualizada, $P(H|D)$, basado en una nueva observación D . 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. A través de la combinación de ambas, el analista conforma entonces un juicio de probabilidad que sintetiza su nuevo grado de convicción al respecto. Esta probabilidad *a priori*, una vez incorporada la evidencia que aportan los datos, se transforma así en una probabilidad *a posteriori*.

Por lo tanto, en la estadística bayesiana además de la muestra, también juega un papel fundamental la información previa o la historia que se posee relativa a los fenómenos que se tratan de modelizar. El concepto básico en estadística bayesiana es el de *probabilidad condicional*, ya que casi todas las probabilidades son condicionales porque siempre existe algún conocimiento previo o historia de los sucesos. Para dos sucesos A y B (donde A y B son ambos sucesos posibles, es decir, con probabilidad no nula), entonces la probabilidad condicional de A dado B , como es bien conocido, se define del modo siguiente:

$$P(A|B) = \frac{P(A \cap B)}{P(B)}$$

Análogamente,
$$P(B|A) = \frac{P(A \cap B)}{P(A)},$$

de modo que, sustituyendo en la primera fórmula $P(A \cap B) = P(B|A) \cdot P(A)$, se llega a la forma más simple de expresar la regla de Bayes:

$$P(A|B) = \frac{P(B|A)P(A)}{P(B)}$$

Simplificando, lo que proclama el enfoque bayesiano es que resulta útil poder contar con un método que combine las evidencias subjetivamente acumuladas con la información

objetiva obtenida de un experimento en particular. Ocasionalmente, el investigador puede preferir no anticipar criterio alguno; en tal caso, optará por los llamados “*priors* no informativas”, es decir, elegirá la distribución uniforme como información *a priori*, lo cual equivale en esencia a dejar “que los datos hablen por sí mismos”.

Otra diferencia con el método frecuentista es que éste utiliza el “intervalo de confianza” que se interpreta en términos de repeticiones hipotéticas del estudio. Según este enfoque clásico si se repitiera muchas veces el muestreo, se aplicara el mismo procedimiento y se calcularan respectivos intervalos de confianza al 95% según las fórmulas conocidas, 95 de cada 100 intervalos incluirían al verdadero parámetro que está siendo estimado. Para los bayesianos, que admiten que se considere a la probabilidad como un grado de creencia, el enfoque correcto es diferente: se considera la curva que representa la función de densidad que se obtiene a posteriori, y si el área bajo dicha curva entre los valores X e Y es igual a 95%, entonces se puede hablar de que el verdadero valor esté entre X e Y con cierta probabilidad (por ejemplo, del 95%). Se dice entonces que (X, Y) constituye un intervalo de credibilidad al 95% o un intervalo de credibilidad bayesiana al 95% (ICB 95%) (Burton, 1994).

Particularmente, en este trabajo de investigación, para el análisis y evaluación del uso de la prueba intradérmica con PPD Aviar en el diagnóstico de la paratuberculosis bovina, se aplicó el teorema de Bayes y se obtuvieron diferentes valores probabilísticos (Pfeiffer, 2002). A continuación, a partir de lo presentado en la Tabla 5, se detallan algunos de los parámetros que se calcularon y se definen las fórmulas que permitieron su determinación

Tabla 5. Resumen de los parámetros que se pueden utilizar para el análisis de las características de las pruebas diagnósticas.

	Prueba Positiva	Prueba Negativa	Total
Enfermedad	VP (a)	FN (b)	(a + b)

No enfermedad	FP (c)	VN (d)	(c + d)
Total	(a + c)	(b + d)	N

Referencias. VP: verdaderos positivos; FN: falsos negativos; FP: falsos positivos; VN: verdaderos negativos; N: número total.

$$\text{Sensibilidad} = \text{VP}/(\text{VP}+\text{FN}) \quad \text{ó} \quad a/(a+b)$$

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

$$\text{Falso negativo} = \text{FN}/(\text{VP}+\text{FN}) \quad \text{ó} \quad b/(a+b)$$

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

$$\text{Especificidad} = \text{VN}/(\text{FP}+\text{VN}) \quad \text{ó} \quad d/(d+c)$$

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

$$\text{Falso positivo} = \text{FP}/(\text{FP}+\text{VN}) \quad \text{ó} \quad c/(c+d)$$

Es la probabilidad condicional $P(+/NE)$ de dar un resultado positivo (+) cuando no existe el evento enfermedad (E). Es llamado Error tipo I o α .

Los siguientes son parámetros "*a posteriori*":

$$\text{Valor predictivo positivo} = \text{VP}/(\text{FP}+\text{VP}) \quad \text{ó} \quad a/(a+c)$$

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

$$\text{Valor predictivo negativo} = \text{VN}/(\text{FN}+\text{VN}) \quad \text{ó} \quad d/(b+d)$$

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

Razón de Verosimilitud (Likelihood Ratio). 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 falso positivo o un falso negativo. 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 Razón de Verosimilitud ó Likelihood Ratio (LR) ó Cociente de probabilidad. Puede calcularse tanto para los resultados positivos como para los negativos.

$$LR+ = [a/(a+b)] / [c/(c+d)]$$

$$\text{ó } LR+ = \text{Sensibilidad}/(1-\text{Especificidad})$$

$$\text{ó } LR+ = P(+/E)/P(+/NE)$$

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 (+).

$$LR- = [b/(a+b)] / [d/(c+d)]$$

$$\text{ó } LR- = (1-\text{Sensibilidad})/\text{Especificidad}$$

$$\text{ó } LR- = P(-/E)/P(-/NE)$$

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 (-).

$$\text{Prevalencia real} = (a+b)/(N)$$

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

$$1\text{-Prevalencia} = (c+d)/(N)$$

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*).

$$\text{Odds a priori} = \text{Prevalencia} / (1\text{-Prevalencia})$$

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*) +.

$$\text{Odds a posteriori} + = \text{Odds a priori} \times \text{LR+}$$

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:

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

$$\text{Probabilidad Pos Prueba Negativa (PPN-)} = \text{Odds a posteriori-} / 1 + \text{Odds a posteriori-}$$

La PPP+ y la PPN- son las probabilidades de estar enfermo si los resultados son (+) o (-) respectivamente.

Estos cálculos se efectuaron con una planilla Excel (Microsoft Office Excel 2003), o utilizando los programas de libre acceso de Epidat 3.1.

Entre los métodos de análisis Bayesiano utilizados en este trabajo se encuentra el llamado *Modelo latente*, que se puede aplicar en las enfermedades que presentan latencia o que son consideradas crónicas, como la paratuberculosis; además permite trabajar con un gold standard imperfecto cuando no se dispone de esta información. Este modelo se utilizó en un trabajo publicado por Wang y colaboradores (2011) en donde a partir de un estudio longitudinal se determinan las características de una prueba de ELISA en leche y el cultivo de materia fecal en el diagnóstico de paratuberculosis, y las correlaciona con covariables como la edad y la producción láctea; este autor nos facilitó el modelo estadístico utilizado en su artículo y se adaptó para el análisis de la prueba intradérmica con PPD Aviar. El efecto de las covariables será considerado estadísticamente significativo, al nivel de $P=0,05$, cuando el ICB 95% no incluya al 0 (cero). El modelo es el siguiente y se desarrolló en el programa WinBUGS14 PACKAGE y OpenBUGS de modo indistinto.

```

model {
for (i in 1:n)
{
O[i] ~ dweib(v, lambda)
gamma[i] ~ dnorm(0,taug)
gammaz[i] ~ dnorm(0,taugz)
}
for (j in 1:m)
{
D[j]<-step(age[j]-O[id[j]])
timepc[j]<-max(age[j]-O[id[j]],0)
pr[j]<-D[j]*(p[2]-p[1])+p[1]
R[j]~dbern(pr[j])
zmean[j]<-D[j]*(mu0[2]-mu0[1])+mu0[1]+mu1*age[j]+gammaz[id[j]]
Z[j]~dnorm(zmean[j],tauz)
tmean[j]<-beta0+beta1*Z[j]+beta2*age[j]+beta2c*timepc[j]+gamma[id[j]]
T[j]~dnorm(tmean[j],tau)
}
v ~ dgamma( 0.01, 0.01 )
lambda<-exp(v*loggam(1+1/v) - v*eta)#1
eta~ dnorm( 0.0, 0.0001)
for (i in 1:2){
p[i]~dbeta(0.5,0.5)#1
}
}

```

```

mu0[i]~dnorm( 0.0, 0.0001)
}
beta0~dnorm( 0.0, 0.0001)#1
beta1~dnorm( 0.0, 0.0001)
beta2~dnorm( 0.0, 0.0001)
beta2c~dnorm( 0.0, 0.0001)
mu1~dnorm( 0.0, 0.0001)
taug~dgamma(0.01,0.01)
s2g<- 1/taug
tau~dgamma(0.01,0.01)
s2<- 1/tau
tauz~dgamma(0.01,0.01)
s2z<- 1/tauz
b<- pow(lambda,-1/v)
taugz~dgamma(0.01,0.01)
s2gz<- 1/taugz
}

```

Otra prueba Bayesiana utilizada fue el de *Diferencias de medias normal, (z) posterior* (Bolstad, 2007) que permite determinar comparar las medias de dos grupos utilizando el ICB 95% para estimar las diferencias. En estos casos, hay cuatro parámetros desconocidos: las medias M_1 y M_2 y las desviaciones estándares (DS) DS_1 y DS_2 de las dos poblaciones. Dado que, en general, es difícil establecer una distribución conjunta para cuatro parámetros, se asume que los parámetros tienen una distribución *a priori* no informativa estándar proporcional a $1/(DS_1 DS_2)$. Entonces, las medias M_1 y M_2 tienen distribuciones t de Student independientes. La distribución *a posteriori* de la diferencia entre las medias $M_2 - M_1$ tiene una forma funcional no estándar, por lo que se acude a la simulación. Concretamente: se simulan muestras independientes de un tamaño fijo acordes con las distribuciones posteriores marginales de M_1 y M_2 , después se emparejan las observaciones de las dos muestras simuladas y se toman las diferencias; entonces se obtienen los valores simulados de la distribución posterior de la diferencia de medias. El modelo de esta prueba en WinBUGS se presenta a continuación:

```

model {
for(i in 1:n1)
{
z1[i]<- (y1[i])
z1[i]<- log(abs(y1[i]+1))
z1[i] ~ dnorm(mu1,tau1) }
}

```

```

for(i in 1:n2)
{
z2[i]<- (y2[i])
z2[i]<- log(abs(y2[i]+1))
z2[i] ~ dnorm(mu2,tau2) }
mu1 ~ dnorm(100, 0.04)
mu2 ~ dnorm(90, 0.03)
mu1 ~ dnorm(0, 0.001)
mu2 ~ dnorm(0, 0.001)
tau1 ~ dgamma(0.001,0.001)
tau2 ~ dgamma(0.001, 0.001)
med1 <- mu1
med2 <- mu2
delta <- med1 - med2
aipe <- step(delta)
adpe <- (1-step(delta))
}

```

Para la determinación de las prevalencias reales y aparentes de los distintos rodeos de bovinos que participaron en este estudio, se utilizó un modelo Bayesiano previamente utilizado por otros investigadores (Mahé y col., 2008), que permite considerar valores de *priors* informativas para la sensibilidad y especificidad (dichas *priors* se calcularon previamente con el programa BetaBuster y luego se cargó el modelo en WinBUGS14). En este análisis estadístico se tomó como prueba de referencia el aislamiento de Map a partir del cultivo de materia fecal en medios de Herrold con micobactina. De esta manera, también se pudieron estimar valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos con el programa WinBUGS14, el modelo es el siguiente:

```

model{
for(i in 1:1){
y[i] ~ dbin(ap[i],n[i])
ap[i] <- se*pi+(1-sp)*(1-pi)
}
se ~ dbeta(8, 8)
sp ~ dbeta(9999, 1)
pi ~ dbeta(1, 1)
pvn <- sp*(1-pi)/((1-se)*pi+sp*(1-pi))
pvp <- se*pi/(se*pi+(1-sp)*(1-pi))
OneMinusPVN <- 1-pvn
}

```

Al analizar la influencia de la edad y estadio de la paratuberculosis en algunas características operativas de la prueba tuberculínica con PPD Aviar se trabajó con un

modelo estadístico que nos fue gentilmente facilitado por el investigador Kostoulas para ser utilizado en este estudio (Kostoulas y col., 2013). El mismo se detalla a continuación:

```

model {
for( i in 1 :N ) {
s[i] ~ dnorm(mu[i], ttau[i])
mu[i] <- b0[T[i]]+b1[T[i]]*agec2[i]+b2[T[i]]*agec3[i]
ttau[i]<-tau[1,T[i]]*agec1[i]+tau[2,T[i]]*agec2[i]+tau[3,T[i]]*agec3[i]
T[i] ~ dcat(P[agecat [i],])
}
b0[1] ~ dnorm(0.0, 1.0E-6)
b1[1] ~ dnorm(0.0, 1.0E-6) l(0,)
b2[1] <- b1[1]+theta[1] #b2[1] <- b1[1]+theta[1]
theta[1]~dnorm(0.0, 1.0E-6) l(0,)
for (j in 2:3){
b0[j] ~ dnorm(0.0, 1.0E-6) l(b0[j]-1,)
b1[j] ~ dnorm(0.0, 1.0E-6) l(b1[j]-1,)
b2[j] <- b1[j]+theta[j] #b2[j] <- b1[j]+theta[j]
theta[j]~dnorm(0.0, 1.0E-6) l(theta[j]-1,)
}
for (j in 1:3)
{
P[j,1:3] ~ ddirch(alpha[])
age[1,j]<-b0[j]
age[2,j]<-b0[j]+b1[j]
age[3,j]<-b0[j]-b2[j] #age[3,j]<-b0[j]+b2[j]
}
for (i in 1:3)
{
for (j in 1:3)
{
tau[i,j] ~ dgamma(1,1)
sigma[i,j]<-1/sqrt(tau[i,j])
s.rep[i,j]~dnorm(age[i,j],tau[i,j])
}
AUC[1,i]<-step(s.rep[i,2]-s.rep[i,1])
AUC[2,i]<-step(s.rep[i,3]-s.rep[i,1])
AUC2[1,i]<-phi((age[i,2]-age[i,1])/sqrt(pow(sigma[i,2],2)+pow(sigma[i,1],2)))
AUC2[2,i]<-phi((age[i,3]-age[i,1])/sqrt(pow(sigma[i,3],2)+pow(sigma[i,1],2)))
Se1[1,i] <-step(s.rep[i,2]-cutoff)
Se1[2,i] <-step(s.rep[i,3]-cutoff)
Sp1[1,i] <-step(cutoff-s.rep[i,1])
Se2[1,i]<-1-phi((cutoff-age[i,2])/sigma[i,2])
Se2[2,i]<-1-phi((cutoff-age[i,3])/sigma[i,3])
Sp2[2,i]<-phi((cutoff-age[i,1])/sigma[i,1])
}
}

```

En el ANEXO VII se mencionan los significados de algunas abreviaciones en las fórmulas presentadas para su mejor comprensión

3. Resultados

*"El trabajo en equipo divide el trabajo y
multiplica los resultados"*
Anónimo.



Durante el desarrollo de esta investigación se trabajó con aproximadamente 700 bovinos provenientes principalmente de establecimientos de producción láctea y de carne, todos ubicados en la provincia de Buenos Aires. Las razas de los animales eran Holando Argentino para los rodeos lecheros, y Aberdeen Angus para los dedicados a la cría. Se realizaron aproximadamente 1000 aplicaciones de PPD Aviar.

3.1. Formación de los lotes de animales a estudiar

En una primera etapa, se estudiaron bovinos naturalmente infectados con paratuberculosis pertenecientes a un establecimiento de producción láctea. El mismo presenta aproximadamente un total de 390 animales, de los cuales 180 son vacas en ordeño. De acuerdo a lo expuesto por el propietario y el médico veterinario actuante en este establecimiento, se presentaron bovinos muertos con signología aparente de paratuberculosis de manera creciente año a año durante los cinco años previos a empezar los ensayos de esta tesis. Estos animales manifestaron signos de la enfermedad como diarrea intermitente, mala condición corporal, animales con diarrea continua y muertos emaciados en lapsos de meses. Basándonos en los registros de este establecimiento con respecto a los animales muertos con signos compatibles con paratuberculosis (mortalidad) se puede observar el gráfico en la Figura 21.

Lo que demuestra este gráfico es que la cantidad de animales muertos con posibles signos de paratuberculosis fue aumentando paulatinamente año a año, llegando a alcanzar el mayor registro en el quinto año (29 animales), momento en el cual deciden la intervención del grupo de trabajo del CEDIVE. Algunas muestras de estos bovinos fueron enviadas al laboratorio, en donde se confirmó la presencia de la enfermedad a partir de la prueba de AGID y del cultivo micobacteriológico.

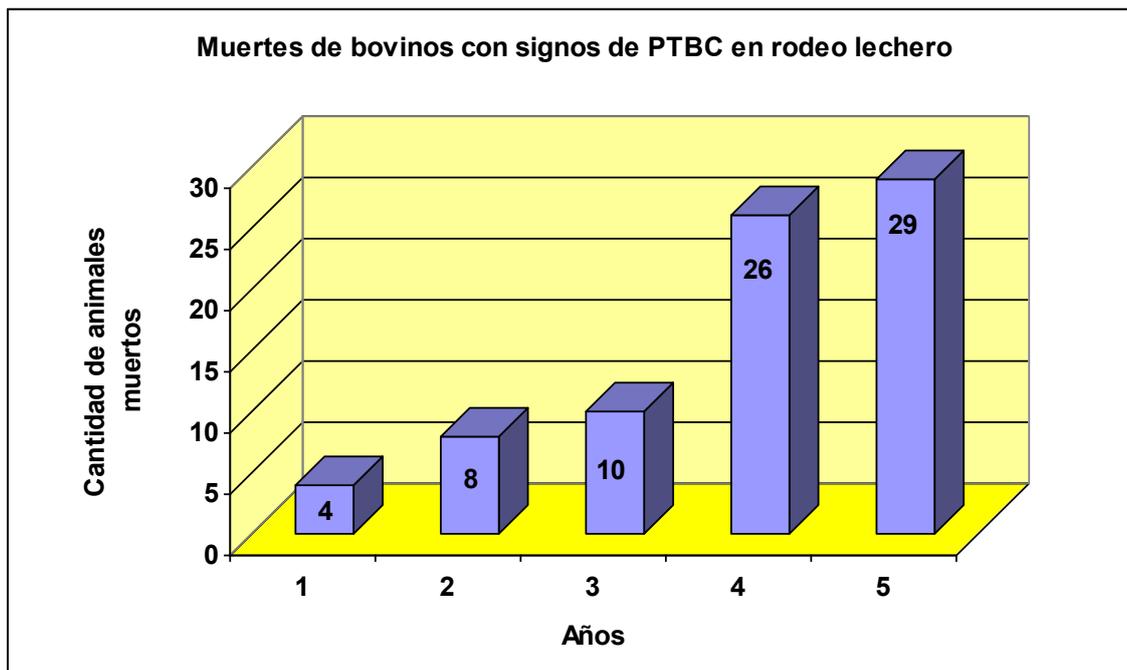


Figura 21. Registro anual de bovinos muertos con signos compatibles con paratuberculosis pertenecientes a un rodeo lechero. Estos datos se refieren a los cinco años previos a nuestro trabajo en el establecimiento.

En la primera visita al establecimiento se realizó un muestreo al azar de algunos animales mayores de 18 meses para confirmar el estatus sanitario en relación a esta enfermedad. En esta ocasión las muestras de suero fueron analizadas con la prueba de ELISA en el CEDIVE y en el INTA Castelar, la diferencia entre estas pruebas fue el tipo de antígeno, utilizándose en el CEDIVE el antígeno protoplasmático de *M. avium* subespecie *avium*, mientras que en el INTA se probó el uso del antígeno PPA-3 (Allied Monitor) y el antígeno L5P (lipopentapéptido). Además se realizaron el cultivo y coloración de Ziehl Neelsen de muestras de materia fecal; a partir de las muestras con BAAR y de las colonias desarrolladas se efectuó la prueba de PCR IS900. Los resultados fueron variados y se muestran en la Figura 22, los mismos, permitieron incluir a este rodeo como parte del lote de bovinos con paratuberculosis y fue denominado *rodeo lechero A*. Sobre un total de 85 muestras de suero analizadas con el ELISA CEDIVE se detectaron 27 positivos (31,7%), mientras que el ELISA INTA calificó como positivos a 22 animales (25,8%); por otro lado, se procesaron 95 muestras de materia fecal, observándose con la coloración de Ziehl Neelsen

la presencia de BAAR en 18 muestras (18,9%) y desarrollo de colonias compatibles con *Map* en 11 cultivos (11,5%). Finalmente, la técnica de PCR pudo realizarse a partir de 18 muestras, permitiendo ratificar la presencia de *Map* en 5 casos (27,7%), algunos de estos resultados formaron parte del trabajo publicado por Costanzo y colaboradores 2012.

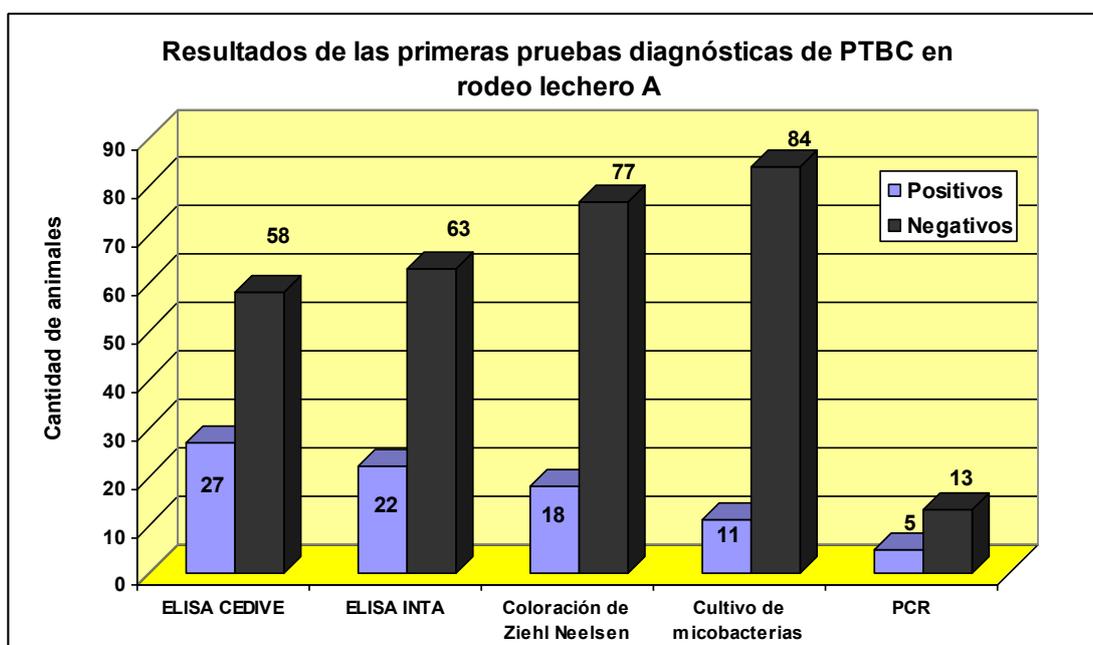


Figura 22. Cantidad de animales positivos y negativos a diferentes pruebas diagnósticas de paratuberculosis en el rodeo lechero A.

En 10 bovinos se pudo observar la existencia de más de un resultado positivo a algunas de estas pruebas. En el resto de los casos, los animales positivos solamente lo fueron a una de las pruebas ensayadas (ver Tabla 6).

Tabla 6. Animales del rodeo lechero A que presentaron una o más pruebas diagnósticas positivas a paratuberculosis en la primera visita al establecimiento.

Cantidad de animales	Pruebas diagnósticas positivas a paratuberculosis				
	ELISA 1*	ELISA 2*	ZN*	CULT*	PCR*
1	+	+	-	-	-
4	+	+	+	+	-
5	+	+	+	+	+
17	+	-	-	-	-
12	-	+	-	-	-
9	-	-	+	-	-
2	-	-	-	+	-

Referencias: ELISA 1*: ELISA CEDIVE; ELISA 2*: ELISA INTA Castelar; ZN*: Coloración de Ziehl Neelsen; PCR*: Reacción en cadena de la polimerasa IS900.

Los animales de este establecimiento se organizan en los lotes o grupos típicos de las explotaciones lecheras; siendo la ubicación de la recría 1 (animales de entre 2 a 5 meses de edad) al momento de realizar la primera visita al campo, en frente de la sala de ordeño, muy cercano a la zona llamada playa de espera (ver Figura 23). Debido a la gran cantidad de agua utilizada para el lavado y a que el drenaje de la misma, por medio de una bomba estercolera, se realizaba hacia el lugar de ubicación de estos animales, la parcela presentaba mucho barro, prácticamente todos los días. A esta situación se debe sumar la humedad generada por las lluvias y el constante pisoteo de los animales, que colaboran en mantener el suelo barroso.

Posteriormente se incorporaron a los ensayos, bovinos de otro establecimiento de explotación láctea, el mismo posee aproximadamente 460 animales, con 100 vacas en ordeño; aunque en este caso no existía un registro de los animales con signos aparentes de la enfermedad, el médico veterinario señalaba que los números de casos iban en ascenso al comparar los últimos tres años; nuevamente, algunos de estos animales se confirmaron en el CEDIVE, ya sea por la prueba de AGID o por el cultivo de materia fecal.

En una primera visita al establecimiento, se tomaron muestras de sangre a 308 animales mayores de 18 meses para realizar la prueba de ELISA, detectándose 29 animales positivos (9,4%). Basándonos en estos resultados, posteriormente se llevó a cabo el cultivo de materia fecal de estos 29 animales observándose desarrollo de Map en 10 muestras, lo que representaría un 3,2% del total de los animales estudiados. Apoyándonos en estos resultados, este rodeo fue sumado al grupo de animales positivos a paratuberculosis y fue denominado *rodeo lechero B*. A partir del momento en que este rodeo se suma al estudio de esta enfermedad, se realizan cada 6 meses la prueba de ELISA y AGID a todos los animales y a los que resultan positivos se les toma materia fecal para su cultivo y confirmación.

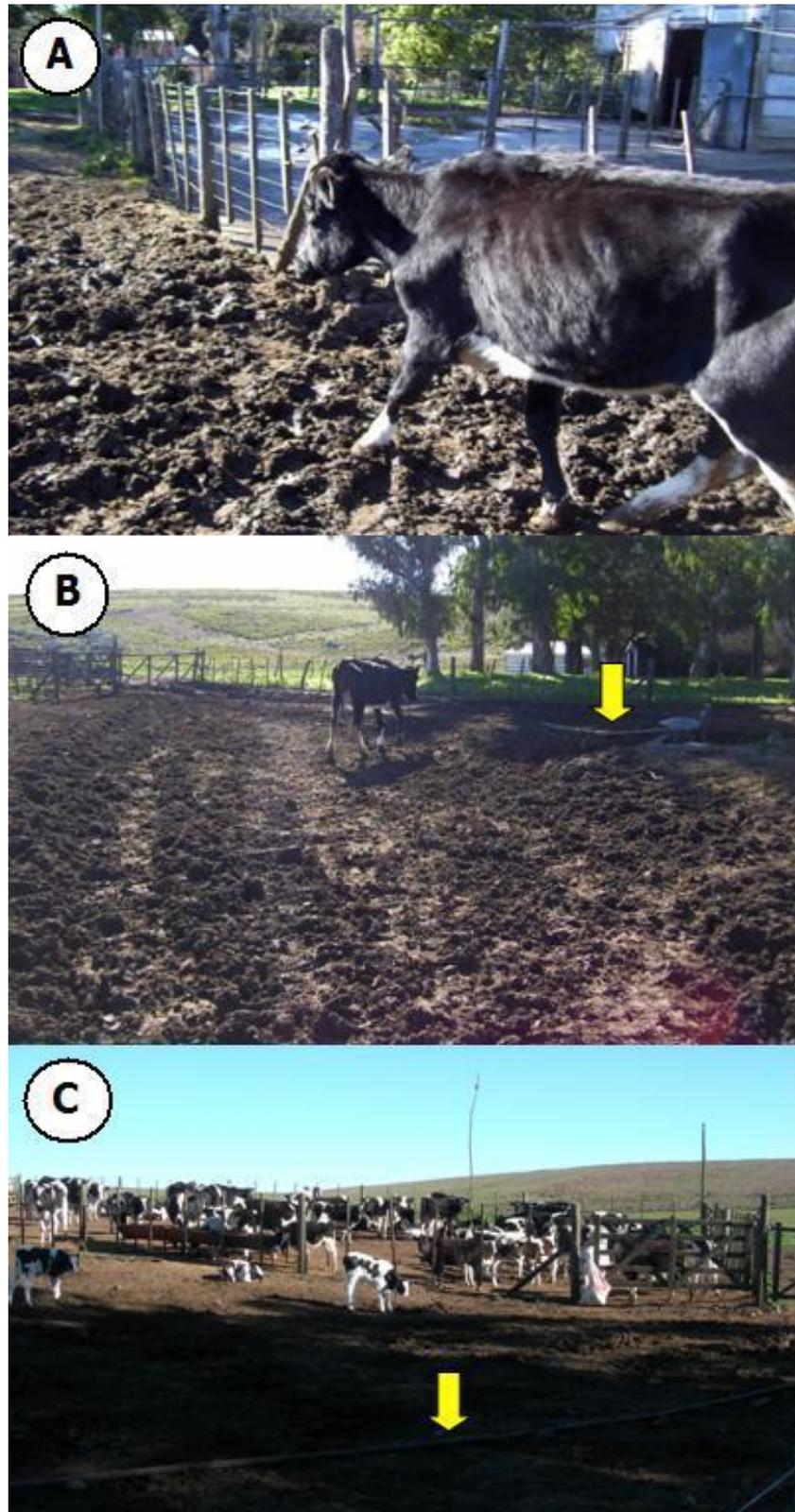


Figura 23. Características de la distribución de los lotes de recría 1 en el rodeo lechero A, En la fotografía A se muestra parte de la sala de ordeño y la playa de espera, la vaca en el primer plano estaba enferma de paratuberculosis. En B, gran cantidad de barro generada lluvias. En C se observa la presencia de los animales jóvenes cercana a estas instalaciones. Flecha amarilla: caño de desagüe de la bomba estercolera que drena en el corral de la recría 1.

En este establecimiento, los lotes donde se encuentran los animales jóvenes se ubican distantes a los lugares en donde están los adultos. Se puede trabajar con dos mangas, una para los animales más jóvenes y otra, con los de mayor edad, existiendo una distancia importante entre ambas. En la rutina de manejo, una vez paridas las vacas, permanecen junto a sus crías durante aproximadamente 24 horas.

Algunas imágenes de los sectores de este establecimiento se muestran en la Figura 24 y se comentan a continuación.

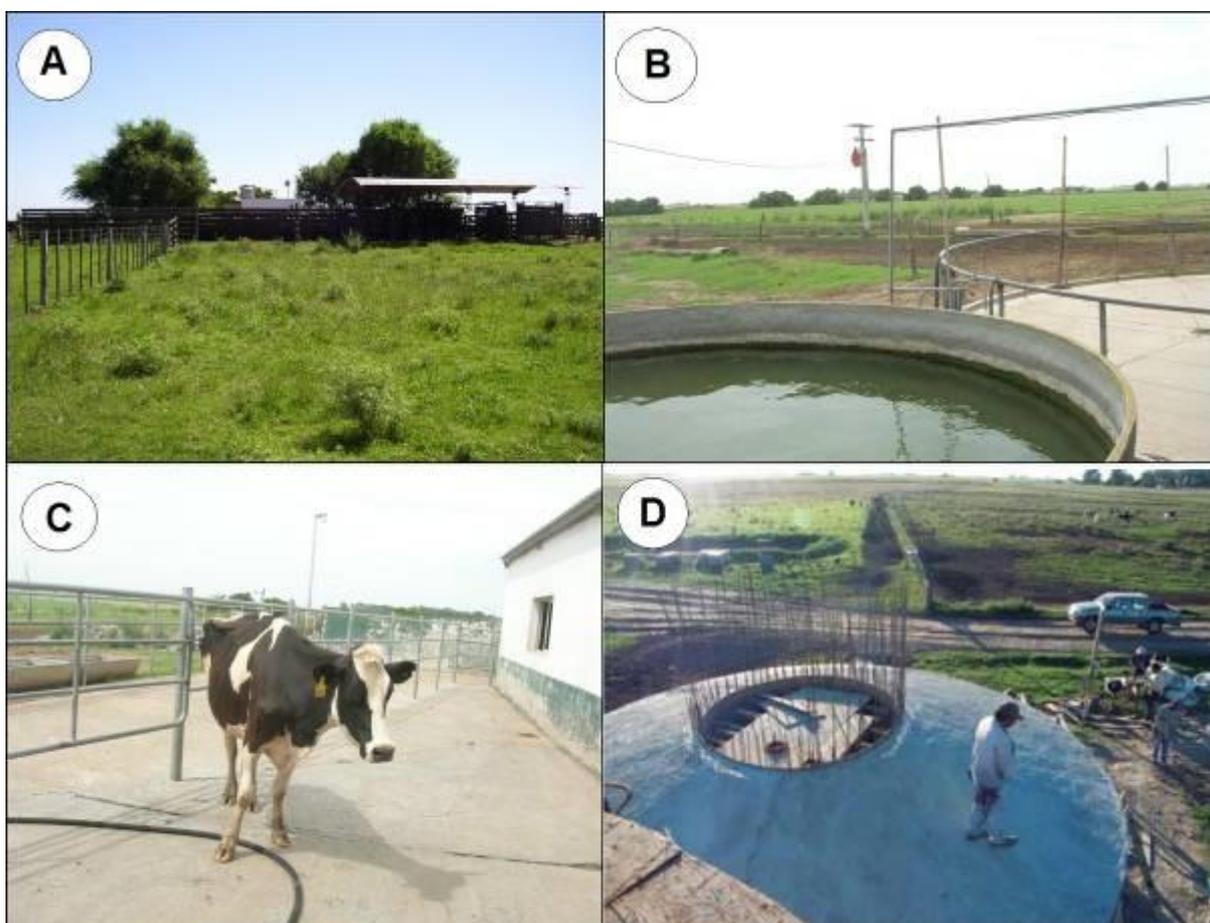


Figura 24. Características de algunos sectores del rodeo lechero B, En la fotografía A se muestra la ubicación de la manga. En B, parte de la playa de espera de la sala de ordeño. En C se muestra una vaca que estaba enferma de paratuberculosis en la playa de espera. En D, una vista del biodigestor que se está construyendo para el manejo de efluentes.

La sala de ordeño posee una playa de espera amplia y el drenaje del agua que se utiliza para la limpieza se vuelca alejado de los corrales. Actualmente se encuentra en

construcción un biodigestor experimental para el manejo de los efluentes de manera biorenovable, además se está construyendo una pista de alimentación en donde las deyecciones de las vacas se juntarán en una fosa, mediante pendiente y barrido en seco, para luego ser bombeada hacia un tanque de precalentamiento y posterior ingreso al biodigestor.

También se analizaron muestras de animales provenientes de un establecimiento sin antecedentes de padecer paratuberculosis con el objetivo de constituir un lote de animales negativos a esta enfermedad. En este caso, los bovinos pertenecen a un establecimiento de cría que posee aproximadamente 110 animales.

En una primera visita se tomaron 68 muestras de sangre y materia fecal de aquellos bovinos mayores de 18 meses; siendo la totalidad negativas para las pruebas de ELISA y cultivo de micobacterias. De esta manera, este establecimiento fue considerado como el *rodeo negativo*.

3.2. Estimación final de las prevalencias reales a partir de los cultivos positivos de Map.

En este apartado se presentan los resultados de los valores finales de las prevalencias aparentes y reales, calculadas a partir de la totalidad de los aislamientos de Map realizados a partir del cultivo de materia fecal, durante todo el desarrollo de este plan de investigación.

Se utilizó el análisis estadístico Bayesiano para estimar prevalencia real y aparente, que permite considerar valores de *priors* informativas para la sensibilidad y especificidad (dichas *priors* se calcularon previamente con el programa BetaBuster).

Los resultados obtenidos para la totalidad de los rodeos demostraron una prevalencia aparente de 18% y una prevalencia real del 28% con un ICB 95%. El cultivo de

Map presentó una sensibilidad del 57%, una especificidad del 97%, un VPP de 89% y un VPN de 85%.

Al efectuar este análisis estadístico de manera separada en cada uno de los rodeos lecheros (A y B) y en el rodeo negativo, los valores son similares en lo referente a la sensibilidad y especificidad del cultivo de Map. Los resultados fueron los expuestos en la Tabla 7. El valor predictivo positivo (VPP) fue menor en el rodeo negativo (30%), mientras que el valor predictivo negativo (VPN) en este rodeo fue el más elevado (99%).

Las prevalencias reales calculadas por este análisis estadístico se corresponden con lo esperado al momento original de constituir los grupos a estudiar, siendo de 30% para el rodeo lechero A, de 7% para el rodeo lechero B y de 1% para el rodeo negativo.

Tabla 7. Resultados obtenidos con análisis Bayesiano a partir de los cultivos positivos a Map para calcular la prevalencia real de todos los rodeos que participaron en esta investigación.

Rodeo	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)	Prevalencia aparente (%)	Prevalencia real (%)
Lechero A	57	97	90	84	19	30
Lechero B	57	97	62	96	6	7
Negativo	57	98	30	99	2	1

Referencias: VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo.

3.3. Primeros ensayos con la PPD Aviar: edades y diferencias en los pliegues cutáneos en los animales reactantes

Al trabajar con los animales pertenecientes a rodeos positivos a paratuberculosis, en un primer ensayo en el *rodeo lechero A*, se efectuó la aplicación intradérmica de la PPD Aviar con una concentración de 0,5 mg/mL en el PACI de 183 animales elegidos al azar. En esta ocasión, el rango de edades comprendido fue entre los 111 meses (poco más de 9 años) y el primer mes de vida. Se consideraron reactantes a la tuberculina a aquellos que presentaran una diferencia en el pliegue cutáneo \geq a 2 mm.

Se encontraron 33 reactantes (18%), el animal más joven tenía 10 meses de edad, mientras que el de mayor edad, poseía 44 meses (poco más de 3 años) con un promedio de 24 meses (Figura 25).

La mayor diferencia en el pliegue cutáneo fue de 18 mm y se encontró en un animal de 13 meses de edad (Figura 26). El valor de las diferencias de los pliegues cutáneos en el resto de los reactantes fue variado, siendo los valores más hallados entre los 2 y 4 mm; algunas de estas reacciones se pueden observar en la Figura 27. En relación a la diferencia de las medidas de los pliegues cutáneos encontradas, el desvío estándar (DS) fue de 2,06 y la varianza de la muestra de 4,26 (Tabla 8).

En el *rodeo lechero B* se realizó un primer ensayo con la PPD Aviar de manera semejante a la descrita en el rodeo lechero A. Se trabajó con 118 animales elegidos al azar cuyas edades oscilaban entre los 30 y 5 meses. En esta oportunidad se detectaron 13 reactantes (11,01%) con un promedio de 11 meses de edad, y siendo los extremos el de 29 y 5 meses de edad (Figura 25). La mayoría de las reacciones fueron de pocos milímetros de diferencia en los pliegues cutáneos, siendo el valor más observado el de 1 mm y las medidas extremas de 0,5 y 4 mm de diferencia. El DS fue de 0,47 y la varianza de la muestra 0,22 (ver Tabla 8).

Al realizar un primer estudio de la respuesta a la PPD Aviar en el *rodeo negativo*, se efectuó la aplicación en el PACI de 92 bovinos con un rango de edades entre 6 y mayores de 40 meses. Se encontró 1 reactante (1,08%) de aproximadamente 20 meses de edad, con una diferencia en el pliegue cutáneo de 2 mm. Al analizar estos datos el DS fue de 0,21 y la varianza de 0,04. Un resumen de todos estos datos se encuentran en la Tabla 8.

Tabla 8. Resumen de algunos datos encontrados en los animales reactantes en todos los rodeos estudiados en la primera aplicación intradérmica de la PPD Aviar de 0,5 mg/dL.

	Rodeo lechero A	Rodeo lechero B	Rodeo negativo
Reactantes a la PPD Aviar (%)	18	11,01	1,08
Diferencia/s del pliegue cutáneo más observada/s (mm)	Entre 2 y 4	1	2
Desvío estándar	2,07	0,47	0,21
Varianza de la muestra	4,27	0,22	0,04

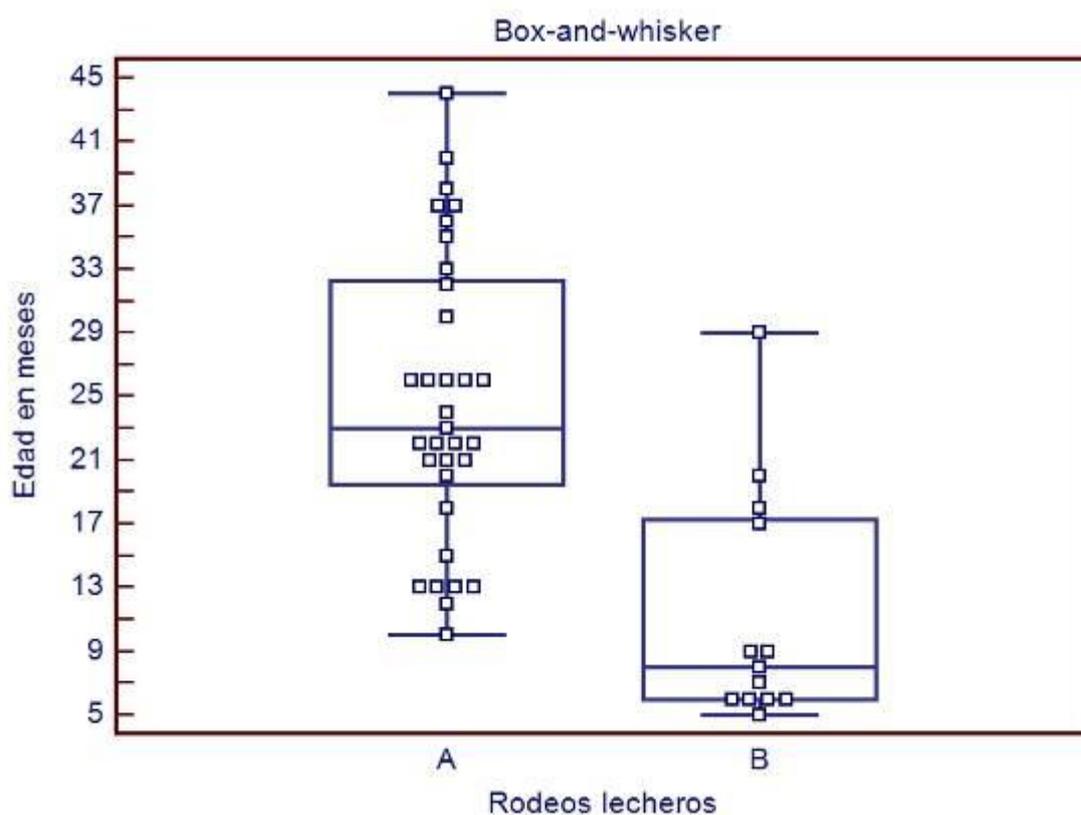


Figura 25. Primer ensayo con la aplicación de la PPD Aviar en los rodeos lecheros A y B. Se muestra las edades de los reactantes y como el rodeo B es más homogéneo en esa distribución.



Figura 26. Reacción importante a la aplicación de la PPD Aviar en el pliegue anocaudal interno izquierdo. En A medición de la respuesta con el calibre y en B, medición del pliegue cutáneo opuesto.

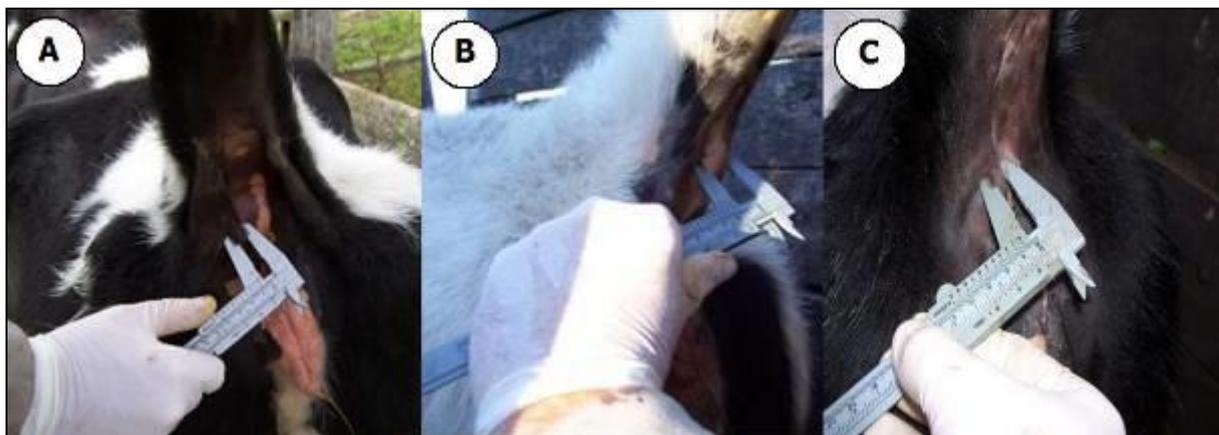


Figura 27. En A, B y C, algunas de las reacciones encontradas a las 72 horas de la aplicación de la PPD Aviar en el pliegue anocaudal interno en el rodeo lechero A.

3.4. Efecto del uso de diferentes vías de aplicación de PPD Aviar

En este ensayo se trabajó en total con 304 animales de diferentes edades (entre 4 y 72 meses) pertenecientes al grupo de animales positivos, tanto del rodeo lechero A (178 animales) como del rodeo lechero B (126 animales). Se realizó la aplicación de 0,1 mL de PPD Aviar con una concentración de 0,5 mg/mL a nivel de la TC y también en el PACI.

El resumen de los resultados encontrados se presenta en la Tabla 9. Se detectaron mayor cantidad de reactantes en la TC que en los animales que fueron inyectados en el

PACI. Al comparar con la prueba de χ^2 el número de reactantes observados de acuerdo a la vía de aplicación usada, se obtuvieron diferencias significativas ($P= 0,019$).

Tabla 9. Resultados a la aplicación de PPD Aviar de 0,5 mg/dL en la tabla del cuello (TC) y en el pliegue anocaulal interno (PACI).

Grupo	Cantidad de animales	Reactantes + solo en TC	Reactantes + solo en PACI	Coincidencias entre TC y PACI	Total de reactantes +	Total de No reactantes
Rodeo lechero A	178	22	9	33	64	114
Rodeo lechero B	126	14	3	6	23	103
Total	304	36	12	39	87	217

Al considerar los resultados de los cultivos de materia fecal de los animales participantes de este ensayo y analizarlos con la prueba de ROC, no se observaron diferencias significativas entre las dos vías de aplicación utilizadas, siendo la $P=0,14$; las áreas bajo la curva fueron para el PACI de 0,616 y para la TC de 0,668. En la Figura 28 se grafican los resultados de las curvas ROC.

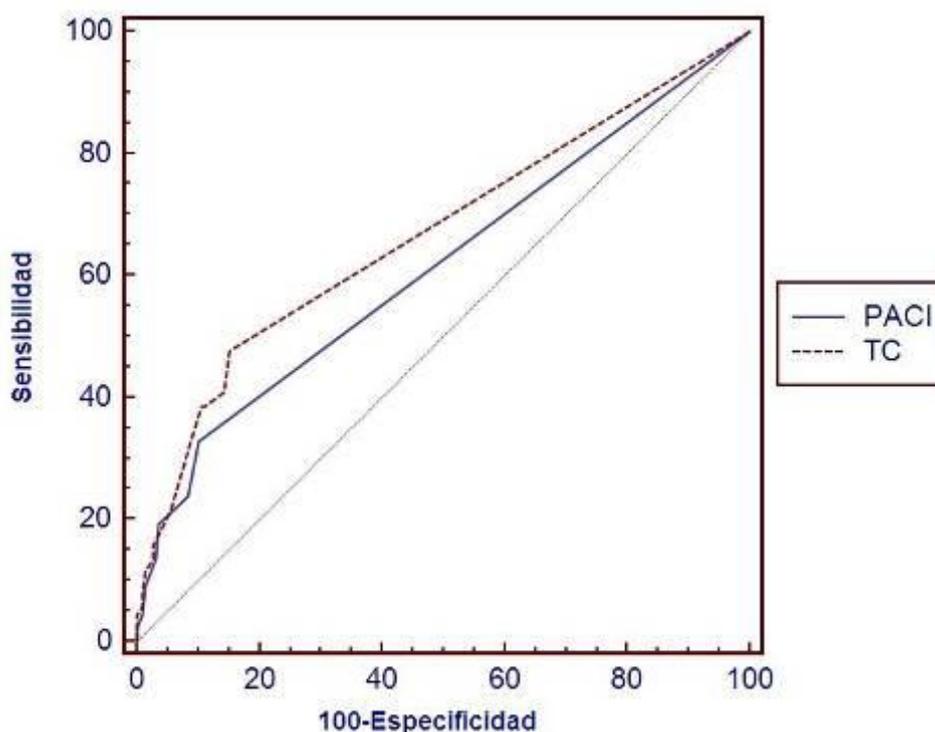


Figura 28. Curva de ROC comparando la aplicación intradérmica de la PPD Aviar de 0,5 mg/dL en la tabla del cuello (TC) y en el pliegue anocaulal interno (PACI) en relación al cultivo de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*.

Al analizar los datos de acuerdo a la edad, utilizando la prueba de Regresión Proporcional de Riesgo de Cox, se observaron diferencias en los resultados en los animales mayores de 11 meses de edad, en los que pudo encontrarse el mayor número de reactantes, principalmente en la TC. Por lo tanto, la menor cantidad de reactantes, se observó en aquellos menores de 11 meses.

3.5. Estudio de la respuesta local utilizando diferentes concentraciones de PPD Aviar

Se efectuaron diferentes ensayos con los animales de los rodeos lecheros positivos y el rodeo negativo a paratuberculosis, a quienes se les aplicó de manera intradérmica 0,1mL de dos concentraciones diferentes de PPD Aviar: 0,5mg/mL y 2 mg/mL. Después de 72 hs. se midieron los pliegues cutáneos de las distintas concentraciones de tuberculina.

Participaron en este estudio un total de 335 animales. Se realizaron 388 aplicaciones de tuberculina, habiéndose repetido las inoculaciones en algunos animales del rodeo lechero A en un intervalo de 6 meses. Al finalizar estos ensayos se determinaron 262 reactantes negativos (78,2%) y 73 reactantes positivos (21,8%). En el rodeo lechero A hubieron animales que repitieron los resultados de las reacciones.

La distribución de estos datos de acuerdo a los rodeos que participaron en este estudio se presenta en la Tabla 10.

Tabla 10. Resumen de los resultados totales obtenidos en el ensayo de aplicación intradérmica de diferentes concentraciones de PPD Aviar.

Rodeo	Reacciones	Animales	Reacciones	Animales	Total de animales
	-	reactantes -	+	reactantes +	
Rodeo negativo	78	78	3	3	81
Rodeo lechero A	107	72	84	66	138
Rodeo lechero B	112	112	4	4	116
Total	297	262	91	73	335

Con los valores de las diferencias de pliegues cutáneos de los reactantes a las diferentes concentraciones de PPD Aviar se efectuó la Prueba de Diferencias de Medias

Bayesianas utilizando los programas estadísticos de Epidat 3.1 y WinBUGS14; la diferencia de medias fue de -1,36, el SD posterior de 0,051, el ICB 95% fue de -1,460 (límite inferior) y de -1,260 (límite superior) y la $P=0,0031$, demostrando que existieron diferencias significativas entre los dos tipos de concentración.

Al analizar los resultados con la Prueba de T Pareada se confeccionaron diferentes gráficos, observándose los valores más elevados en las diferencias de los pliegues cutáneos (espesor de milímetros) en los animales inoculados con la concentración de 2 mg/mL (Figura 29).

Considerando los diferentes grupos de bovinos analizados, al contrastar las variaciones en los pliegues cutáneos de los reactantes a la prueba intradérmica se encontraron las mayores diferencias de los pliegues cutáneos en los animales de rodeos positivos, principalmente en el rodeo lechero A de mayor prevalencia (Figura 30).

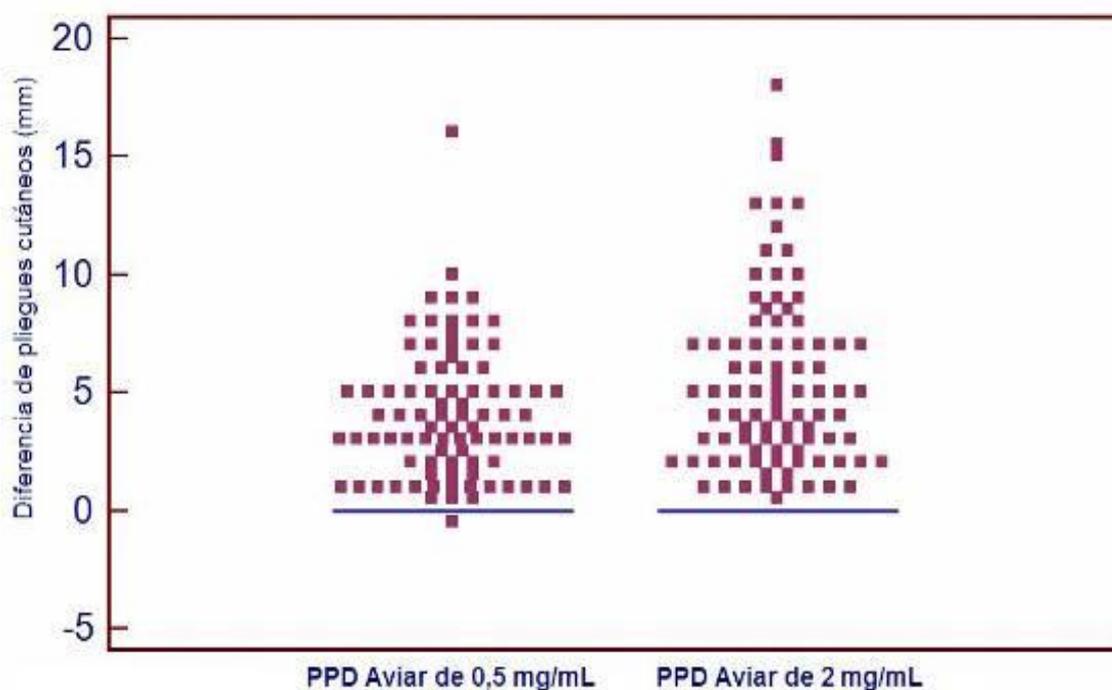


Figura 29. Gráfico caja y bigotes con la comparación de los pliegues cutáneos obtenidos al aplicar la PPD Aviar en diferentes concentraciones.

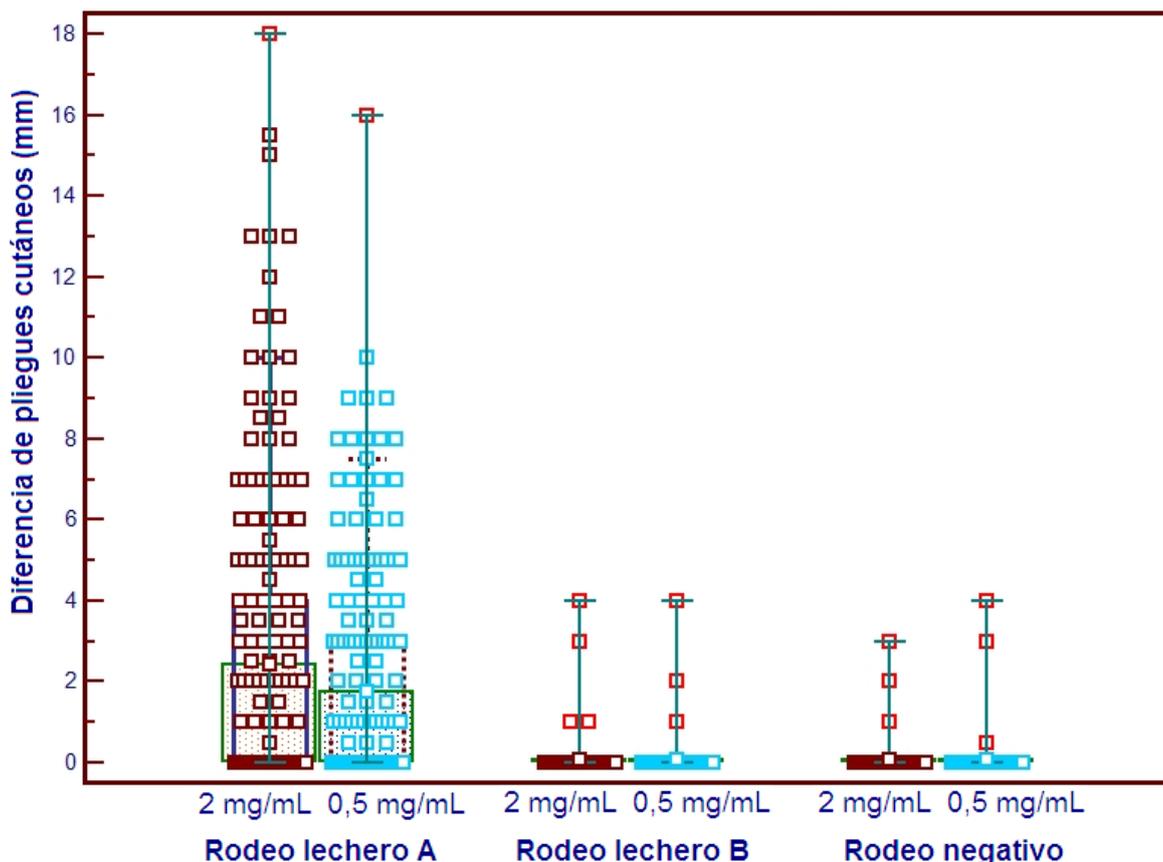


Figura 30. Gráfico caja y bigotes con la comparación entre los distintos rodeos de este estudio con respecto a los pliegues cutáneos obtenidos al aplicar la PPD Aviar en diferentes concentraciones.

La cantidad de reactantes positivos y negativos que se pudieron determinar con las diferentes concentraciones de PPD Aviar utilizadas, no presentaron diferencias significativas. Siendo los valores calculados por χ^2 para las reacciones \geq a 1 mm de una $P=0,66$; para las reacciones \geq a 2 mm la $P= 0,30$; para las \geq a 3 mm la $P= 0,69$ y para las \geq a 4 mm la $P=0,32$.

Al graficar con la curva de ROC la relación existente entre las diferentes concentraciones de PPD Aviar utilizadas y los cultivos de Map, no se observan diferencias significativas ($P=0,931$) entre ambas; las áreas bajo la curva fueron de 0,718 y 0,719 para la PPD de 0,5 mg/mL y 2 mg/mL respectivamente (Figura 31). Siendo para la PPD de 0,5 mg/mL la sensibilidad de 56% y la especificidad de 88% y para la PPD de 2 mg/mL la

sensibilidad fue de 57% y la especificidad fue de 87%, con un punto de corte en ambos casos de 0,5 mm de diferencia en los pliegues cutáneos.

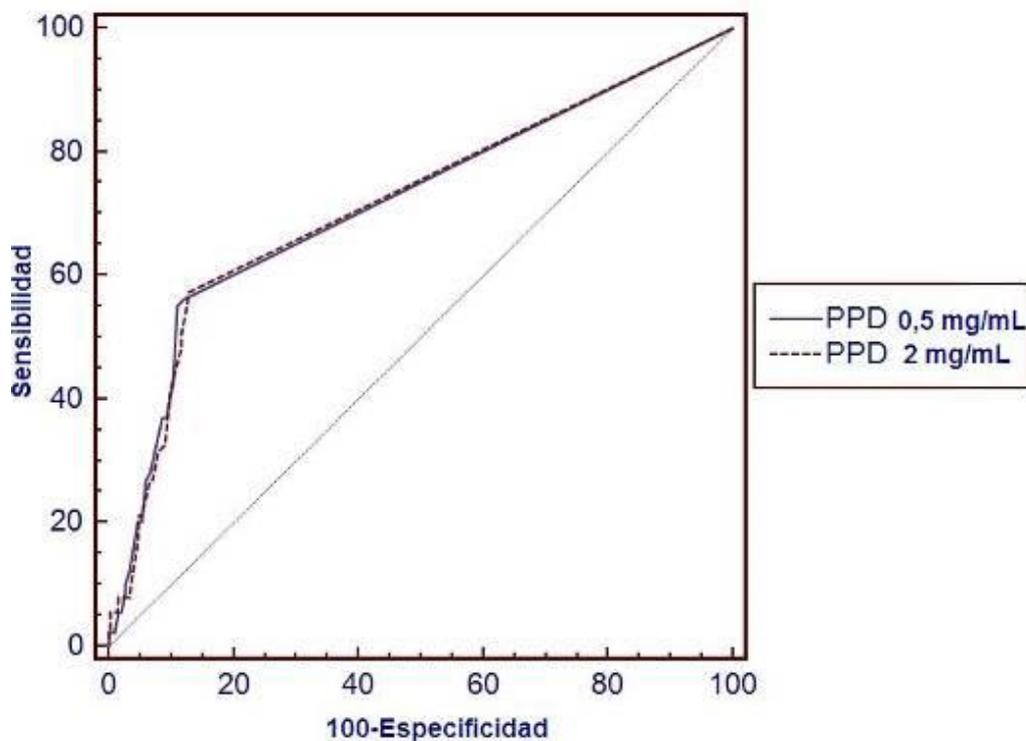


Figura 31. Curva de ROC comparando la aplicación intradérmica de la PPD Aviar de 0,5 y 2 mg/dL en relación al cultivo de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. Las áreas bajo la curva no presentan diferencias significativas.

3.6. Estudio de la presencia de *Map* en la materia fecal de los animales reactivos a la PPD Aviar

Se realizó el cultivo de materia fecal de la mayoría de los animales a los que se les aplicó la PPD Aviar en todos los ensayos efectuados, tanto a los reactivos como a los no reactivos, pertenecientes a los rodeos lecheros positivos (A y B) y al rodeo negativo. Algunos bovinos no fueron analizados porque no seguían permaneciendo en el rodeo. La edad en la que se empezaron a realizar los cultivos fue cuando los animales alcanzaron aproximadamente los 18 meses de edad.

Los resultados de las coloraciones de Ziehl Neelsen realizadas con las muestras frescas de materia fecal fueron variados, observándose coincidencia entre las muestras que

desarrollaron colonias de manera más temprana con aquellas que presentaron abundante BAAR dispuestos en grupo. En algunos casos no se observaron BAAR en la muestra fresca pero, posteriormente, se observó desarrollo de colonias.

Los resultados totales de los cultivos y de las pruebas intradérmicas se presentan en la Tabla 11. A partir de estos hallazgos se calculó con una planilla Excel una sensibilidad de la prueba intradérmica con la PPD Aviar del 67% y una especificidad del 79,8 %. El valor predictivo positivo (VPP) de la prueba fue del 42,5%, mientras que el valor predictivo negativo (VPN) resultó del 91,6% y la probabilidad pos prueba negativa (PPPN) fue del 0,8%. El LR+ fue de 3,3 y el LR- de 0,4.

Tabla 11. Resultados totales de los cultivos de materia fecal en todos los animales que recibieron la aplicación intradérmica de la PPD Aviar.

Estado sanitario	+ PPD Aviar	- PPD Aviar	Total
Enfermos (cultivo + Map)	57	28	85
No enfermos (cultivo – Map)	77	306	383
Total	134	306	468

Además se realizó el análisis de estos resultados con la prueba ROC, observándose valores similares. La mayor sensibilidad (69%) y especificidad (86,2%) se obtuvo con un punto de corte en la diferencia de pliegues cutáneos en la prueba tuberculínica con PPD Aviar >0. Con un LR+ de 5 y un LR- de 0,36. El AUC fue de 0.777, el IC 95% de 0.731 a 0.819 y el valor de P= 0.0001. La curva ROC se presenta en la Figura 32.

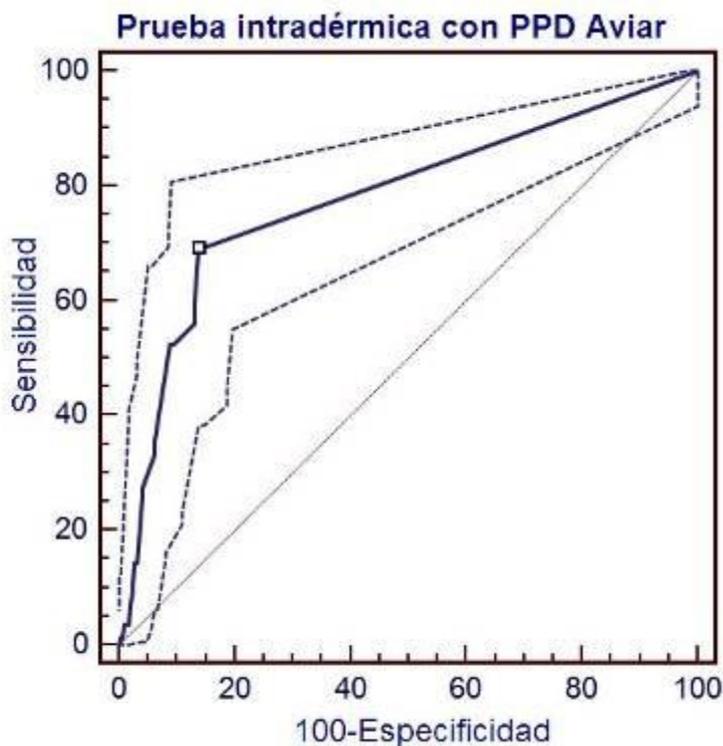


Figura 32. Curva de ROC de la prueba tuberculínica con la PPD Aviar en relación al cultivo de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. El cuadrado marca el punto de corte sugerido en la prueba para obtener una sensibilidad del 69% y una especificidad del 86,2%.

3.7. Estudio del efecto de covariables en la capacidad operativa de la prueba intradérmica con la PPD Aviar

El carácter crónico e insidioso de la paratuberculosis, además de la presencia de diferentes estadios en su patogenia, con predominios variados de distintos tipos de respuesta inmunológica a lo largo de la vida del animal infectado con Map, dificulta una interpretación abarcativa de las características operativas de una prueba diagnóstica como la intradermorreacción con PPD Aviar. Diferentes factores o variables pueden influir en el resultado obtenido en esta prueba.

Por lo tanto, el análisis de los resultados que se presenta a continuación corresponde a la etapa del estudio longitudinal efectuado en este plan de investigación. La mayoría de los resultados fueron obtenidos utilizando el programa estadístico MedCalc® y el paquete estadístico ROCRegression.

3.7.1. Influencia del número de aplicaciones y del tiempo de intervalo entre cada aplicación de la PPD Aviar

Los ensayos se efectuaron en los rodeos positivos a la paratuberculosis (rodeos lecheros A y B). Se aplicó 0,1 mL de la tuberculina aviar con una concentración de 0,5mg/mL a nivel del PACI en animales entre los 3 y 31 meses de edad.

En una primera etapa se trabajó con un grupo de aproximadamente 50 animales pertenecientes al rodeo lechero A, pero solamente con 26 se logró realizar el plan de inoculaciones programado que consistió en un total tres aplicaciones de PPD Aviar cada 6 meses y una vez que alcanzaron los 18 meses de edad se cultivó la materia fecal de todos los animales para el aislamiento de Map. Durante este periodo se detectaron 21 reactantes (80,76%) de los cuales 12 fueron reactantes una sola vez (46,15%), 8 lo fueron dos veces (30,76%) y 1 animal fue reactante las tres veces (3,84%). Algunos de los resultados de este primer ensayo se resumen en la Tabla 12.

Tabla 12. Resumen del primer ensayo de aplicación de PPD Aviar en el rodeo lechero A con un intervalo de 6 meses entre cada aplicación.

Resultado de la PPD Aviar	Edad en meses de la primera PPD +	Cantidad de animales	Cantidad de animales cultivo + a Map	Edad en meses al cultivo + a Map	% de reactantes por cada edad
Reactantes	3	1	1	25	4,76
	4	1	1	22	4,76
	6	1	0	-	4,76
	7	2	1	19	9,52
	8	2	1	19	9,52
	10	1	1	34	4,76
	12	1	1	23	4,76
	13	2	2	24 y 31	9,52
	15	5	4	20, 25 (x2) y 33	23,81
	16	1	1	26	4,76
	17	1	1	28	4,76
	18	1	1	19	4,76
	19	2	1	48	9,52
No reactantes	-	5	1	25	-

El 57,14% de los reactantes (12 animales) tenían entre 13 y 19 meses de edad en su primera reacción positiva a la PPD Aviar y representaron el 62,5% del total de bovinos con cultivo positivo a Map. Los animales de hasta 1 año de edad que fueron reactantes a la

tuberculina representaron un 42,86% y constituyeron el 37,5% de los animales con aislamiento positivo. La edad a la que resultaron positivos al cultivo fue variada, siendo el promedio de 26 meses. Solamente un animal de los 5 que fueron no reactantes a la prueba tuberculínica fue positivo al cultivo de Map.

En los reactantes a la prueba intradérmica de este primer ensayo se calculó la diferencia de meses entre la edad de la primera reacción positiva y la edad en la que fue posible el aislamiento de Map, observándose un rango de diferencia entre 1 y 29 meses siendo la mediana y la moda de 11 meses y el DS=7,2.

Posteriormente, se trabajó con otros animales de los rodeos lecheros a los que se les inoculó la tuberculina aviar con un intervalo de cada 2 meses; participaron 69 animales en el rodeo lechero A y se logró aplicar 5 veces la PPD, en el rodeo lechero B se trabajó con 122 animales y se pudo realizar las aplicaciones 6 veces. En ambos casos, originalmente se había incluido más animales pero no fueron considerados en este análisis parcial ya que no participaron en todas las aplicaciones programadas.

Se encontraron en total 31 reactantes (44,9%) en el rodeo lechero A y fueron 44 en el rodeo lechero B (36%). El número de veces en los que se presentaron las reactantes de acuerdo al establecimiento se resumen en la Tabla 13 y se grafican en la Figura 33. Se puede observar que en todos los animales reactantes a la prueba tuberculínica la mayoría de las reacciones solamente se detectaron una vez (41,3%), siendo observadas en dos ocasiones en el 33,3% de los animales y tres veces en un 20%. En el rodeo lechero A, de mayor prevalencia a paratuberculosis, se encontraron reactantes en 4 y 5 aplicaciones de PPD Aviar, representando el 12,9% del total de los reactantes de este rodeo.

Tabla 13. Resumen del número de reactantes y no reactantes a la prueba intradérmica con PPD Aviar en cada rodeo lechero, de acuerdo al número de veces que se detectaron las reacciones y al resultado del aislamiento de Map.

Resultado a la prueba con PPD Aviar	N° de veces de reacción + la prueba	Cantidad de animales (RLA)	Animales con cultivo + (RLA)	Cantidad de animales (RLB)	Animales con cultivo + (RLB)	Total de animales
Reactantes	1	11	4	20	4	31
	2	9	3	16	5	25
	3	7	2	8	1	15
	4	1	1	0	0	1
	5	3	1	0	0	3
	6	0	0	0	0	0
No reactantes	0	38	2	78	7	116
Total		69	13	122	17	191

Referencias: RLA: rodeo lechero A; RLB: rodeo lechero B.

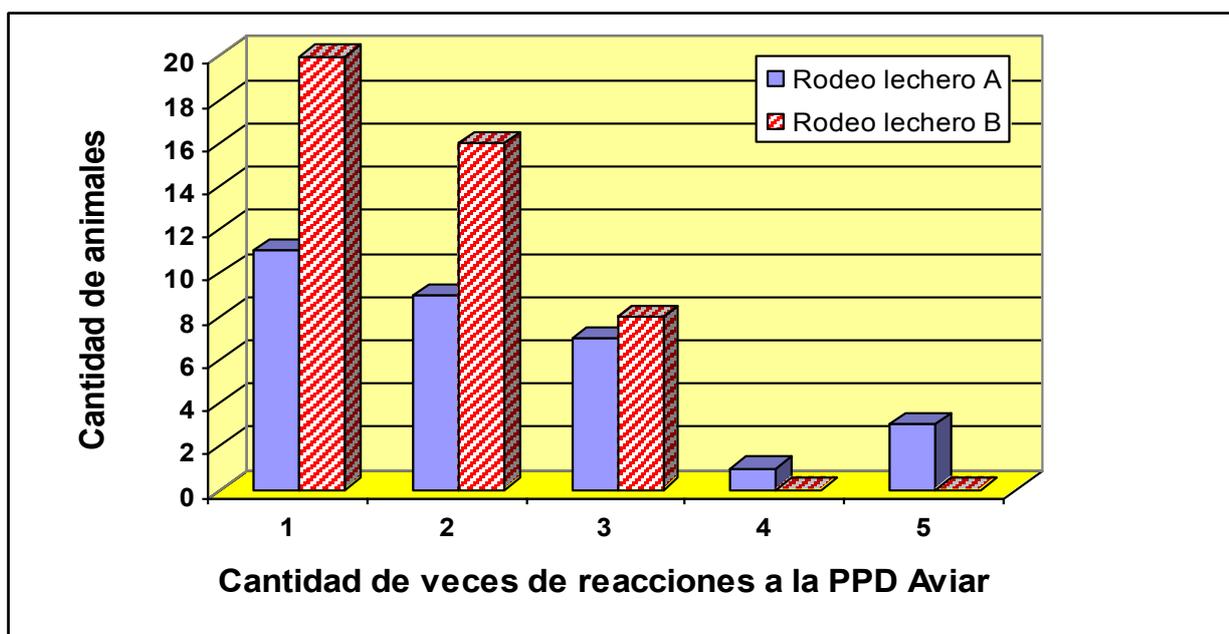


Figura 33. Cantidad de reactantes a la PPD Aviar en cada rodeo lechero según el número de veces que fueron observadas.

En la Tabla 13 también se presentan los animales que, hasta el momento, resultaron con cultivo positivo a Map. En el rodeo lechero A fueron positivos al aislamiento 11 animales de los reactantes (35,5%), mientras que en el rodeo lechero B se confirmó el cultivo de Map en 10 de los reactantes (22,7%).

Analizando la edad a la que fueron reactantes a la prueba tuberculínica y la edad de los animales en el momento del aislamiento de Map, se observaron resultados variados de acuerdo al rodeo estudiado. Estos hallazgos se presentan en la Tabla 14.

Al calcular la diferencia de meses entre la edad de la primera reacción positiva y la edad en la que fue posible el aislamiento de Map los rangos de diferencia fueron variados según el rodeo, observándose en el rodeo lechero A un rango de valores entre 5 y 22 meses, siendo la diferencia más observada de 10 y 22 meses, la mediana de 14 meses y el DS=5,9. En el rodeo lechero B el rango se ubicó entre 1 y 9 meses, obteniéndose una moda de 9 meses, la mediana fue de 7 meses y el DS=3.

Tabla 14. Resultados de la prueba intradérmica aplicada cada dos meses, comparando con los aislamientos de Map en los rodeos lecheros A y B.

Resultado a la prueba con PPD Aviar	Edad* de la primera PPD +	Cantidad de animales (RLA)	Animales con cultivo + (RLA)	Edad* al cultivo + a Map (RLA)	Cantidad de animales (RLB)	Animales con cultivo + (RLB)	Edad* al cultivo + a Map (RLB)
Reactantes	7	1	0	-	1	0	-
	8	2	1	30	1	0	-
	9	4	0	-	0	0	-
	12	4	1	31	0	0	-
	14	1	0	-	5	1	20
	15	4	1	32	2	0	-
	16	1	1	38	2	0	-
	17	0	0	-	1	0	-
	18	0	0	-	3	1	26
	19	0	0	-	2	0	-
	20	1	0	-	0	0	-
	21	2	2	31 y 43	2	2	24 (x2)
	22	2	1	36	3	2	31 (x2)
	23	2	0	-	6	0	-
	24	3	2	29 y 34	6	1	25
	25	2	1	37	1	0	-
	26	0	0	-	4	0	-
	29	0	0	-	4	3	35 y 38 (x2)
	31	2	1	41	0	0	-
	32	0	0	-	1	0	-
No reactantes	-	38	2	23 y 36	112	7	20, 24, 25, 31, 32, 33 y 39

Referencias: Edad*: todas las edades se expresan en meses; RLA: rodeo lechero A; RLB: rodeo lechero B.

Como se mencionó previamente, muchos animales participaron en los ensayos descritos en los rodeos lecheros, pero no estuvieron en todas las aplicaciones programadas y no se incluyeron en los resultados presentados hasta el momento. Sin embargo, estos individuos también fueron analizados a la hora de comparar la presencia de bovinos reactantes a la prueba intradérmica con PPD Aviar y los resultados de sus cultivos de materia fecal para confirmar la infección de paratuberculosis. Del mismo modo, el rodeo negativo fue analizado siguiendo el mismo criterio.

Por lo tanto, al considerar la totalidad de las aplicaciones que se realizaron durante el desarrollo de esta investigación, incluyendo los rodeos lecheros y el rodeo negativo, el análisis con la prueba de ROC con el programa estadístico MedCalc® permitió relacionar el número de aplicaciones de la tuberculina aviar con el aislamiento de Map (Figura 34). Al comparar con esta prueba estadística las áreas bajo la curva (AUC) de los diferentes números de aplicaciones de la PPD Aviar, se pudo observar que con una sola aplicación la AUC fue de 0.510 y se fue incrementando con cada inoculación, hasta llegar a 0.798 con seis aplicaciones (Tabla 15). La mayor diferencia entre las AUC se observó al comparar una aplicación con tres aplicaciones ($P < 0.001$) no pudiéndose observar diferencias significativas entre cuatro y seis aplicaciones ($P = 0.595$).

Tabla 15. Valores obtenidos con la prueba de ROC al analizar el número de aplicaciones de la prueba tuberculínica con la PPD Aviar y el aislamiento de Map.

Número de aplicaciones de PPD Aviar	AUC	95% IC
1 PPD	0.510	0.458 a 0.563
2 PPD	0.749	0.701 a 0.793
3 PPD	0.796	0.751 a 0.836
4 PPD	0.793	0.748 a 0.834
5 PPD	0.794	0.749 a 0.834
6 PPD	0.798	0.753 a 0.838

Referencias. AUC: área bajo la curva, CI: intervalo de confianza.

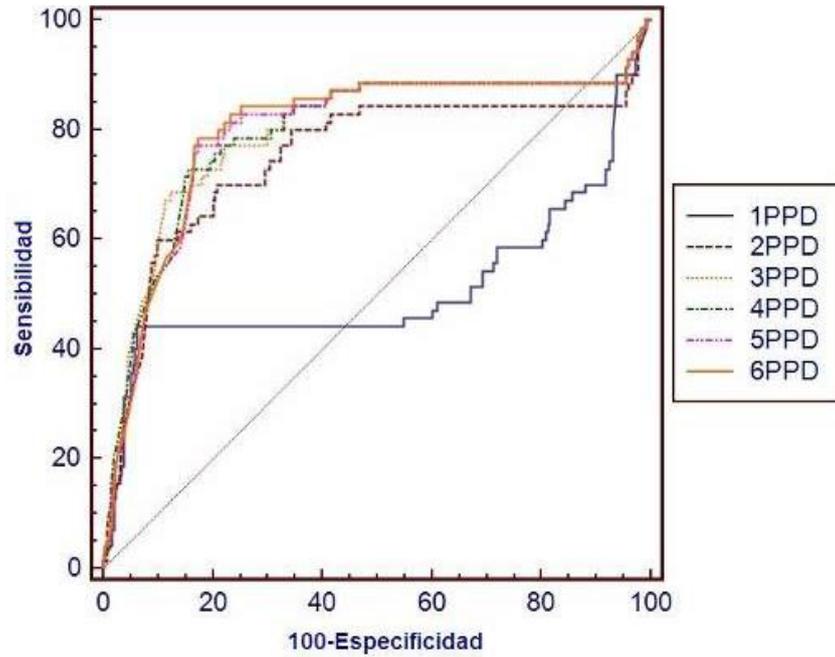


Figura 34. Curvas de ROC comparando las áreas bajo la curva de la prueba tuberculínica con PPD Aviar al aumentar el número de aplicaciones. El análisis corresponde a la totalidad de animales.

Realizando el estudio de estos datos con el paquete estadístico ROCRegression, se pudo graficar la modificación del AUC de acuerdo al número de aplicaciones tuberculínicas ejecutadas y el IC 95% (Figura 35). Este intervalo es menor en las primeras dos inoculaciones y se incrementa con cada aplicación. Estos valores coinciden con los presentados en la Tabla 15.

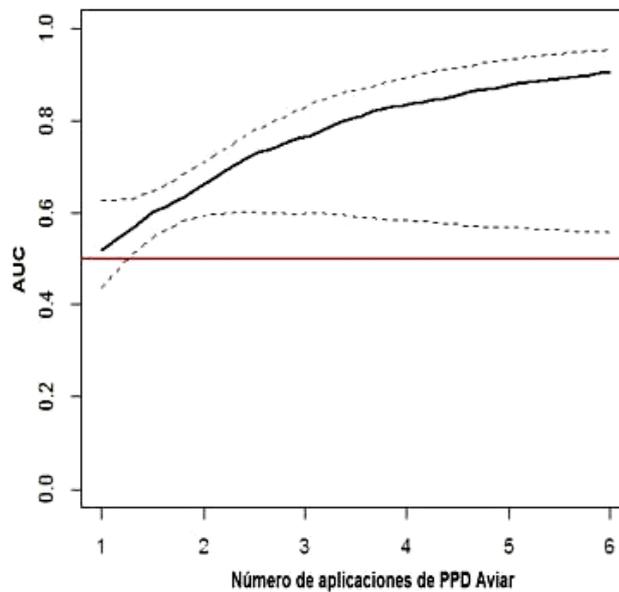


Figura 35. Modificaciones del área bajo la curva (línea continua) y los intervalos de confianza (líneas punteadas) de la prueba tuberculínica con PPD Aviar según el número de aplicaciones.

Este paquete estadístico también se utilizó para graficar la influencia del intervalo de tiempo, expresado en meses, entre cada aplicación (Figura 36). En este gráfico se puede observar que el mejor intervalo entre aplicaciones es de aproximadamente 3 meses.

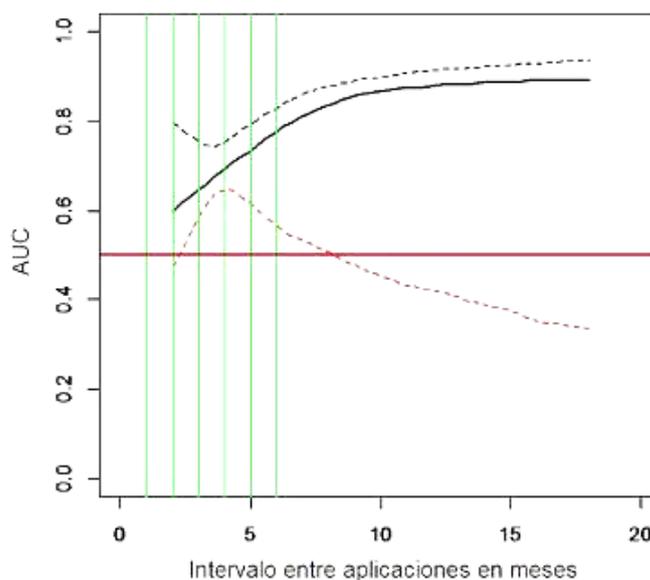


Figura 36. Influencia del intervalo de aplicación de la PPD Aviar en el área bajo la curva e intervalos de confianza de la prueba intradérmica.

3.7.2. Influencia de la edad del animal y el estadio de la enfermedad al momento de la aplicación de la PPD Aviar

Al analizar las edades en la que los animales fueron reactantes a la prueba intradérmica, se calculó el Coeficiente de curtosis, que estudia el grado de concentración que presentan los valores alrededor de la zona central de la distribución, y se encontraron variaciones entre el rodeo lechero A (mayor prevalencia a paratuberculosis) y el rodeo lechero B (menor prevalencia). En el primero, la mayoría de los animales fueron reactantes a la PPD Aviar alrededor de los 13 meses de edad, mientras que para el rodeo B, fue de 23 meses. La edad en la que la mayoría de los reactantes a la PPD Aviar fueron positivos al aislamiento de Map fue alrededor de los 33 meses en el rodeo A, y en el rodeo B fue a los 23 y 33 meses (Figura 37).

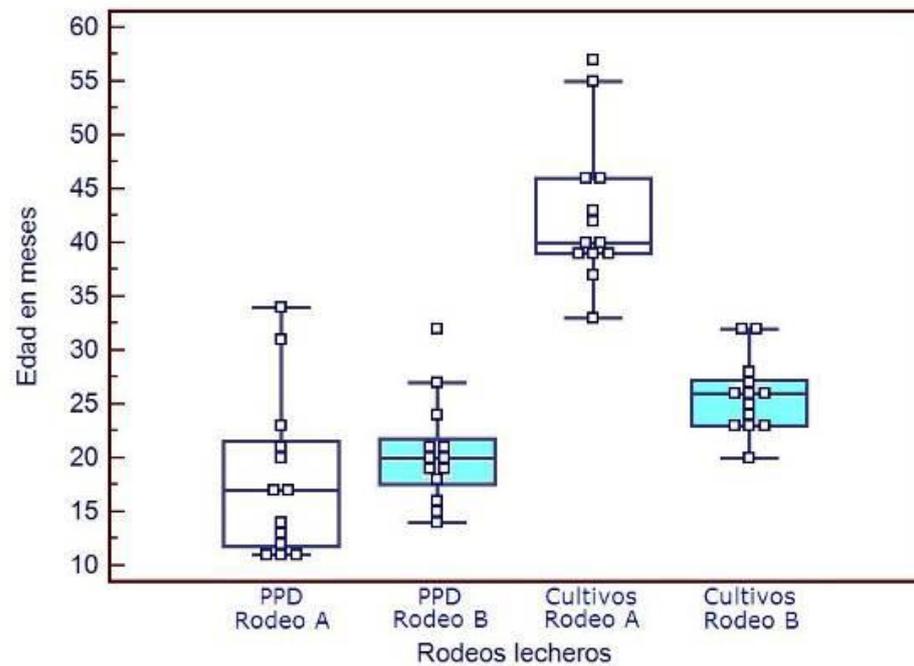


Figura 37. Gráfico caja y bigotes con la comparación de las edades en las que se encontraron las reacciones positivas a la PPD Aviar y de la presencia de cultivos positivos a Map, en los rodeos lecheros positivos a la enfermedad.

Al tener en cuenta la totalidad de las aplicaciones de tuberculina realizadas en el desarrollo de este trabajo, y efectuar el análisis de estos datos con el paquete estadístico ROCRegression, al considerar la edad de los animales al momento de la aplicación de la PPD Aviar y el cultivo positivo de Map (Figura 38), se pudo observar que la edad en la que la prueba intradérmica presentó mejor desempeño fue de aproximadamente 20 meses.

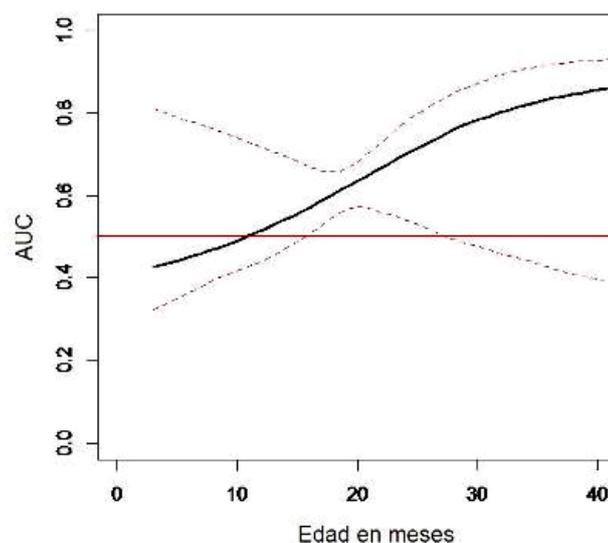


Figura 38. Influencia de la edad al momento de la aplicación de la PPD Aviar en el área bajo la curva e intervalos de confianza de la prueba intradérmica.

A continuación se presentan los resultados del análisis Bayesiano a partir del modelo cedido por el investigador Wang, llamado “modelo latente” aplicable para enfermedades con latencia o cronicidad. Se evaluó el efecto de la covariable edad en relación a la prueba tuberculínica con PPD Aviar, observándose un valor de la media de -0,5652 y un ICB 95% estadísticamente significativo de -0,9029 a -0,33; indicando una correlación negativa de la covariable edad, esto significaría que a medida que aumenta la edad su efecto sobre la prueba intradérmica disminuye.

Otro análisis con estadística Bayesiana realizado, que permitió equiparar la edad de los animales con los diferentes estadios de la paratuberculosis en los animales enfermos, es el modelo estadístico del investigador Kostoulas, que se encuentra detallado en el capítulo de materiales y métodos. En este análisis estadístico los animales se dividieron en tres grupos, de acuerdo a la presencia o ausencia de enfermedad, que se denominaron de la siguiente manera:

- **Grupo sanos.** Corresponde a los individuos que no están enfermos de paratuberculosis.
- **Grupo infectados.** Corresponde al primer estadio de la paratuberculosis (infección silente) y al segundo estadio (infección subclínica).
- **Grupo infecciosos.** Corresponde al tercer y cuarto estadio (enfermedad clínica incipiente y clínica avanzada respectivamente).

Además, cada grupo fue dividido según la edad de los animales en tres subgrupos:

- **Edad 1.** Comprende un rango de edad de 0-15 meses.
- **Edad 2.** Abarca a individuos de entre 16-25 meses de edad.
- **Edad 3.** Para los animales mayores de 26 meses de edad.

El análisis de los resultados calculan distintos puntos de corte en la diferencia en milímetros en la lectura de la prueba intradérmica con PPD Aviar, de acuerdo a los grupos de sanos, infectados e infecciosos se presentan en la Tabla 16.

Estos datos demuestran que los grupos se comportan de manera diferente, observándose en el grupo de infectados que valores de diferencia en milímetros >0 son influenciados según la edad que tengan los animales al momento de la aplicación de la tuberculina aviar.

Tabla 16. Resultados obtenidos con estadística Bayesiana del análisis de la influencia de la edad y estadios de la enfermedad en el punto de corte de la prueba intradérmica con PPD Aviar.

Grupo	Subgrupo	Media*	DS	Val2.5pc	Mediana	Val97.5pc
Sanos	Edad 1	-57.42	82.19	-219.7	0.1247	0.2696
	Edad 2	1.52	0.39	0.5183	1.579	2.086
	Edad 3	1.62	0.38	0.6656	1.68	2.205
Infectados	Edad 1	0.37	0.73	0.0015	0.0560	2.685
	Edad 2	0.59	0.71	0.0378	0.3626	2.772
	Edad 3	0.71	0.72	0.0387	0.4869	2.924
Infecciosos	Edad 1	57.59	82.11	0.0095	0.0910	219.8
	Edad 2	832.8	596.1	50.74	710.8	2253.0
	Edad 3	895.9	578.2	120.4	777.3	2275.0

Referencias. Edad 1: rango de 0-15 meses; Edad 2: rango de 16-25 meses; Edad 3: más de 26 meses; DS: desvío estandar; Val2.5pc: valor del percentil 2.5 o límite inferior del intervalo de credibilidad Bayesiana 95%; Val97.5pc: valor del percentil 2.5 o límite superior del intervalo de credibilidad Bayesiana 95%.

Media*: Los valores de la media expresan la diferencia en milímetros que se debería encontrar.

3.7.3. Influencia de la prevalencia de paratuberculosis en el rodeo bovino al aplicar la PPD Aviar

Para analizar la influencia de la prevalencia de la enfermedad en el rodeo en el que se quiere utilizar la prueba intradérmica con PPD Aviar, se presentan los resultados obtenidos en los animales de los establecimientos que participaron de este plan de investigación.

Los rodeos lecheros A y B tienen prevalencias diferentes de paratuberculosis; siendo considerado al rodeo lechero A como el de mayor prevalencia. Al calcular en una planilla Excel los valores de distintos parámetros de las características operativas de la prueba intradérmica con tuberculina aviar se obtuvieron los resultados resumidos en la Tabla 17.

Este análisis demuestra que la sensibilidad y especificidad de esta prueba son similares aunque las prevalencias sean diferentes, siendo ligeramente superiores en el rodeo de menor prevalencia. Lo mismo ocurre con los LR+, LR- y el VPN. Los parámetros

que se presentaron disímiles fueron el VPP, de un 48% para el rodeo lechero A y de 25% para el rodeo lechero B, y la PPPN que es de 0,8% y 0,2% en los rodeos lecheros A y B respectivamente.

Tabla 17. Parámetros característicos de la capacidad operativa de la prueba intradérmica con PPD Aviar al considerar las distintas prevalencias de paratuberculosis en los rodeos lecheros estudiados en este trabajo.

Rodeo	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)	LR+	LR-	PPPN (%)	Prevalencia aparente (%)
Lechero A	67	83	48	91	4,01	0,39	0,8	19
Lechero B	69	87	25	97	5,11	0,36	0,2	6

Referencias. VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo; LR+ y LR-: valor de verosimilitud o likelihood ratio positivo y negativo respectivamente; PPPN: probabilidad pos prueba negativa.

Al efectuar el análisis de estos datos con el paquete estadístico ROCRegression, se obtuvo un gráfico que refleja un mejor desempeño de la prueba intradérmica con PPD Aviar en el rodeo lechero A (de mayor prevalencia a paratuberculosis). El mayor IC 95% se observó en el rodeo negativo (ver Figura 39).

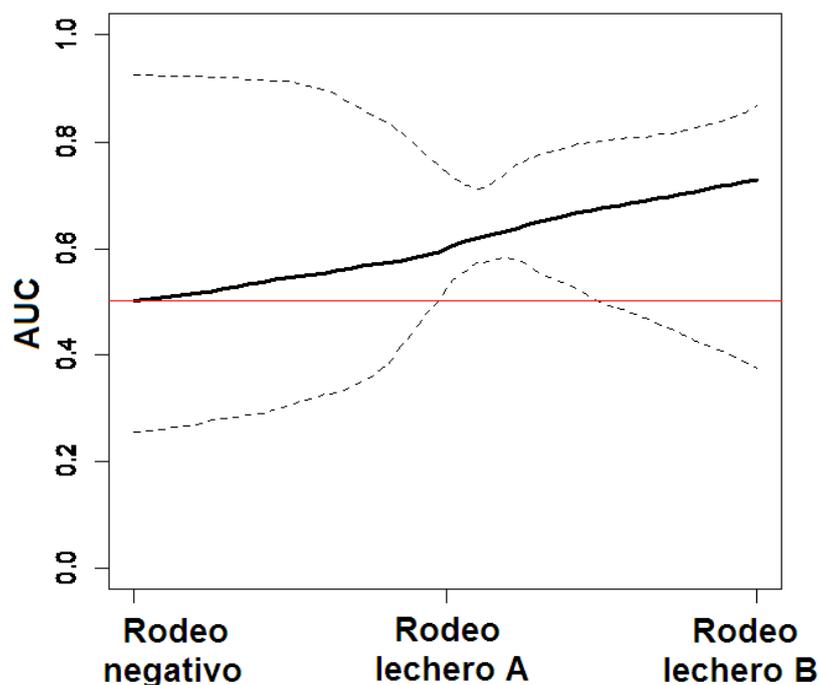


Figura 39. Influencia de la prevalencia de paratuberculosis en los rodeos al analizar los resultados de la aplicación intradérmica de la PPD Aviar.

3.7.4. Comparación de las covariables: número de aplicaciones, intervalo entre aplicaciones, edad de aplicación y prevalencia en los rodeos

Previamente, se presentó por separado, la influencia en las características operativas de la prueba intradérmica con PPD Aviar de cada una de las covariables mencionadas. Las covariables que más influyeron fueron el intervalo de tiempo entre las aplicaciones de la tuberculina y el número de aplicaciones intradérmicas realizadas. En la Figura 40, a partir del análisis de estos datos con el paquete estadístico ROCRegression, se exponen las variaciones en el AUC de las covariables, con respecto al AUC original de la prueba intradérmica. Se puede observar que las mayores diferencias en los gráficos C y B corresponden a las covariables de intervalo entre aplicaciones y número de aplicaciones respectivamente. Las covariables que influyeron en menor medida fueron la edad de los animales y la prevalencia de paratuberculosis en el rodeo.

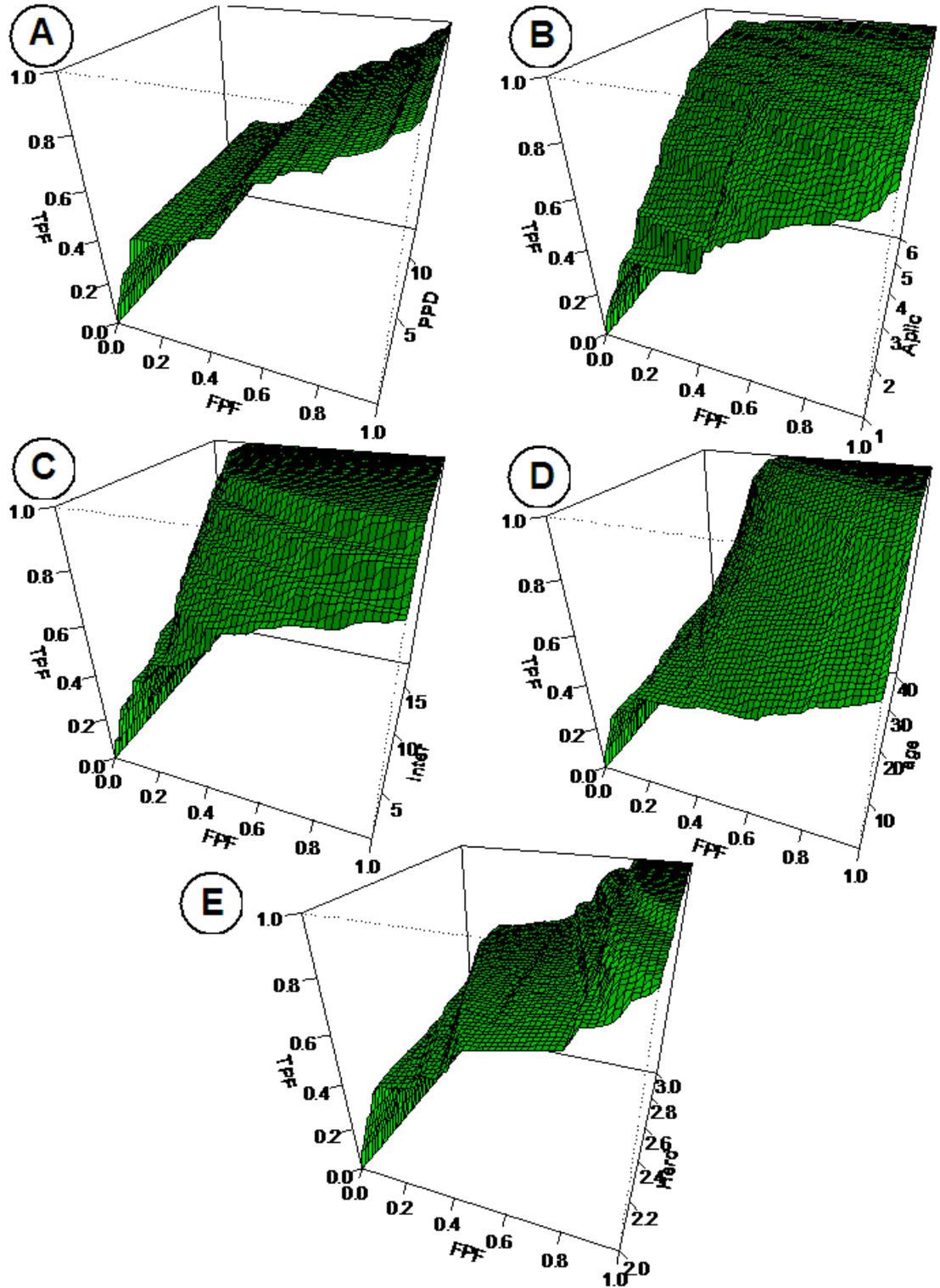


Figura 40. Comparación de todas AUC de las covariables que pueden influir en el desempeño de la prueba intradérmica con PPD Aviar. En A, AUC de la prueba tuberculínica sola. En B y en C las mayores diferencias de AUC con respecto a A de las covariables número de aplicaciones e intervalo de aplicaciones respectivamente. En D, el AUC de la covariable edad. En E, el AUC de la covariable prevalencia de paratuberculosis en el rodeo. TPF: verdadero positivo; FPF: falso positivo.

3.8. Estudio de la asociación del pedigree en los resultados obtenidos a las pruebas que determinan la infección con *Map*.

Los resultados que se presentan a continuación corresponden solamente al rodeo lechero A (de mayor prevalencia a paratuberculosis), debido a que se pudo acceder a la mayor información necesaria del pedigree de los bovinos que participaron de este estudio.

En la Figura 41, se muestra el análisis de estos datos con el paquete estadístico ROCRegression. Puede apreciarse que el IC 95% es amplio si se considera el antecedente familiar de positividad a la enfermedad (a lo que se denominó “pedigree +”), y el AUC presentó una tendencia descendente. Además, el gráfico tridimensional, al compararlo con el gráfico de la prueba sin influencia de covariables (Figura 40, gráfico A) indica que el pedigree, en este rodeo, no mejoraría las características operativas de la prueba intradérmica con PPD Aviar.

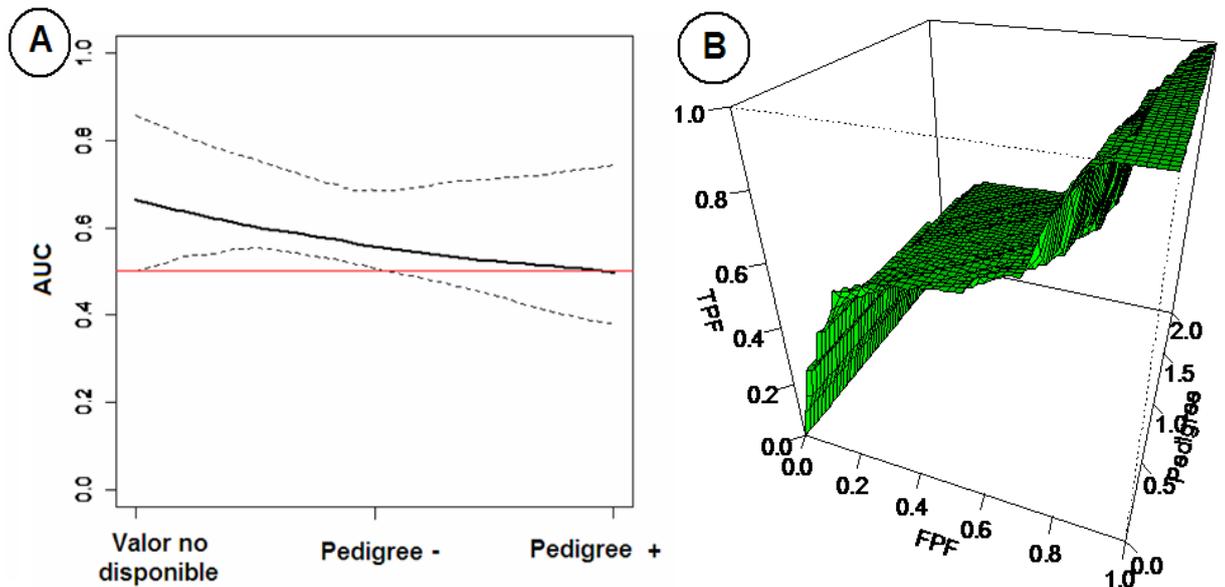


Figura 41. Esquemas del AUC obtenida al analizar la influencia del uso del pedigree en el desempeño de la prueba intradérmica con PPD Aviar. En A gráfico del AUC y de los límites del IC 95%. En B gráfico tridimensional del AUC.

El número de datos analizados del pedigree de este rodeo fue numeroso y, a modo de ejemplo, se presenta esquemáticamente el grado de complejidad de las relaciones filiales

de algunas de las situaciones observadas en 6 animales, 3 que fueron reactivos a la PPD y con cultivo positivo a Map y 3 que fueron no reactivos a la PPD pero con cultivo positivo (ver Figura 42).

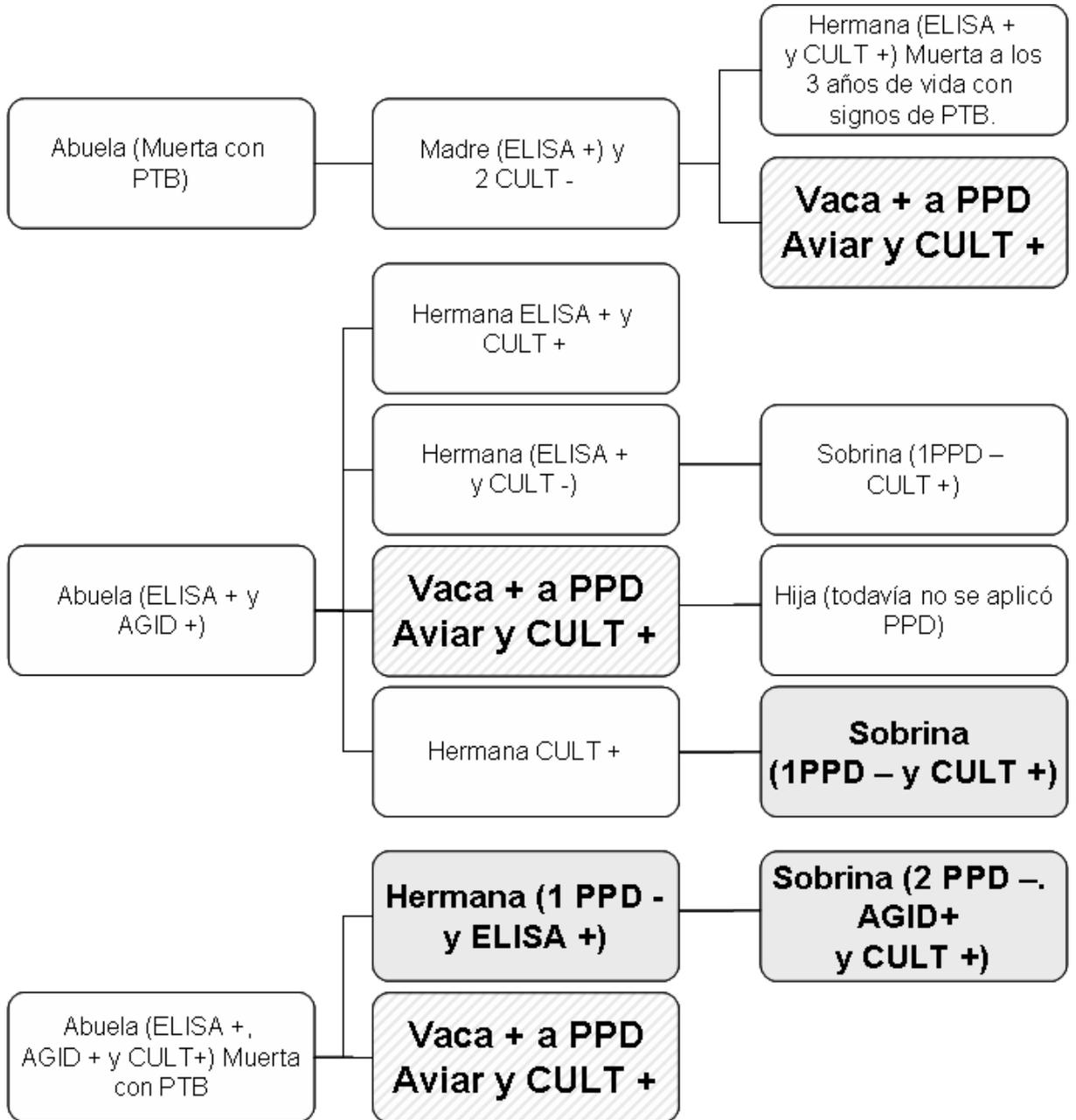


Figura 42. Esquemas del pedigree de 6 de las vacas del rodeo lechero A que participaron en esta investigación (3 reactivos a la PPD Aviar y 3 no reactivos). El grado de filiación se expresa en relación a cada animal que recibió la tuberculina.

3.9. Estudio de la respuesta sistémica a la aplicación de la PPD Aviar

En esta etapa se trabajó con algunos animales de los lotes que fueron tuberculinizados. Se efectuó la prueba de ELISA indirecto, la determinación de proteínas totales (PT) y de las proteínas de fase aguda (PFA) como el fibrinógeno (por refractometría) y la haptoglobina. Se trabajó a partir de las muestras de suero y plasma obtenidas de animales seleccionados al azar el día de la aplicación de la tuberculina aviar (día 0), luego fueron sangrados al momento de la lectura (72 horas pos aplicación), a los 10-14 días pos aplicación y en algunos casos se pudo realizar otro análisis a los 20 días pos aplicación.

3.9.1. Niveles de Inmunoglobulinas G

En el rodeo lechero A se trabajó con muestras de suero de 37 animales elegidos al azar que tenían entre 10 y 24 meses de edad al momento de realizada la prueba tuberculínica; de estos animales 15 fueron reactantes positivos y 22 reactantes negativos. Al realizar la prueba de ELISA se pudo observar, al promediar las densidades ópticas (DO) resultantes (Figura 43), que no hubieron diferencias significativas, con la prueba de χ^2 , entre los reactantes y no reactantes a la PPD Aviar ($P= 0,37$). No existieron diferencias significativas entre el momento de la aplicación y la lectura de la tuberculina Aviar ($P=0,67$) y al comparar los valores de la fecha de lectura y los obtenidos 14 días después de la inyección tampoco hubo diferencias significativas ($P=0,44$).

En este rodeo dos animales que fueron reactantes a la PPD Aviar presentaron DO elevadas a los 14 días pos inoculación. Uno de ellos fue reactante a la tuberculina cuando tenía 8 y 18 meses de edad, y actualmente, con más de 48 meses de edad, es positivo a la prueba de ELISA pero negativo al cultivo de Map. El otro animal fue reactante a la tuberculina a los 14 meses y aproximadamente a los 54 meses fue cultivo positivo a Map. Un reactante negativo a la PPD Aviar en este ensayo también presentó DO elevada a los 14

días pos aplicación, este animal resultó posteriormente positivo al cultivo de Map al alcanzar los 24 meses de edad.

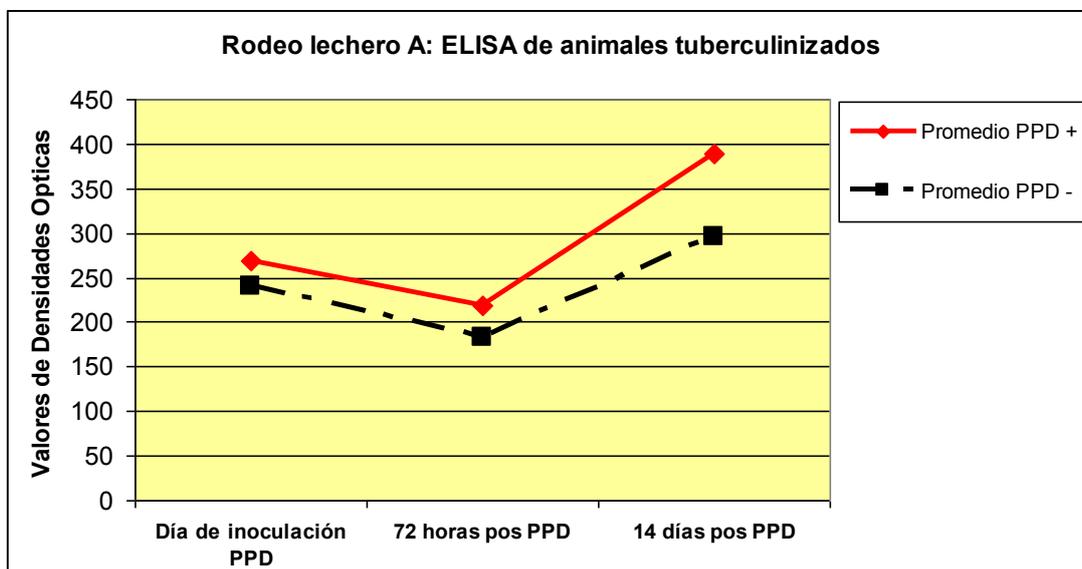


Figura 43. Comparación de los promedios de los valores de densidades ópticas obtenidos en la prueba de ELISA de paratuberculosis en los animales del rodeo lechero A, en relación a la aplicación intradérmica de la PPD Aviar.

En el rodeo lechero B se realizó un esquema de muestreo similar, pudiéndose agregar el sangrado de los 20 días pos aplicación de la PPD Aviar, en este caso se trabajó a partir de las muestras de 39 animales seleccionados al azar, entre los 4 y 30 meses de edad; de estos animales 25 fueron reactantes a la tuberculina aviar y 15 fueron negativos. Con la prueba de χ^2 se pudo observar diferencias significativas entre los reactantes negativos y positivos a la tuberculina ($P=0,029$). En este caso, al comparar los promedios de los valores de DO obtenidos en la prueba de ELISA, los que manifestaron valores de DO más elevados fueron los reactantes negativos (Figura 44), en este grupo los dos animales que tuvieron los mayores valores fueron negativos a la PPD Aviar en este muestreo a los 20 y 25 meses de edad y poco después fueron cultivos positivos a Map respectivamente a los 23 y 26 meses de vida; en ambos casos estos animales habían sido reactantes positivos a la PPD Aviar cuando fueron más jóvenes a los 6 y 16 meses de edad. Asimismo, entre los reactantes positivos, se encontraron tres animales con los valores de DO más elevados al

ELISA en el momento del muestreo, uno fue reactante a los 23 meses de vida y también fue cultivo positivo a Map a esa edad; otro fue reactante a los 20 meses y a los 25 meses de edad resultó positivo al aislamiento de Map, el tercero fue reactante a los 23 meses de vida y hasta el momento es cultivo negativo a Map.

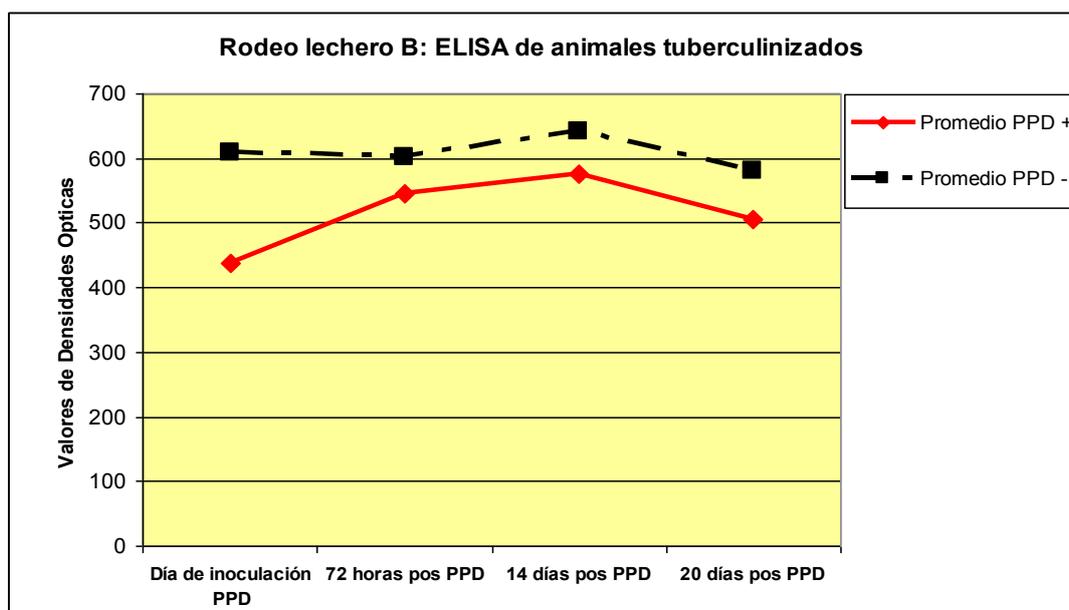


Figura 44. Comparación de los promedios de los valores de densidades ópticas obtenidos en la prueba de ELISA de paratuberculosis en los animales del rodeo lechero B, en relación a la aplicación intradérmica de la PPD Aviar.

Del rodeo negativo también fueron analizados 15 animales seleccionados de manera aleatoria, al momento de la aplicación, lectura y aproximadamente 14 días después de la prueba intradérmica. En este caso, los animales fueron reactantes negativos a la prueba y la totalidad de las muestras presentaron a la prueba de ELISA valores de DO inferiores a 300 en todos los muestreos.

3.9.2. Niveles de proteínas totales, de fibrinógeno y de haptoglobina plasmática

Para la determinación de los niveles de PT, fibrinógeno y haptoglobina se analizaron muestras de plasmas sanguíneos. En estos estudios se pudieron realizar tres muestreos, al momento de la inoculación de la PPD Aviar, el día de la lectura de la prueba (72 horas pos aplicación) y a los 10 días pos aplicación.

Los valores observados de PT en los rodeos lecheros A, B y rodeo negativo fueron similares y se mantuvieron dentro del rango normal para los bovinos (6-8 g/dL). Los promedios de estas concentraciones se muestran en la Tabla 18. Entre los tres rodeos se trabajó con muestras de plasmas de 60 animales, de los cuales 32 fueron reactantes a la PPD Aviar y 28 fueron negativos a la prueba. No se observaron diferencias significativas con la prueba de Chi² (P=0,99) entre los valores de las PT el día de aplicación de la tuberculina aviar, el día de lectura y 10 días pos aplicación.

Los valores de las mediciones del fibrinógeno, no presentaron diferencias significativas entre los rodeos lecheros y el rodeo negativo con la prueba de Chi² (P=0,47), y tampoco entre los animales reactantes y no reactantes a la PPD Aviar (P=1). La concentración plasmática considerado normal en los bovinos es de 0,1-0,6 g/dL; siendo en el rodeo lechero B, al momento de la lectura de la prueba tuberculínica, en donde se encontraron los valores más elevados, con diferencias significativas, con la prueba de T pareada, entre el día de la aplicación y la lectura (P=0,004). En el rodeo lechero A las concentraciones de fibrinógeno siempre se mantuvieron en el rango normal, y en el rodeo negativo, fueron un poco más elevadas el día de la lectura de prueba intradérmica y 10 días después de la aplicación (Tabla 18).

Tabla 18. Promedio de los valores plasmáticos de las proteínas totales, el fibrinógeno y la haptoglobina asociado a la aplicación intradérmica de la PPD Aviar, en los rodeos lecheros A, B, y en el rodeo negativo a paratuberculosis.

Valores promedios medidos	Rodeo	Día de aplicación de la PPD Aviar	72 horas pos aplicación	10 días pos aplicación
PT (en gr/dL)	RLA	6,74	6,72	6,67
	RLB	6,94	6,74	6,70
	RN	6,64	6,75	6,69
Fibrinógeno (en gr/dL)	RLA	0,35	0,40	0,36
	RLB	0,38	0,84	0,62
	RN	0,38	0,67	0,70
Haptoglobina (en µg/mL)	RLA	6,6	7,26	6,8
	RLB	8,3	10,3	5,9
	RN	7,3	9	7,5

Referencias. PT: proteínas totales; RLA: rodeo lechero A; RLB: rodeo lechero B; RN: rodeo negativo

En el caso de la haptoglobina, los valores hallados fueron variados (Tabla 18), observándose en el rodeo lechero B, a las 72 horas pos aplicación de la tuberculina, algunos valores superiores al rango considerado normal en los bovinos (0-10 $\mu\text{g/mL}$). Con la prueba de Chi2 no se encontraron diferencias entre los rodeos ($P=0,99$) y tampoco entre los animales reactantes y no reactantes a la PPD Aviar, con una $P=0,32$. Con el test de T pareado se hallaron diferencias significativas entre el día de la aplicación y la lectura ($P=0,01$). Al realizar el mismo análisis con estadística bayesiana de los rodeos lecheros A y B, se pudo comprobar un aumento en la media de los niveles de haptoglobina medidos al momento de la lectura de la intradermorreacción (de -0,97 a 19,51) con un descenso a -18,53, con un ICB 95%. La Figura 45 esquematiza estos hallazgos.

Todos los animales con valores elevados para el fibrinógeno también tuvieron concentraciones altas de haptoglobina. Solamente un 10% de animales presentaron mediciones altas de haptoglobina y valores normales de fibrinógeno.

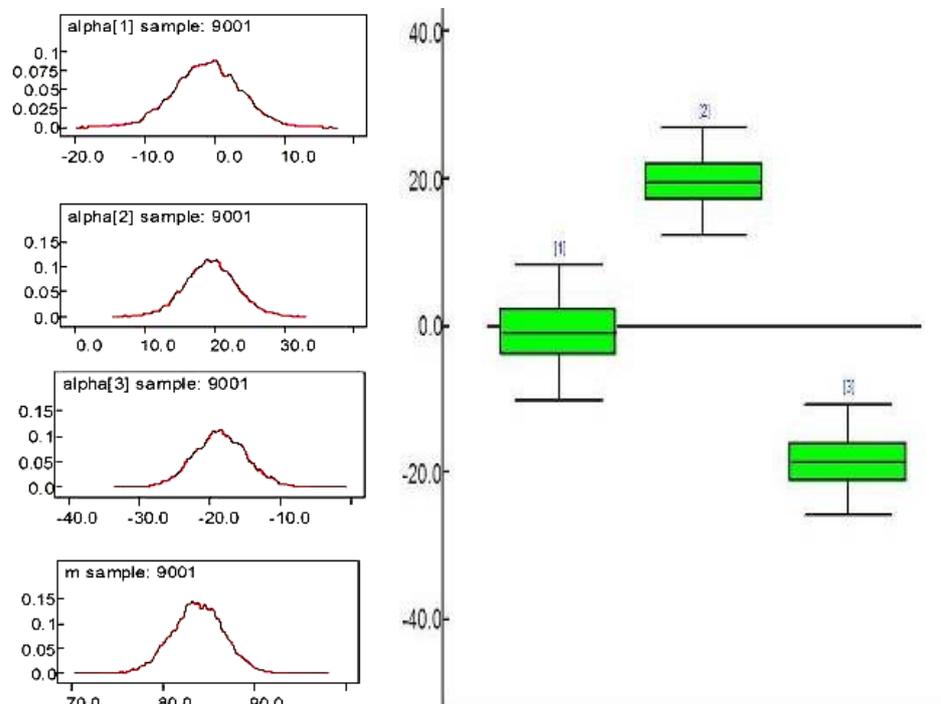
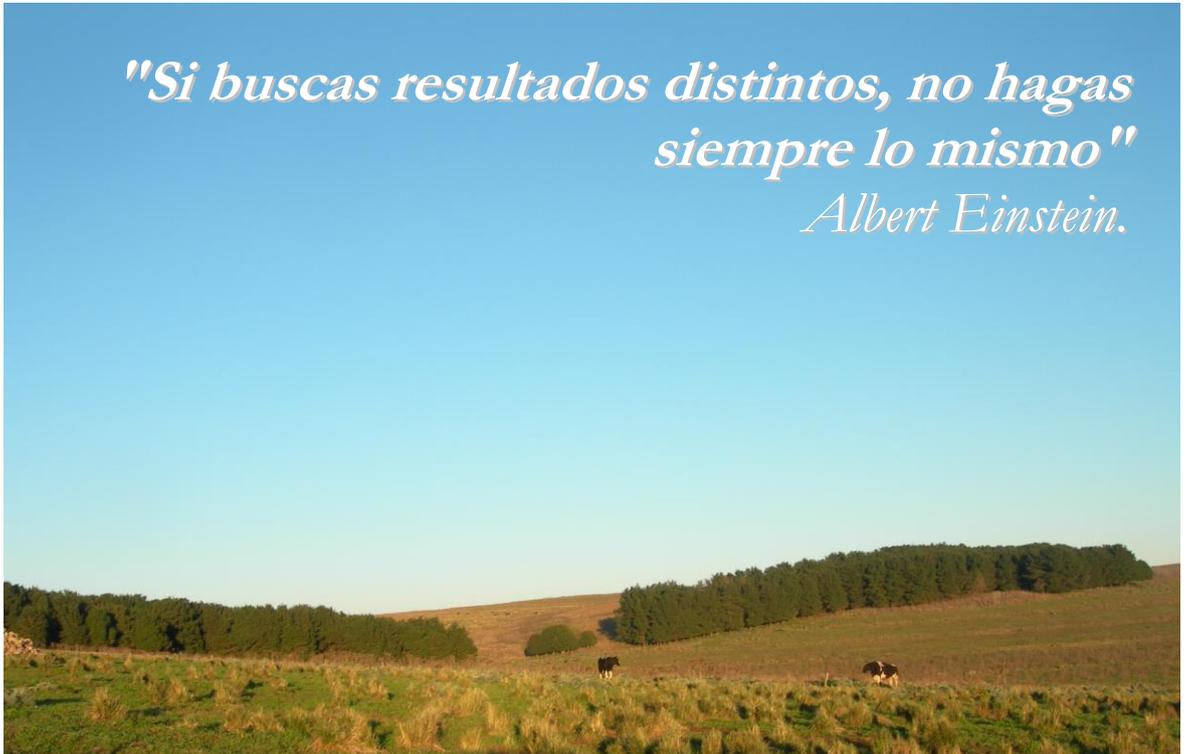


Figura 45. Comparación de medias con análisis bayesiano de los niveles de haptoglobina en el momento de aplicación de la PPD Aviar (alpha[1]), 72 horas pos aplicación (alpha[2]) y 14 días pos aplicación (alpha[3]). A la izquierda gráfico de curvas y a la derecha gráfico de caja y bigotes. En todos los casos se observa el mayor nivel de la media al momento de la lectura de la PPD Aviar.

4. Discusión

"Si buscas resultados distintos, no hagas siempre lo mismo"
Albert Einstein.



Diferentes trabajos científicos han demostrado que el diagnóstico de la paratuberculosis bovina es complejo y que necesita contar con numerosas pruebas diagnósticas; por ejemplo, en el caso de la presencia de un animal sospechoso, se puede realizar la coloración de Ziehl Neelsen de muestras fecales o de tejidos obtenidos de necropsia, estudios histopatológicos, cultivo de micobacterias, pruebas serológicas y pruebas moleculares. Para el diagnóstico poblacional, tendiente a establecer la prevalencia de la enfermedad e implementar medidas de control, suelen ser las pruebas serológicas las más utilizadas (OIE, 2014; Yokomizo 1984, 1986 y 1991). Además, como se mencionó en el capítulo de introducción, la importancia de disponer de diversos métodos diagnósticos radica en la presencia de una patogenia compleja, característica de esta enfermedad crónica, que se evidencia por la existencia de una signología de cuatro estadios distintos, con diferentes tipos de respuesta inmunológica, y que visiblemente condiciona los resultados esperados de cada análisis (Whitlock y Buergelt, 1996, Chiodini, 1984). A este contexto se suma la realidad de que ninguna de las pruebas diagnósticas disponibles tiene una sensibilidad y especificidad del 100%, lo que en muchos casos obliga a hacer repeticiones de distintas pruebas durante varios años, en aquellos rodeos en donde se quiere disminuir la prevalencia de esta enfermedad con la eliminación de los animales positivos.

Los resultados de nuestra investigación ratifican la presencia de este escenario complejo del diagnóstico poblacional de la paratuberculosis bovina. Trabajamos con bovinos de diferentes establecimientos, dos de ellos de explotación lactea, que presentaban un número preocupante de animales muertos con signología compatible con paratuberculosis y un establecimiento de cría sin evidencias de la presencia de esta afección.

En los primeros estudios que realizamos en los animales mayores de 18 meses, en los rodeos lecheros pudimos confirmar por el aislamiento de Map en un 11,5% de muestras de materia fecal en el rodeo de mayor prevalencia (rodeo lechero A), y en un 3,2% en el rodeo de menor prevalencia (rodeo lechero B). La serología por medio de la prueba de

ELISA nos indicó una seroprevalencia de aproximadamente el 30% y el 9,4% para los rodeos de mayor y menor prevalencia respectivamente. Los animales del establecimiento de cría fueron negativos a las pruebas de ELISA y lo consideramos el rodeo negativo. Estos primeros hallazgos nos aportaban una idea aparente de lo que estaba sucediendo epidemiológicamente en estos rodeos, siendo la característica de un estudio de tipo transversal. Todos estos resultados fueron corroborados al finalizar esta investigación, luego de casi cinco años de estudio longitudinal, quedando definidas las prevalencias reales en un 30% para el rodeo lechero A y en un 7% para el B; mientras que el rodeo lechero permaneció con una prevalencia negativa a la paratuberculosis. Sin embargo, fue necesario repetir las pruebas diagnósticas confirmatorias aproximadamente cada seis meses, hasta definir el estado sanitario de los animales en relación a esta enfermedad. Esto coincide con lo descrito por algunos investigadores que plantean las limitaciones de las pruebas diagnósticas confirmatorias clásicas (Wang y col., 2006).

Desde el punto de vista particular de los estudios concernientes a la prueba intradérmica con PPD Aviar, abordaremos la discusión de acuerdo al orden de los objetivos particulares que fueron planteados en este plan de trabajo y de los resultados que observamos.

Al considerar el efecto del uso de las vías de aplicación de PPD Aviar en la TC y en el PACI, trabajamos en los rodeos lecheros de distinta prevalencia, con un total de 304 animales, de edades comprendidas entre los 4 y 72 meses. Si bien obtuvimos diferencias entre las vías de aplicación con la prueba de Chi² sin gold standard, y observamos un mayor número de reactantes a nivel de la TC; cuando utilizamos la prueba de ROC, con el cultivo de Map como gold standard, nuestros hallazgos no demostraron diferencias significativas ($P=0,14$). Nuestras observaciones concuerdan con investigaciones previas, realizadas en estudios de la tuberculosis bovina, que mencionan a la región media de la TC como una zona de mayor sensibilidad al momento de hacer una aplicación intradérmica de

tuberculina (Baisden y col., 1951; Paterson, 1959; Wood y col, 1991; Good y col., 2011a; Torres, 2000). La inoculación intradérmica de PPD en la región del PACI, presenta mayor especificidad que sensibilidad, razón por la cual es recomendada para el control poblacional de la tuberculosis bovina, y en nuestro país se utiliza como parte del Plan Nacional de Control y Erradicación de la Brucelosis y Tuberculosis Bovina, que contempla la figura del veterinario acreditado en el Registro Nacional del SENASA desde 1998, y tuvo como objetivo principal la erradicación de la tuberculosis en los tambos de las cuencas lecheras, en combinación con las usinas pasteurizadoras (Torres, 2000 y 2013). El SENASA sugiere utilizar la prueba tuberculínica operativa en el PACI, de rutina, para determinar la presencia de infección tuberculosa en un rodeo o región, y como alternativa la prueba cervical simple, más sensible, para eliminar los reactores de los rebaños infectados.

El uso de la región de la TC cuenta además con la dificultad de requerir, en algunas ocasiones, utilizar el cepo de la manga para que el animal no se mueva en la maniobra de aplicación tuberculínica, enlenteciéndose la rutina de trabajo; todo esto deja prácticamente limitado su uso para realizar la aplicación doble (con PPD Aviar y PPD Bovina) en los casos de sospecha de una reacción paraespecífica (OIE, 2014; Guanziroli y Cicuta, 2005). Debido a que nuestros resultados no presentaron diferencias significativas entre el uso de ambas vías en la prueba tuberculínica con PPD Aviar, y a la familiaridad con la que trabajan los veterinarios con la vía de aplicación del PACI, consideramos continuar el resto de las aplicaciones con esta vía.

El estudio de la respuesta local utilizando diferentes concentraciones de PPD Aviar (0,5 y 2 mg/mL) se hizo en un total de 335 animales, de los rodeos lecheros (A y B) y del rodeo negativo. Nuestros resultados permitieron detectar en total un 21,8% de reactantes positivos y un 78,2% de reactantes negativos, siendo el rodeo lechero A el que presentó mayor proporción de reactantes positivos (ver datos en la Tabla 10). La diferencia de medias Bayesianas entre ambas concentraciones fue de -1,36, y la $P=0,0031$, demostrando que

existieron diferencias significativas entre los dos tipos de concentración de PPD Aviar. Con la Prueba de T Pareada observamos que los valores más elevados en las diferencias de los pliegues cutáneos (espesor de milímetros) estaban en los animales inoculados con la concentración de 2 mg/mL y además se evidenciaron en mayor número en el rodeo de mayor prevalencia (Figuras 28 y 29). Estos resultados concuerdan con estudios anteriores efectuados con PPD Bovina, en donde las mayores diferencias de pliegues cutáneos se observaron al aumentar la concentración de tuberculina cuatro veces (Francis y col., 1978a y 1978b). Otra coincidencia con los estudios mencionados previamente en tuberculosis, que observamos en nuestros ensayos, es que la cantidad de reactantes positivos y negativos que se pudieron determinar con las diferentes concentraciones de PPD Aviar, no presentaron diferencias significativas. Por otra parte, la prueba de ROC que relacionó las diferentes concentraciones de tuberculina aviar y los cultivos de Map, no presentó diferencias significativas entre ambas ($P=0,931$). Es importante destacar que en estos ensayos pudimos determinar un punto de corte ideal, en ambos casos, de 0,5 mm de diferencia en los pliegues cutáneos, siendo el criterio que se utilizó para definir a los reactantes positivos a la prueba intradérmica con PPD Aviar.

Algunos de los animales del rodeo lechero A que participaron de este estudio, recibieron otra aplicación de tuberculina a los 6 meses de la primera y el 12,3% de ellos repitieron los resultados de reacciones positivas a la prueba, lo que nos indicó que probablemente el tiempo que dura la inmunidad celular, promovida por la paratuberculosis, puede ser variado. Más adelante realizamos otros ensayos para confirmar esta observación.

A lo largo de este trabajo estudiamos la presencia de Map en la materia fecal de la mayoría de los animales reactores positivos y negativos a la PPD Aviar a medida que alcanzaban los 18 meses de edad, el número de cultivos por cada animal fue variado, dependiendo en gran medida del manejo de los animales en cada establecimiento, siendo posible repetir los cultivos en algunos animales hasta 8 veces. A partir de estos hallazgos se

calcularon diferentes parámetros que definieron el desempeño operativo de la prueba intradérmica, estos cálculos se hicieron con una planilla Excel, de acuerdo a lo explicado en materiales y métodos en el apartado de análisis estadístico Bayesiano; la sensibilidad fue del 67% y la especificidad del 79,8%. El valor predictivo positivo (VPP) de la prueba fue del 42,5%, mientras que el valor predictivo negativo (VPN) resultó del 91,6% y la probabilidad pos prueba negativa (PPPN) fue del 0,8%. El LR+ fue de 3,3 y el LR- de 0,4. Cuando analizamos estos resultados con la prueba ROC obtuvimos una sensibilidad del 69% y una especificidad de 86,2%. Como mencionamos antes, estos valores se calcularon con la información recolectada hasta el momento, pero seguramente puede seguir modificándose, por la cronicidad característica de la enfermedad y las variaciones que puede sufrir el periodo de incubación (Körmendy, 1988). Otro factor que se debe tener en cuenta, es que estos valores se estiman teniendo como referencia el cultivo de Map, siendo considerada por algunos autores una “prueba de oro imperfecta” porque, aunque su especificidad es del 100%, su sensibilidad en las muestras de materia fecal es del 50% (Wang y col., 2006; Collins, 1996).

Aunque estos resultados concuerdan con la bibliografía relacionada con la prueba intradérmica con Johnina que menciona una especificidad alta (93,5%) y una sensibilidad baja (Kalis y col., 2003) esos estudios eran de tipo transversal, mientras que nuestros estudios fueron principalmente longitudinales, por lo que consideramos que los resultados obtenidos en este trabajo podrían aportar datos originales sobre la sensibilidad de la prueba.

Posteriormente pretendimos demostrar el efecto de algunas covariables en la capacidad operativa de la prueba intradérmica con la PPD Aviar. Estos análisis fueron realizados, en la mayoría de los casos, con pruebas estadísticas que permiten inferir la influencia de covariables en el desempeño de la prueba intradérmica previamente estimado con la prueba ROC. Las covariables estudiadas fueron el número de aplicaciones, el

intervalo de tiempo entre aplicaciones, la edad de los animales al momento de realizada la prueba y la prevalencia en los rodeos.

Cuando analizamos la influencia del número de aplicaciones y del tiempo del intervalo entre cada aplicación de la PPD Aviar trabajamos en dos etapas con los rodeos lecheros A y B, con animales entre los 3 y 31 meses de edad. En una primera etapa en el rodeo lechero A, logramos efectuar un total tres aplicaciones de PPD Aviar cada 6 meses y posteriormente, realizamos el cultivo la materia fecal de todos los animales para el aislamiento de Map. Durante este periodo detectamos 21 reactantes (un 80,76% de un total de 26), de los cuales 12 fueron reactantes una sola vez, 8 lo hicieron dos veces, y 1 animal fue reactante las tres veces (3,84%). De este ensayo pudimos deducir que el tiempo de duración de la inmunidad celular podía llegar a persistir durante 6 a 12 meses, en algunos animales, pero en la mayoría duraba un lapso menor, para definir mejor este tiempo, posteriormente hicimos otros ensayos.

Con respecto a la edad de los reactantes de este primer ensayo, el 57,14% tenía entre 13 y 19 meses de edad en su primera reacción positiva a la PPD Aviar, representando el 62,5% del total de aislamientos de Map. Los reactantes de hasta 1 año de edad constituyeron un 42,86% y fueron el 37,5% de los animales con aislamiento positivo de Map. La edad a la que resultaron positivos al cultivo fue variada, siendo el promedio de 26 meses. Por lo tanto, el resultado positivo de la prueba tuberculínica con PPD Aviar pudo adelantarse al cultivo aproximadamente 1 año en algunos animales, situación que podría ser considerada dentro de las posibilidades de control de la enfermedad con esta prueba. Solamente un animal de los 5 que fueron no reactantes a la prueba tuberculínica fue positivo al cultivo de Map.

En la segunda etapa, utilizamos un cronograma de aplicación de tuberculina con un intervalo de cada 2 meses, participaron 69 animales en el rodeo lechero A y 122 en el B, logramos aplicar 5 veces la tuberculina aviar en el rodeo lechero A y 6 veces en el B. En

estos ensayos encontramos un total de 31 reactantes (44,9%) en el rodeo lechero A y 44 en el rodeo lechero B (36%). En los animales reactantes a la prueba tuberculínica la mayoría de las reacciones (41,3%) solamente se detectaron una vez, siendo observadas en dos ocasiones en el 33,3% de los animales y tres veces en un 20%. Solamente en el rodeo lechero A, de mayor prevalencia a paratuberculosis, encontramos reactantes en 4 y 5 aplicaciones de PPD Aviar (12,9%). De esta manera logramos definir que la mayoría de las reacciones a la tuberculina aviar no se repiten en intervalos de tiempo de 2 meses, lo que nos permite inferir que la inmunidad celular promovida por la paratuberculosis no suele durar mucho tiempo; sin embargo, en los rodeos con mayor prevalencia existe mayor probabilidad de observar animales con una inmunidad celular, evidenciable por la respuesta positiva a la intradermorreacción con PPD Aviar, durante un periodo de 8 meses o más, como tuvimos la oportunidad de observar en el primer ensayo del rodeo lechero A.

Cuando calculamos la diferencia de meses entre la edad de la primera reacción positiva y la edad del aislamiento de Map, los resultados fueron variados según el rodeo, observándose un rango entre 5 a 22 meses en el rodeo lechero A, y de 1 a 9 meses en el rodeo lechero B. Estas diferencias parecieran verse influenciadas por la prevalencia de la enfermedad, encontrándose el mayor rango de tiempo en el rodeo de lechero A.

La importancia en el número de aplicaciones la tuberculina aviar la evaluamos con la prueba de ROC para comparar estadísticamente las AUC de los diferentes números de aplicaciones. Con una sola aplicación la AUC fue de 0.510 y se fue incrementando con cada inoculación, hasta llegar a 0.798 con seis aplicaciones, y la mayor diferencia entre las AUC la encontramos al comparar una aplicación sola con tres ($P < 0.001$). Nuestros hallazgos demuestran que al aumentar el número de aplicaciones de la prueba intradérmica con PPD Aviar mejoramos la sensibilidad de la prueba. El intervalo de tiempo entre las inoculaciones que practicamos en nuestros estudios nunca fue menor de dos meses, para evitar los riesgos de desensibilizar la región de la piel utilizada (Paterson, 1959; Ritchie, 1959; Coad y

col., 2010; Good y col., 2011b) y con el análisis de ROCRegression observamos que en nuestra investigación el mejor intervalo de tiempo entre cada aplicación de tuberculina fue de aproximadamente 3 meses, para tratar de disminuir el riesgo de no detectar a los reactantes a la prueba intradérmica.

Para terminar de definir el grado de influencia de la edad del animal al momento de la aplicación de la prueba tuberculínica, en primer lugar analizamos todas las edades en la que los animales fueron reactantes a la prueba intradérmica en todos los ensayos que efectuamos, y encontramos que en el rodeo lechero A la mayoría de los animales resultaron reactantes a la PPD Aviar alrededor de los 13 meses de edad, mientras que lo fueron a los 23 meses en el rodeo lechero B. Por otro lado, la edad en la que la mayoría de los reactantes a la tuberculina fueron positivos al aislamiento de Map fue alrededor de los 33 meses en el rodeo A, y en el rodeo B fue a los 23 y 33 meses. Cuando usamos el paquete estadístico ROCRegression, para considerar la edad de los animales al momento de ser reactantes a la PPD Aviar y el cultivo positivo de Map, observamos que la edad en la que la prueba intradérmica presentó mejor desempeño fue aproximadamente a los 20 meses. Otro análisis que empleamos fue el “modelo latente” de la estadística Bayesiana, aplicable para enfermedades con latencia o cronicidad, y nos permitió evaluar el efecto de la covariable edad en la prueba tuberculínica, el valor de la media fue de -0,56 y el ICB 95% fue estadísticamente significativo, indicando una correlación negativa de esta covariable, esto significa que a medida que aumenta la edad, su efecto sobre la prueba intradérmica disminuye. Esta observación concuerda con la descripción de la patogenia de la paratuberculosis, y como a medida que aumenta la edad del animal infectado, disminuye la inmunidad celular -la detectable por la prueba intradérmica- para dar luego lugar a la inmunidad de tipo humoral, y la manifestación de los signos clínicos (Chiodini, 1984; Clarke 1997; OIE, 2014).

Otro análisis con estadística Bayesiana, a partir de un modelo facilitado por el investigador Kostoulas, nos permitió equiparar la edad de los animales con los diferentes estadios de la paratuberculosis en los animales enfermos. En este análisis dividimos a los animales en tres grupos, de acuerdo a la presencia o ausencia de enfermedad, que denominamos “sanos” (individuos que no están enfermos de paratuberculosis), “infectados” (corresponde al primer y segundo estadio de la paratuberculosis, es decir de infección silente e infección subclínica) e “infecciosos” (para los que están en el tercer y cuarto estadio; de enfermedad clínica incipiente y clínica avanzada respectivamente). Además, cada grupo fue dividido según la edad de los animales en tres subgrupos: “Edad 1” (de 0-15 meses); “Edad 2” (entre 16-25 meses) y “Edad 3” (mayores de 26 meses). Los resultados nos demostraron que los grupos se comportan de manera diferente, siendo el grupo de infectados el más influenciado por la edad al momento de la aplicación de la tuberculina aviar. Los valores de diferencia en milímetros calculados fue de 0,37; 0,59 y 0,71 para cada subgrupo de “Edad 1, 2 y 3” respectivamente. Estos resultados, además de concordar con las características de la inmunopatogenia de la paratuberculosis, nos permitió ratificar el punto de corte sugerido para la lectura de la prueba intradérmica con PPD Aviar en una diferencia en milímetros >0 .

Nuestros análisis sobre la influencia de la prevalencia en los parámetros de las características operativas de la prueba intradérmica con tuberculina aviar, fueron hechos a partir de los rodeos que estudiamos en esta tesis, es decir, los dos rodeos lecheros positivos a paratuberculosis. Nuestros resultados demuestran que la sensibilidad y especificidad de esta prueba son similares aunque las prevalencias sean diferentes. Lo mismo ocurre con los LR+, LR- y el VPN (ver valores en Tabla 17). Los parámetros que fueron disímiles fueron el VPP, de un 48% para el rodeo lechero A y de 25% para el rodeo lechero B, y la PPPN que es de 0,8% y 0,2% en los rodeos lecheros A y B respectivamente. Con el programa estadístico ROCRegression observamos un mejor desempeño de la prueba intradérmica en

el rodeo lechero A. Aunque estos valores podrían ser considerados acertados o razonables, fueron obtenidos a partir de la información de muy pocos rodeos, por lo que consideramos deberían seguir siendo estudiados.

Cuando comparamos las covariables estudiadas en este trabajo con el programa ROCRegression, para determinar el grado de influencia que ejercen sobre el desempeño de la prueba intradérmica con PPD Aviar, logramos ordenarlas de mayor a menor influencia de la siguiente manera: intervalo entre aplicaciones, número de aplicaciones, la edad de los animales al momento de la aplicación intradérmica y la prevalencia de paratuberculosis en el rodeo. Por lo tanto podemos recomendar, al momento de disponer de medidas de control de la paratuberculosis, y si se quiere implementar la prueba intradérmica con tuberculina aviar, programar varias aplicaciones con un intervalo de tiempo preferentemente de cada 3 meses y como la edad ideal de los animales puede verse influenciada por la prevalencia del rodeo, se sugiere realizar las primeras aplicaciones en un rango de edad amplio hasta definir valores de la media y moda en cada caso. Es muy factible que se logre ganar tiempo en el diagnóstico de animales con mayor probabilidad de estar infectados con Map.

Está ampliamente difundida la idea de la asociación del pedigree en la infección por Map, porque al ser la vía de transmisión fecal-oral la más frecuente, se presupone que los terneros tienen más probabilidades de infectarse en los primeros días de lactancia (Clarke, 1997; Antognoli y col., 2007) y, en concordancia, el pedigree se asociaría con los resultados obtenidos a las pruebas diagnósticas. Sin embargo, nuestros análisis a partir de la filiación de los animales en el rodeo lechero A, con el programa ROCRegression nos demostró que la situación probable, en un rodeo con alta prevalencia, es que la influencia del pedigree se diluya y tome más importancia el contacto medioambiental con Map en los animales jóvenes. Por otra parte, si a este escenario se suma la realidad de las limitaciones diagnósticas de las pruebas disponibles, las probabilidades de controlar esta enfermedad a mediano plazo, basándonos en el pedigree, serían más limitadas.

En este trabajo, además evaluamos la presencia de un efecto sistémico relacionado con la aplicación intradérmica de la PPD Aviar en todos los rodeos estudiados. Con este fin realizamos la extracción de muestras de suero y plasma a animales seleccionados al azar al momento de la aplicación de la tuberculina, a las 72 horas (lectura de la prueba), a los 10-14 días de la inoculación y en algunos casos a los 20 días pos aplicación; se hizo el dosaje de Ig G, proteínas totales, fibrinógeno y haptoglobina. En general los valores obtenidos fueron variados y no siempre se pudieron asociar a la aplicación de la tuberculina aviar.

En las mediciones de Ig G contra paratuberculosis con la prueba de ELISA, nuestros hallazgos cambiaron de acuerdo al rodeo, siendo los animales estudiados del rodeo negativo los que presentaron los valores de DO más bajos en todos los muestreos. En el rodeo lechero A, no observamos diferencias significativas en los valores de DO entre los reactantes y no reactantes a la prueba intradérmica ($P=0,37$), como también entre los distintos momentos de los muestreos ($P \geq 0,44$), siendo los promedios de DO observados por debajo de 400. En este rodeo se destacaron algunas situaciones; por ejemplo, dos animales reactantes a la PPD Aviar presentaron DO elevadas a los 14 días pos inoculación; uno de ellos actualmente, con más de 48 meses de edad, es positivo a la prueba de ELISA y el segundo animal, aproximadamente a los 54 meses de edad, fue cultivo positivo a Map. Probablemente en estos animales pudimos detectar ambas respuestas inmunológicas en el período en el que se pueden superponer entre ellas. Otro animal de este rodeo fue reactante negativo a la tuberculina aviar, manifestó DO elevada a los 14 días pos aplicación y posteriormente, resultó positivo al cultivo de Map a los 24 meses de edad; en este caso probablemente la inmunidad humoral ya era la predominante, empezando a liberar suficiente número de micobacterias detectables al cultivo.

En el rodeo lechero B pudimos observar diferencias significativas entre los reactantes negativos y positivos a la tuberculina ($P=0,029$) encontrando los promedios más elevados de DO en los reactantes negativos a la PPD Aviar; en este grupo también observamos

situaciones interesantes, los dos animales que presentaron los valores de DO más altos, tenían 20 y 25 meses de edad y poco después, fueron cultivos positivos a Map respectivamente a los 23 y 26 meses de vida; en ambos casos estos animales habían sido previamente reactantes positivos a la prueba intradérmica a los 6 y 16 meses de edad; nuevamente estos hallazgos podrían situarnos en casos en donde la inmunidad humoral aumenta a medida que disminuye la inmunidad celular en los animales infectados con Map. Asimismo, entre los reactantes positivos a la tuberculina aviar, podemos destacar que se encontraron tres animales con los valores de DO más elevados al ELISA en el momento del muestreo, dos de ellos, pocos meses después, resultaron ser positivos al aislamiento de Map, el tercero hasta el momento, es cultivo negativo a Map. Podemos inferir que en los rodeos con paratuberculosis existen variaciones individuales en la duración de los distintos tipos de respuestas inmunes, que no solo se pueden superponer entre sí, sino que pueden coincidir con la liberación de micobacterias detectables al cultivo de materia fecal; siendo nuestros hallazgos concordantes con lo descrito por otros investigadores (Begg y col., 2011; Magombedze y col., 2014).

Al evaluar las concentraciones de proteínas totales (PT) del plasma sanguíneo, nuestros resultados en los rodeos lecheros A, B y rodeo negativo fueron similares, conservándose dentro de los valores normales para los bovinos (6-8 g/dL); además, no observamos diferencias significativas ($P=0,99$) entre los valores de las PT el día de aplicación de la tuberculina aviar, el día de lectura y 10 días pos aplicación.

En el caso del fibrinógeno, no hallamos diferencias significativas entre los rodeos lecheros y el rodeo negativo ($P=0,47$), ni entre los reactantes y no reactantes a la reacción tuberculínica ($P=1$). Siendo el rango considerado normal en los bovinos de 0,1-0,6 g/dL, los valores plasmáticos fueron más elevadas al momento de la lectura de la prueba intradérmica en el rodeo lechero B, con una diferencia significativa entre el día de la aplicación y la lectura ($P=0,004$), el mayor valor encontrado en tres animales fue de 1 g/dL; mientras que

en el rodeo lechero A, los valores siempre se mantuvieron en el rango normal. En el rodeo negativo a paratuberculosis los niveles de fibrinógeno que hallamos fueron un poco más elevados el día de la lectura de prueba intradérmica y 10 días después de la aplicación.

Para la haptoglobina, los valores hallados fueron variados, nuevamente fue en el rodeo lechero B, a las 72 horas pos aplicación de la prueba tuberculínica, en donde encontramos algunos valores superiores al rango considerado normal en los bovinos (0-10 $\mu\text{g/mL}$), siendo en este grupo la concentración más alta hallada en un animal reactante a la PPD Aviar de 14 $\mu\text{g/mL}$. El análisis de los promedios de estos valores no presentaron diferencias significativas entre los rodeos ($P=0,99$) ni entre los reactantes positivos y negativos a la tuberculina aviar ($P=0,32$). Sin embargo, hallamos diferencias significativas entre el día de la aplicación y la lectura de $P=0,01$ en el rodeo lechero B.

En nuestros ensayos coincidieron que todos los animales con valores elevados para el fibrinógeno también tuvieron concentraciones altas de haptoglobina. Solamente un 10% de animales presentaron mediciones altas de haptoglobina y valores normales de fibrinógeno.

Aunque los valores que detectamos en las PFA no llegaron a niveles muy altos, por la cercanía al momento de la aplicación intradérmica de la tuberculina aviar, estos resultados nos sugieren que la concentración del fibrinógeno y de la haptoglobina se elevó en respuesta a dicha aplicación. Las PFA pueden aumentar hasta 1000 veces su concentración plasmática en respuesta a citoquinas proinflamatorias, conformando parte de la respuesta sistémica de la inmunidad innata ante un foco inflamatorio, o en algunos casos a situaciones estresantes (Eckersall y Bell, 2010; Alsemgeest y col., 1995; González Fernández de Castro, 2000). Nuestros hallazgos indicarían que la aplicación de la PPD Aviar, en algunos animales, puede inducir a un aumento leve y poco duradero en su concentración, aunque sería difícil estimar el grado de importancia en estos resultados, del factor estresante asociado a las maniobras relacionadas con el manejo de los animales.

5. Conclusiones

"A veces sentimos que lo que hacemos es tan solo una gota en el mar, pero el mar sería menos si le faltara una gota"
Madre Teresa de Calcuta.



1. La paratuberculosis bovina es una enfermedad compleja en su patogenia, siendo importante el aporte de estudios longitudinales para comprender los factores que pueden condicionar su presencia en distintos rodeos.
2. La prueba intradérmica con PPD Aviar puede utilizarse como método diagnóstico complementario de la paratuberculosis, demostrando en este estudio longitudinal valores predictivos positivos y negativos aceptables.
3. Esta prueba demostró ser capaz de detectar principalmente a los animales enfermos de paratuberculosis con infección silente e infección subclínica.
4. La prueba intradérmica con PPD Aviar puede aplicarse en el PACI, con la concentración actualmente elaborada por SENASA de 0,5 mg/mL, y el criterio de lectura sugerido para ser considerado reactante es el de una diferencia entre pligues cutáneos a las 72 hs > 0 mm.
5. El número de repeticiones de la aplicación de la PPD Aviar influye en la sensibilidad de la prueba, siendo recomendable realizar de 3 a 5 aplicaciones para una mayor sensibilidad.
6. La frecuencia de la aplicación de la PPD Aviar es importante, ya que la duración de la respuesta inmune celular es variable, se sugiere un intervalo de tiempo entre cada aplicación de no más de 3 meses.
7. Determinar la edad de aplicación de mejor desempeño de la prueba intradérmica, requerirá de primeras inoculaciones en bovinos de un rango etario amplio, por ejemplo entre los 4-24 meses de edad; en nuestro estudio, la mejor edad fue a los 20 meses.
8. Algunos animales infectados, pueden tener periodos de inmunidad celular y humoral superpuestos con la liberación de Map por materia fecal en niveles detectables al cultivo.
9. Las PFA pueden elevarse en algunos animales ulteriormente a la aplicación intradérmica de la PPD aviar, alcanzando niveles levemente altos de concentración y de poca duración.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Alonzo TA, Pepe MS. Distribution-free ROC analysis using binary regression techniques. *Biostatistics* 2002; 3: 421-432.
2. Álvarez J, de Juan L, Bezos J, Romero B, Sáez JL, Marqués S, Domínguez C, Minguez O, Fernández-Mardomingo B, Mateos A, Domínguez L, Aranaz A. Effect of paratuberculosis on the diagnosis of bovine tuberculosis in a cattle herd with a mixed infection using interferon-gamma detection assay. *Vet Microbiol* 2009; 135: 389-893.
3. Alsemgeest SPM, Lambooy IE; Wierenga HK; Dieleman SJ; Meerkerk B; Van Ederen AM, Niewold TA. Influence of physical stress on the plasma concentration of serum amyloid-A and haptoglobin in calves. *Vet Quart* 1995; 17: 9-12.
4. Antognoli MC, Hirst HL, Garry FB, Salman MD. Immune response to and faecal shedding of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in young dairy calves, and the association between test results in the calves and the infection status of their dams. *Zoonoses Public Health* 2007; 54: 152-159.
5. Aranaz A, de Juan L, Bezos J, Alvarez J, Romero B, Lozano F, Paramio JL, Lopez-Sanchez J, Mateos A, Dominguez L. Assessment of diagnostic tools for eradication of bovine tuberculosis in cattle coinfecting with *Mycobacterium bovis* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Res* 2006; 37: 593-606.
6. 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.
7. Baisden LA, Larsen A, Vardaman TH. Relative sensitivity of different skin areas of cattle to intradermal tests. *American Am J Vet Res* 1951; 12: 273-275.
8. Bagueño MJ, García-Bastos JL, González-Buitrago JM. Las curvas ROC en la evaluación de las pruebas diagnósticas. *Med Clin (Barc)* 1995; 104: 661-670.
9. Bastida F, Juste RA. Paratuberculosis control: a review with a focus on vaccination. *J Immune Based The Vaccines* 2011; 9: 1-17.

10. Beck JS, Morley SM, Lowe JG, Brown RA, Grange JM, Gibbs JH, Potts RC, Kardjito T. Diversity in migration of CD4 and CD8 lymphocytes in different microanatomical compartments of the skin in the tuberculin reaction in man. *Br J Exp Pathol* 1988; 69: 771–780.
11. Begg D, de Silva K, Carter N, Plain K, Purdie A, Whittington RJ. Does a Th1 over Th2 dominancy really exist in the early stages of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infections? *Immunobiology* 2011; 216: 840–846.
12. Bernardelli A. Manual de Procedimiento Técnico Diagnóstico de Paratuberculosis. SENASA 2000; 1-47. [Online] <http://www.aavld.org.ar/paratub.pdf>
13. Bernardelli A. Manual de Procedimientos. Clasificación fenotípica de las micobacterias. SENASA 2007; 1-65. [Online] <http://www.senasa.gov.ar/Archivos/File/File1443-mlab.pdf>
14. Bernardelli A. Producción y control de tuberculina bovina y aviar. Derivado Proteico Purificado (DPP). SENASA 2007; 1-76. [Online] <http://www.senasa.gov.ar/Archivos/File/File1011-tuberbov.pdf>
15. Bolstad WM. Introduction to Bayesian Statistics. Second Edition, New Jersey, Wiley John and Sons, Inc. 2007.
16. Buergelt CD, Hall C, Mc Entee K, Duncan JR. Pathological evaluation of paratuberculosis in naturally infected cattle. *Vet Pathol* 1978; 2: 196-207.
17. Burton PR. Helping doctors to draw appropriate inferences from the analysis of medical studies. *Stat Med* 1994; 13: 1699-1713.
18. Cai T, Pepe MS. Semiparametric receiver operating characteristic analysis to evaluate biomarkers for disease. *Journal of the American Statistical Association* 2002; 97: 1099-1107.
19. Chacón O, Bermúdez LE, Barletta RG. Johne's disease, inflammatory bowel disease, and *Mycobacterium paratuberculosis*. *Annu Rev Microbiol* 2004; 58: 329-363.

20. Cheville N, Hostetter J, Thomsen B, Simutis F, Vanloubbeeck Y, Steadham E. Intracellular trafficking of *Mycobacterium avium* ss. *paratuberculosis* in macrophages. DTW Deutsche tierärztliche Wochenschrift 2001; 108: 236-243.
21. Chiodini R, van Kruiningen HJ, Merkal RS. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease) the current status and future prospects. Cornell Vet 1984; 74: 218-262.
22. Chiodini R, van Kruiningen H. Characterization of *Mycobacterium paratuberculosis* bovine, caprine, and ovine origin by gas-liquid chromatographic analysis of fatty acids in whole-cell extracts. Am. J. Vet. Res 1985; 46: 1980-1989.
23. Chiodini RJ, Hermon-Taylor J. The thermal resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk under conditions simulating pasteurization. J Vet Diagn Invest 1993; 5: 629-631.
24. 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: 966-971.
25. Cicuta ME. Validez de la prueba tuberculínica en el diagnóstico de paratuberculosis bovina en el NEA. Rev Med Vet 1999; 80: 72-74.
26. Cirone K. Characterization and viability of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk, cheese and water. Balcarce, Argentina, Thesis of Graduate. Faculty of Agrarian Sciences, Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina 2004; 1-65.
27. Clarke C. Host responses to *Mycobacterium paratuberculosis*/*M. avium* infection. Proceedings of the Fourth International Colloquium on Paratuberculosis UK July 1994; 17: 345-365.
28. Clarke CJ. The Pathology and Pathogenesis of Paratuberculosis in Ruminants and Other Species. J Comp Path 1997; 116: 217-261.

29. Click RE. A 60-day probiotic protocol with *Dietzia* subsp. C79793-74 prevents development of Johne's disease parameters after in utero and/or neonatal MAP infection. *Virulence* 2011; 2: 337-347.
30. Coad M, Clifford D, Rhodes SG, Hewinson RG, Vordermeier HM, Whelan AO. Repeat tuberculin skin testing leads to desensitisation in naturally infected tuberculous cattle which is associated with elevated interleukin-10 and decreased interleukin-1 beta responses. *Vet Res* 2010; 41: 14-36.
31. Cocito C, Gilot P, Coene M, de Kesel M, Poupart P, Vannuffel P. Paratuberculosis. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7: 328-345.
32. Collins DM, Gabric DM, de Lisle GW. Identification of a repetitive sequence specific to *Mycobacterium paratuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett* 1989; 60: 175-178.
33. Collins DM, Gabric DM, De Lisle GW. Identification of Two Groups of *Mycobacterium paratuberculosis* Strains by Restriction Endonuclease Analysis and DNA Hybridization. *J of Clin Microbiol* 1990; 28: 1591-1596.
34. Collins MT. Clinical approach to control of bovine paratuberculosis. *JAVMA* 1994; 204: 208-210.
35. Collins MT. Diagnosis of paratuberculosis. *Vet Clin of North Am: Food Animal Practice* 1996; 12: 357-371.
36. Committee on Diagnosis and Control of Johne's Disease, and Board on Agriculture and Natural Resources. *Diagnosis and control of Johne's disease*. Washington, D.C, The National Academies Press. 2003.
37. Cooke RF, Arthington JD. Concentrations of haptoglobin in bovine plasma determined by ELISA or a colorimetric method based on peroxidase activity. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2013; 97: 531-536.
38. Corva S, Silvestrini MP, Antonini A. *Manual de bioestadística veterinária*. 1era edición. Buenos Aires. Argentina. Editorial PROVETSUR, 2010, p 3-195.

39. 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: 16-22.
40. Costanzo G, Alvarado Pinedo F, Mon ML, Viale M, Gil A, Illia MC, Gioffré A, Arese A, Travería G, Romano MI. Accuracy assessment and screening of a dairy herd with paratuberculosis by three different ELISAs. *Vet Microbiol* 2012; 23: 183-188.
41. Cousins DV, Condrón RJ, Eamens GJ, Whittington RJ, de Lisle GW. Johne's disease. In: Australian Standard Diagnostic Tests. Sub-Committee on Animal Health Laboratory Standards 2002; 1-21. [Online] http://www.daff.gov.au/data/assets/pdf_file/0005/1280867/jd1.pdf
42. Cox JC, Drane DP, Jones SL, Ridge S, Milner AR. Development and evaluation of a rapid absorbed enzyme immunoassay test for the diagnosis of Johne's disease in cattle. *Aust Vet J* 1991; 68(5): 157-160.
43. Cross JP, Reynolds GE, Mackintosh CG, Griffin JF. Evaluation of relationship between plasma fibrinogen concentration and tuberculin testing in red deer. *JAVMA* 1991; 198: 1785-1788.
44. Damato JJ, Collins MT. Growth of *Mycobacterium paratuberculosis* in radiometric, Middlebrook and egg-based media. *Vet Microbiol* 1990; 22: 31-42.
45. De Juan L; Mateos A, Domínguez L, Sharp JM, Stevenson K. Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates from goats detected by pulsed-field gel electrophoresis. *Veterinary Microbiol* 2005; 106: 249-257.
46. de la Rúa-Domenech R, Goodchild AT, Vordermeier HM, Hewinson RG, Christiansen KH, Clifton-Hadley RS. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the tuberculin tests, c-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Research in Veterinary Science* 2006; 81: 190–210.

47. Doherty ML, Monaghan ML, Bassett HF, Quinn PJ. Effect of a recent injection of purified protein derivative on diagnostic tests for tuberculosis in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *Res Vet Sci* 1995; 58: 217–221.
48. Doherty ML, Bassett HF, Quinn PJ, Davis WC, Kelly AP, Monaghan ML. A sequential study of the bovine tuberculin reaction. *Immunology* 1996; 87: 9-14.
49. Dohmann K, Strommenger B, Stevenson K, de Juan L, Stratmann J, Kapur V, Bull T, Gerlach GF. Characterization of Genetic Differences between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Type I and Type II Isolates. *J of Clin Microbiol* 2003; 41: 5215-5223.
50. Dow CT. *M. paratuberculosis* Heat Shock Protein 65 and Human Diseases: Bridging Infection and Autoimmunity. *Autoimmune Dis* 2012; 1-6.
51. Eckersall PD, Bell R. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *Vet J* 2010; 185: 23-27.
52. Ellingson JLE, Bolin CA, 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. Englund S, Ballagi-Pordány A, Bölske, Johansson KE. Single PCR and Nested PCR with a Mimic Molecule for Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Diag Microbiol Infec Dis* 1999; 33: 163-171.
54. 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*. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4359-4365.
55. Faraggi D. Adjusting receiver operating characteristic curves and related indices for covariates. *The Statistician* 2003; 52: 179–192.

56. 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. *Can Vet J* 2013; 54: 1083-1085.
57. Fernández-Silva JA, Correa-Valencia NM, Ramírez NF. Systematic review of the prevalence of paratuberculosis in cattle, sheep, and goats in Latin America and the Caribbean. 2014; 46: 1321-40.
58. Francis J, Seiler RJ, Frost AJ. The efficiency and dose of bovine purified protein derivative tuberculin. *Australian Veterinary Journal* 1978a; 54: 44-46.
59. Francis J, Seiler RJ, Wilkie IW, O'Boyle D, Lumsden MJ, Frost AJ. The sensitivity and specificity of various tuberculin tests using bovine PPD and other tuberculins. *Vet Rec* 1978b; 103: 420-425.
60. Garrido JM, Cortabarria N, Oguiza JA, Aduriz G, Juste RA. Use of a PCR method on fecal samples for diagnosis of sheep paratuberculosis. *Vet Microbiol* 2000; 77: 379-386.
61. Gilardoni LR, Paolicchi FA, Mundo SL. Bovine paratuberculosis: a review of the advantages and disadvantages of different diagnostic tests. *Revista Argentina de Microbiología* 2012; 44: 201-215.
62. Gilot P, Cocito C. Comparative analysis of three sensitins used in cutaneous testing for tuberculosis and paratuberculosis in cattle. *FEMS Microbiol Lett* 1993; 110: 307-311.
63. Glanemann B, Hoelzle LE, Bögli-Stuber K, Jemmi T, Wittenbrink MM. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Swiss dairy cattle by culture and serology. *Schweiz Arch Tierheilkd.* 2004; 146: 409-415.
64. González J, Geijo MV, García-Pariente C, Verna A, Corpa JM, Rey LE, Ferreras MC, Juste RA, García Marín JF, Pérez V. Histopathological classification of lesions associated with natural paratuberculosis infection in cattle. *J Comp Path* 2005; 133: 184-196.

65. González Fernández de Castro. Evaluación de procesos inflamatorios en bóvidos: determinación de proteínas de fase aguda. *Med Vet* 2000; 17: 38-45.
66. Good M, Clegg TA, Costello E, More SJ. The comparative performance of the single intradermal test and the single intradermal comparative tuberculin test in Irish cattle, using tuberculin PPD combinations of differing potencies. *Vet J* 2011a; 190: 60-65.
67. Good M, Duignan A. Perspectives on the History of Bovine TB and the Role of Tuberculin in Bovine TB Eradication. *Vet Med Int* 2011b; 1-11.
68. Gradmann C. Krankheit im Labor. Robert Koch und die medizinische Bakteriologie. Wallstein Verlag, Deutschland, 2005, p 105-163.
69. Greenstein R. Is Crohn's disease caused by a mycobacterium? Comparisons with leprosy, tuberculosis, and Johne's disease. *The Lancet Infect Dis* 2003; 3: 507-513.
70. Gruys E, Toussaint MJ, Niewold TA, Koopmans SJ. Acute phase reaction and acute phase proteins. *J Zhejiang Univ Sci B* 2005a; 6: 1045-1056.
71. Gruys E, Toussaint MJ, Upragarin N, Van EA, Adewuyi AA, Candiani D, Nguyen TK, Sabeckiene J. Acute phase reactants, challenge in the near future of animal production and veterinary medicine. *J Zhejiang Univ Sci B* 2005; 6: 941-947.
72. Guanzioli Stefani MC, Cicuta de Gallardo, ME. Tuberculinización en Búfalos. 2005. [Online] <http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/com2005/index.htm>
73. Gwozdz JM, Thompson KG, Murray A, Reichel MP, Manktelow BW, West DM. Comparison of three serological tests and an interferon-gamma assay for the diagnosis of paratuberculosis in experimentally infected sheep. *Aust Vet J* 2000; 78: 779-783.
74. Harris NB, Barletta RG. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. *Clin Microbiol Review* 2001; 14: 489-512.
75. Hermon-Taylor, J. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in the causation of Crohn's disease. *World Journal of Gastroenterology* 2000; 5: 630-632.

76. Hermon-Taylor J, Bull T. Crohn's disease caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a public health tragedy whose resolution is long overdue. *J Med Microbiol* 2002; 51: 3-6.
77. Hermon-Taylor J, El-Zaatari FAK. The *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* problem and its relation to the causation of Crohn disease. In *Pathogenic Mycobacteria in Water: A Guide to Public Health Consequences, Monitoring and Management*. Edited by Pedley S, Bartram J, Rees G, Dufour A, Cotruvo J, London, UK, 2004, p 74-93.
78. Hett EC, Rubin EJ. Bacterial Growth and Cell Division: a Mycobacterial Perspective. *Microbiol Mol Biol Rev* 2008; 72: 126–156.
79. Hines ME 2nd, Stabel JR, Sweeney RW, Griffin F, Talaat AM, Bakker D, Benedictus G, Davis WC, de Lisle GW, Gardner IA, Juste RA, Kapur V, Koets A, McNair J, Pruitt G, Whitlock RH. Experimental challenge models for Johne's disease: a review and proposed international guidelines. *Vet Microbiol* 2007; 122: 197-222.
80. Hostetter JM, Steadham EM, Haynes JS, Bailey TB, Cheville NF. Cytokine effects on maturation of the phagosomes containing *Mycobacteria avium* subsp. *paratuberculosis* in J774 cells. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 2002; 34: 127–134.
81. Jubb TF, Sergeant ES, Callinan AP, Galvin J. Estimate of the sensitivity of an ELISA used to detect Johne's disease in Victorian dairy cattle herds *Aust Vet J* 2004; 82: 569-573.
82. 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.
83. Karunasena E, Kurkure PC, Lackey RD, McMahon KW, Kiernan EP, Graham S, Alabady MS, Campos DL, Tatum OL, Brashears MM. Effects of the probiotic

- Lactobacillus animalis* in murine *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection. BMC Microbiol 2013; 16: 1-13.
84. Kennedy D. International efforts at paratuberculosis control. Vet Clin North Am Food Anim Pract 2011; 27: 647-654.
85. Kerr WR, Lamont HG, McGirr JL. Further studies on tuberculin sensitivity in the bovine. The veterinary Record 1949; 61: 466-474.
86. Kopecky KE, Booth GD, Merkal RS, Larsen AB. Hematologic changes associated with intravenous Johnin testing in cattle. Am J Vet Res 1971; 32: 1343-1347.
87. Körmendy B, Tuboly S, Nagy G, Török J, Abonyi T. Diagnostic value of intravenously administered johnin purified protein derivative (PPD) in bovine paratuberculosis. Acta Vet Hung 1990; 38:43-53.
88. Körmendy B. Diagnostic value of mammalian, avian and johnin PPD tuberculins in cattle herds infected by *Mycobacterium paratuberculosis*. Acta Vet Hung 1988; 36: 177-183.
89. Kostoulas P, Browne WJ, Nielsen SS, Leontides L. Bayesian mixture models for partially verified data: age- and stage-specific discriminatory power of an antibody ELISA for paratuberculosis. Prev Vet Med 2013; 111: 200-205.
90. Kreeger JM. Ruminant paratuberculosis-a century of progress and frustration. J Vet Diagn Invest 1991; 3: 373-382.
91. Larsen AB, Vardaman TH. The effect of isonicotinic acid hydrazide on *Mycobacterium paratuberculosis*. J Am Vet Med Assoc 1953; 122: 309-310.
92. Leite FL, Stokes KD, Robbe-Austerman S, 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: 27-34.
93. Lepper AW, Pearson CW, Corner LA. Anergy to tuberculin in beef cattle. Aust Vet J 1977; 53: 214-216.

94. Lévy-Frébault VV, Portaels F. Proposed minimal standards for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium* species. *Int J Syst Bacteriol* 1992; 42: 315-323.
95. 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; 102: 12344-12349.
96. Lilenbaum W; Marassi CD; Oelemann WMR. Paratuberculosis: an update. Mini-review. *Brazilian Journal of Microbiology* 2007; 38: 580-590.
97. Lisby G, Andersen J, Engbaek K, Binder. *Mycobacterium paratuberculosis* in Intestinal Tissue from Patients with Crohn's Disease Demonstrated by a Nested Primer Polymerase Chain Reaction. *Scand J Gastroenterol* 1994; 29: 923-929.
98. 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 J Gastroenterol* 2014; 20: 13060-13070.
99. Lusted LB. Signal detectability and medical decision-making. *Science* 1971; 171: 1.217-1.219.
100. Lyashchenko K, Whelan AO, Greenwald R, Pollock JM, Andersen P, Hewinson RG, Vordermeier HM. Association of Tuberculin-Boosted Antibody Responses with Pathology and Cell-Mediated Immunity in Cattle Vaccinated with *Mycobacterium bovis* BCG and Infected with *M. bovis*. *Infection and Immunity* 2004; 72: 2462–2467.
101. Magnano GG, Macias AF, Pérez Zavala V, Schneider MO, Bérnago EG, Giraudo JA., Sticotti E, Macio M, Bernardelli A. Investigación de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en leche ultrapasteurizada para consumo humano. *In Vet* 2009; 11: 93-97.
102. Magombedze G, Eda S, Ganusov VV. Competition for Antigen between Th1 and Th2 Responses Determines the Timing of the Immune Response Switch during

- Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* Infection in Ruminants. PLoS Comput Biol 2014; 10: 1-13.
103. Mahé A, Bougeard S, Huneau-Salaün A, Le Bouquin S, Petetin I, Rouxel S, Lalande F, Beloeil PA, Rose N. Bayesian estimation of flock-level sensitivity of detection of *Salmonella spp.*, *Enteritidis* and *Typhimurium* according to the sampling procedure in French laying-hen houses. Prev Vet Med 2008; 84: 11-26.
104. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 5th edition, 2004. Chapter 2.3.3. Bovine Tuberculosis. [Online] http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/A_00054.htm
105. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 5th edition, 2004. Chapter 2.2.6. [Online] http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/a_00045.htm
106. Manual OIE. Paratuberculosis (enfermedad de Johne). 2014. [Online] http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.01.11_Paratuberculosis.pdf
107. Marsh I, Whittington R, Cousins D. PCR-restriction endonuclease analysis for identification and strain typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium* based on polymorphisms in IS1311. Mol Cell Probes 1999; 13: 115-126.
108. McFadden JJ, Butcher PD, Chiodini R, Hermon-Taylor J. Crohn's disease – isolated mycobacteria are identical to *Mycobacterium paratuberculosis*, as determined by DNA probes that distinguish between mycobacterial species. J Clin Microbiol 1987a; 25: 96–801.
109. McFadden JJ, Butcher PD, Thompson J, Chiodini R, Hermon-Taylor J. The use of DNA probes identifying restriction fragment length polymorphisms to examine the *Mycobacterium avium complex*. Mol Microbiol 1987b; 1: 283–291.

110. Merkal RS. Diagnostic methods for detection of paratuberculosis (Johne's disease). 74th Annual Meeting of the US Animal Health Association, USA, 1970, Abstract 74, p. 620-623,
111. Merkal RS, Larsen AB. Clofazimine treatment of cows naturally infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am J Vet Res* 1973; 34: 27-28.
112. Merkal RS. Paratuberculosis. In: *The Mycobacteria: A Sourcebook*, Kubica G.P. & Wayne L.G., eds. Marcel Dekker, New York, USA, 1984; p 1237–1249.
113. Momotani E, Whipple D, Thiermann A, Cheville N. Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches in calves. *Veterinary Pathology Online* 1988; 25: 131–137.
114. Monaghan ML, Doherty ML, Collins JD, Kazda JF, Quinn PJ. The tuberculin test. *Veterinary Microbiology* 1994; 40: 111-124.
115. Moravkova M, Hlozek P, Beran V, Pavlik I, Preziuso S, Cuteri V. Strategy for the detection and differentiation of *Mycobacterium avium* species in isolates and heavily infected tissues. *Res Vet Sci* 2008; 85: 257-264.
116. Moreira AR, Späth EGA, Morsella C. Seroprevalence of Johne's disease in eleven districts of Buenos Aires, Argentina. *The Paratuberculosis Newsletter* 1994; 6: 18.
117. Moreira AR, Paolicchi F, Morsella C, Zumarraga M, Cataldi A, Fabiana B, Alicia A, Piet O, van Soolingen D, Isabel RM. Distribution of IS900 restriction fragment length polymorphism types among animal *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from Argentina and Europe. *Vet Microbiol* 1999; 70: 251-259.
118. Motiwala AS, Strother M, Amonsin A, Byrum B, Naser SA, Stabel JR, Shulaw WP, Bannantine JP, Kapur V, Sreevatsan S. Molecular Epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: Evidence for Limited Strain Diversity, Strain Sharing, and Identification of Unique Targets for Diagnosis 2003; 41: 2015–2026.
119. Nauta MJ, Van der Giessen. Human exposure to *Mycobacterium paratuberculosis* via pasteurised milk: A modelling approach. *The Vet Record* 1998; 143: 293-296.

120. Oriani DS, Sagardoy MA. Nontuberculous mycobacteria in soils of La Pampa Province (Argentina). *Rev Arg Microbiol* 2002; 34: 132- 137.
121. Palmer MV, Waters WR, Thacker TC, Greenwald R, Esfandiari J, Lyashchenko KP. Effects of Different Tuberculin Skin-Testing Regimens on Gamma Interferon and Antibody Responses in Cattle Experimentally Infected with *Mycobacterium bovis*. *Clinical And Vaccine Immunology* 2006; 13: 387–394.
122. Paolicchi F, Morsella C, Verna A, Spath E, Martinis D, Zumárraga M, Giofree A, Cataldi A, Romano M. Diagnosis, epidemiology, and Program of control of Paratuberculosis in bovine herds of Argentina. 7th International Colloquium on Paratuberculosis. S7. P1 2002; 114: 132.
123. Paolicchi F, Cirone K, Morsella C, Gioffré A, Cataldi A, Romano M. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) from commercial pasteurized milk. 8th International Colloquium on Paratuberculosis. 2005, Copenhagen, Denmark. [Online] http://www.paratuberculosis.info/proc8/abst3b_p84.htm
124. Paolicchi FA, Romano MI. Paratuberculosis. In: Stanchi NO, editor. *Microbiología Veterinaria*, Segunda edición. Buenos Aires, Intermédica, 2007; 425-431.
125. Paolicchi F, Cirone K, Morsella C, Gioffré A. First isolation of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* from commercial pasteurized milk in Argentina. *Braz J Microbiol* 2012; 43: 1034-1037.
126. Paterson AB. Tuberculosis, In *Diseases due to bacteria*, vol 2. Stableforth AW, Galloway IA, editors, Butterworth's, London, United Kingdom, 1959. p 716–744.
127. Pennimpede EFF; Gómez CM; Stanchi NO. *Introducción a la Inmunobiología*. 1° Edición. Buenos Aires. Argentina: Editorial de la Universidad de La Plata; 2004.
128. Pfeiffer DU. *Veterinary Epidemiology-An Introduction*, Editado por la Agencia de Cooperacion Internacional del Japon (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.

129. Platt JL, Grant BW, Eddy AA, Michael AF. Immune cell populations in cutaneous delayed-type hypersensitivity. *J Exp Med* 1983; 158: 1227-1242.
130. Pinedo PJ, Williams JE, Monif GRG, Rae DO, Buergelt CD. *Mycobacterium paratuberculosis* shedding into milk: association of ELISA seroreactivity with DNA detection in milk. *Inter J Appl Res Vet Med* 2008; 6: 137-144.
131. R Core Team. 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. [Online] <http://www.R-project.org/>
132. Reddacliff LA, Vadali A, Whittington RJ. The effect of decontamination protocols on the numbers of sheep strain *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from tissues and faeces. *Vet Microbiol* 2003; 24: 271-282.
133. Ritchie JN. *R Soc Health J*. Bovine tuberculosis: the end in sight. *RSoc Health J* 1959; 79: 461-469.
134. Robertson EA, Zweig MH. Use of Receiver Operating Characteristic Curves to evaluate the clinical performance of analytical systems. *Clin Chem* 1981; 27: 1.569-1.574.
135. Rodríguez-Alvarez MX, Lopez de Ullibarri I. ROCRegresion: Reseiver Operating Characteristic (ROC) regression techniques. R package version 1.0. 2010.
136. Rodríguez-Álvarez MX, Tahoces PG, Cadarso-Suárez C, Lado MJ., Comparative study of ROC regression techniques. Applications for the computeraided diagnostic system in breast cancer detection. *Computational Statistics and Data Analysis* 2011a; 55: 888–902.
137. Rodríguez-Álvarez MX, Roca-Pardiñas J, Cadarso-Suárez C. A new flexible direct ROC regression model: Application to the detection of cardiovascular risk factors by anthropometric measures. *Computational Statistics and Data Analysis* 2011b; 55: 3257–3270.

138. Runyon EH. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. *Med Clin North Am* 1959; 43: 273-290.
139. Rosenbusch F. La enfermedad de Johne o enteritis paratuberculosa del bovino en la Argentina. *Anales de la Sociedad Rural Argentina* 1937; 5: 475-480.
140. Savage IR. Nonparametric statistics. *JASA* 1957; 52: 332-333.
141. Saxegaard F, Fodstad FH. Control of paratuberculosis (Johne's disease) in goats by vaccination. *Vet Rec* 1985; 116: 439-441.
142. Sherman DM, Bray B.; Gay JM, Bates F. Evaluation of the agar gel immunodiffusion test for diagnosis of subclinical paratuberculosis in cattle. *Am J Vet Res* 1989; 50: 525-530.
143. Sherman DM, Markham RJF, Bates F. Agar gel immunodiffusion test for diagnosis of clinical paratuberculosis in cattle. *JAVM* 1984; 185: 179-182.
144. 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.
145. Shin SJA, Han JH, Manning EJB, Collins MT. Rapid and reliable method for quantification of *Mycobacterium paratuberculosis* by use of the BACTEC MGIT 960 System. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 1941-1948.
146. Sigurðardóttir O, Valheim M, Press CM. Establishment of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in the intestine of ruminants. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2004; 56: 819-834.
147. Sikes D, Groth AH. Studies with the Johnin and tuberculin intradermal tests in cattle naturally infected with *Mycobacterium paratuberculosis* (Johne's disease). *Am J Vet Res* 1950; 11: 181-187.
148. Silva LC, Benavides A. El enfoque bayesiano: otra manera de inferir. *Gac Sanit* 2001; 15: 341-346.

149. Smith BI, Kauffold J, Sherman L. Serum haptoglobin concentrations in dairy cattle with lameness due to claw disorders. *Vet J* 2010; 186:162-165.
150. Snow GA. Mycobactins: Iron-Chelating Growth Factors from Mycobacteria. *Bacteriological Reviews* 1970; 34: 99-125.
151. Späth EJA, Entrocasso CM, Plorutti F, Manazza JA, Brusca G, Faverin C. Enfermedades de los bovinos diagnosticadas por veterinarios en el centro-sur de Buenos Aires, años 2001 a 2007. *Boletín técnico Estación Experimental Agropecuaria Balcarce INTA*. 2012; 161: 1-40 [Online] http://inta.gob.ar/documentos/enfermedades-de-los-bovinos-diagnosticadas-por-veterinarios-en-el-centro-sur-de-buenos-aires.-anos-2001-al-2007/at_multi_download/file/INTA_Boletin161PIP.pdf .
152. 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.
153. Stabel JR. An improved method for cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples and comparison to three other methods. *J Vet Diagn Invest* 1997; 9: 375-380.
154. Stabel JR. Transitions in immune responses to *Mycobacterium paratuberculosis*. *Veterinary microbiology* 2000; 77: 465–473.
155. Stabel JR, Bannantine JP. Development of a nested PCR method targeting a unique multicopy element, ISMap02, for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fecal samples. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 4744–4750.
156. Stabel JR, Kimura K, Robbe-Austerman S. Augmentation of secreted and intracellular gamma interferon following johnin purified protein derivative sensitization of cows naturally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J Vet Diagn Invest* 2007; 19: 43–51.

157. Stabel JR, Pearce L, Chandler R, Hammer P, Klinjn N, Cerf O, Collins M, Heggum C, Murphy P. Destruction by heat of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk and milk products. Bull Int Dairy Fed 2001; 362: 53-60.
158. Steadman EM, Martin BM, Thoen CO. Production of a *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* purified protein derivate (PPD) and evaluation of potency in guinea pigs. Biologicals 2002; 30: 93-95.
159. Stein RA. Super-spreaders in infectious diseases. Int J Infect Dis 2011; 15: 510-513.
160. 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: 31–37.
161. Sweeney R., Whitlock R, Rosenberger A. *Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supra mammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. J Clin Microbiol 1992; 30: 166-171.
162. Sweeney RW. Transmission of paratuberculosis. Vet Clin North Am Food Anim Pract 1996; 2: 305-312.
163. Takahashi E, Uzuka Y, Tanabe S, Satoh M, Furuoka H. Serum amyloid A and haptoglobin levels in bovine amyloidosis. J Vet Med Sci 2007; 69: 321-323.
164. Thorel M.F. Identification of *Mycobacterium paratuberculosis*. In: Paratuberculosis: Diagnostic Methods, Their Practical Application and Experience with Vaccination. Commission of the European Communities Agriculture Publication, Luxembourg, 1984; 61–64.
165. Thurston J, Larsen A, Lehmann R. Intradermic Tuberculin Tests of cattle naturally sensitive to Johnin: Reactions to simultaneous inoculations of two tuberculin concentrations. Am J Vet Res 1966; 27: 541-547.
166. Timpe A, Runyon EH. The relationship of atypical acid-fast bacteria to human disease; a preliminary report. J Lab Clin Med 1954; 44: 202-209.

167. Thirunavukkarasu S, de Silva K, Plain KM, J Whittington R. 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* 2014; 28: 1-13.
168. Tiwari A, VanLeeuwen JA, McKenna LB, Keefe GP, Barkema HW. Johne's disease in Canada. Part I. Clinical symptoms, pathophysiology, diagnosis, and prevalence in dairy herds. *J Vet Can* 2006; 47: 874-882.
169. Torres PM. Las pruebas tuberculínicas en el ganado bovino SENASA 2012; 1-16. [Online] <http://www.senasa.gov.ar/Archivos/File/File1014-101.pdf>
170. Torres, P. Pruebas tuberculínicas (inoculación, lectura e interpretación). Preguntas y respuestas. SAGPyA, SENASA, OPS/OMS 2000; 1-49. [Online] <http://www.senasa.gov.ar/Archivos/File/File1008-5.pdf>
171. Torres PM. Situación de la tuberculosis bovina en la república Argentina. 2013; 1-35. [Online] [http://www.senasa.gov.ar/Archivos/File/File7576-Situacion Tuberculosis bovina-Republica Argentina \(2013\).pdf](http://www.senasa.gov.ar/Archivos/File/File7576-Situacion_Tuberculosis_bovina-Republica_Argentina_(2013).pdf)
172. Travería GE. Análisis antigénico del *Mycobacterium paratuberculosis* y diagnóstico de la paratuberculosis bovina mediante enzimo inmuno ensayo (ELISA). Tesis doctoral Universidad Nacional de La Plata; 2003.
173. Travería GE, Zumarraga M, Etchechoury I, Romano MI, Cataldi A, Pinedo MF, Pavlik I, Pribylova R, Romero JR. First identification of *Mycobacterium avium paratuberculosis* sheep strain in Argentina. *Braz J Microbiol* 2013; 44: 897-899.
174. Valentin-Weigand P; Goethe R. Pathogenesis of *Mycobacterium* subspecies *paratuberculosis* infections in ruminants: still more questions than answers. Review. *Microbes and Infection* 1999; 1: 1121-1127.
175. van Hulzen KJE, Heuven HCM, Nielen M, Hoeboer J, Santema WJ, Koets AP. Different *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* MIRU-VNTR patterns coexist within cattle herds. *Vet Microbiol* 2011; 148: 419-424.

176. Vansnick E, De Rijk P, Vercammen F, Geysen D, rigouts L, Portaels F. Newly developed primers for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *Vet. Microbiol* 2004; 100: 197–204.
177. Vary PH, Andersen PR, Green E, Hermon-Taylor J, McFadden JJ. Use of highly specific DNA probes and the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in Johne's disease. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 933-937.
178. Viale MN. Identificación de componentes involucrados en la patogénesis de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Qulmes; 2014.
179. Wang C, Turnbull BW, Nielsen SS, Gröhn YT. Bayesian analysis of longitudinal Johne's disease diagnostic data without a gold standard test. *J Dairy Sci* 2011; 94: 2320-2328.
180. Wang, C., B. W. Turnbull, Y. T. Gröhn, and S. S. Nielsen. Estimating receiver operating characteristic curves with covariates when there is no perfect reference test for diagnosis of Johne's disease. *J. Dairy Sci* 2006; 89: 3038–3046.
181. Wentink GH, Bongers JH, Vos JH, Zeeuwen AAPA. Relationship between negative skin test with Johnin after vaccination and post mortem findings. *The Veterinary Record* 1993; 132: 38-39.
182. Whitlock RH, Buergelt C. Preclinical and Clinical Manifestations of Paratuberculosis (Including Pathology). *Vet Clin of North Am: Food Animal Practice* 1996; 12: 345-355.
183. Whitlock RH, Rosenberger AE, Sweeney RW, Hutchinson LJ. Culture techniques and media constituents for the isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples. Chiodini, R.J. and Kreeger, J.M., Ed. *Proceedings of the Third International Colloquium on Paratuberculosis* 1991; pp: 94-111.
184. Whitlock RH, Wells SJ, Sweeney RW, Van Tiem J. ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. *Vet Microbiol* 2000; 20: 387-398.

185. Whitlock RH, Sweeney RW, T Fyock AD. MAP Super-Shedders: Another Factor in the Control of Johne's Disease. Proceedings of the 8th International Colloquium on Paratuberculosis, 2005, Copenhagen, Denmark. p. 164.
186. Whittington RJ, Marshall DJ, Nicholls PJ, Marsh IB, Reddacliff LA. Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment Appl Environ Microbiol 2004; 5: 2989-3004.
187. 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. J Clin Microbiol 2013; 51:3993-4000.
188. Woo SR, Czuprynski CJ. Tactics of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* for intracellular survival in mononuclear phagocytes. Journal of Veterinary Science 2008; 9: 1-8.
189. Wood PR, Corner LA, Rothel JS, Baldock C, Jones SL, Cousins DB, McCormick BS, Francis BR, Creeper J, Tweddle NE. Field comparison of the interferon-gamma assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. Aust Vet J 1991; 68: 286-290.
190. Yokomizo Y, Hiramune T, Isayama Y. Antibodies Produced in a Cow Naturally Infected with Johne's Disease. Nat Inst Anim Hlth Quart 1970; 10: 137-142.
191. Yokomizo Y, Merkal RS, Lyle PAS. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine immunoglobulin G1 antibody to a protoplasmatic antigen of *Mycobacterium paratuberculosis*. Am J Vet Res 1983; 44: 2205-2207.
192. 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. Jpn J Vet Sci 1984; 47: 111-119.

193. Yokomizo Y. Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Using *Mycobacterium phlei* Absorbed Serum for the Diagnosis of Bovine paratuberculosis in a Field Study. JARQ 1986; 20: 60-67.
194. Yokomizo Y, Kishima M, Mori Y, Nishimori K. Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in Comparison with Complement Fixation Test for the Diagnosis of Subclinical Paratuberculosis in Cattle. J Vet Med Sci 1991; 53: 577-584.
195. Zurbrick B, Follett D, Czuprynski C. Cytokine regulation of the intracellular growth of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine monocytes. Infection and Immunity 1988; 56: 1692–1697.

ANEXO I

- Medio de cultivo de 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 ¹	10 (120 mL)
Verde de Malaquita (solución al 2%) ²	5,1 mL
Micobactina ³	2 mg
Antibióticos ⁴ :	
Anfotericina	50 mg
Ácido nalidíxico.....	100 mg
Vancomicina.....	100 mg

¹: Los huevos deben ser frescos, preferentemente de granja, para asegurarse que las gallinas no hayan consumido antibióticos. Lavar con agua tibia y detergente y enjuagar con agua corriente. Dejar secar y sumergirlos en alcohol etílico 70° durante 15 minutos. Los siguientes procedimientos se realizan en la cabina de un flujo laminar vertical, secar la superficie de los huevos suavemente con la llama de un mechero. Quebrar cada huevo por un extremo golpeando en un borde de un vaso de precipitado estéril, y sacar la clara con la ayuda de la gravedad y volcarla en el mismo vaso. Colectar la yema en otro vaso de precipitado. Repetir el proceso para cada huevo, con pipeta de vidrio con la punta rota aspirar algún resto de clara presente y finalmente mezclar las yemas con ayuda de una vara de vidrio estéril.

²: Preparar una solución de verde de Malaquita al 2% pesando 2 g de colorante (forma oxálica) en 100 mL de agua destilada, fraccionar en tubos con tapa y esterilizar en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

³: La micobactina se conserva en heladera fraccionada en la cantidad de 2 mg que es suficiente para preparar 1 litro de medio de Herrold, al momento de su uso disolver en 1 mL de alcohol etílico 96°.

⁴: Los antibióticos se encuentran fraccionados de acuerdo a la dosis y conservados a -20°C y se deben resuspender 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°.

Método de preparación:

Mezclar por agitación todos los ingredientes (excepto las yemas y el colorante) hasta que se disuelva el agar en un erlemneyer con capacidad de 2 litros. Medir el pH y, de ser necesario, ajustar a 7,5 con hidróxido de sodio 1N. Esterilizar en autoclave durante 25 minutos a 120°C. Enfriar a 56°C y agregar las 6 yemas en forma estéril, mezclar el medio suavemente en un agitador magnético. Agregar la solución de Verde de Malaquita con una pipeta estéril, agregar los antibióticos y mezclar otra vez. Distribuir asépticamente el medio en los tubos o frascos y dejar que solidifique en ellos en posición inclinada. Controlar la esterilidad incubando en estufa a 37°C durante 48 horas. Conservar en heladera.

- Solución decontaminante de cloruro de hexadecilpiridinio (CHP)

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

Método de preparación:

Mezclar por agitación y fraccionar en frascos un volumen de esta solución de 25 mL. Esterilizar en autoclave a 120°C durante 20 minutos. Conservar a temperatura ambiente.

- Mezcla de antibióticos

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

Método de preparación:

El caldo se prepara y se autoclava 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.

ANEXO II

Coloración de Ziehl-Neelsen

Reactivos:

- Fucsina fenicada de Ziehl

Solución A: Fucsina básica.....	1 g
Alcohol etílico de 96°.....	10 mL
Solución B: Fenol cristalizado	5 g
o fenol fundido.....	4,66 mL
Agua destilada.....	95 mL

Volcar gradualmente la solución A en la B agitando enérgicamente, dejar reposar algunos días. Filtrar antes de usar.

- Azul de Metileno alcalino de Loeffler (solución saturada)

Azul de metileno.....	0,3 g
Alcohol etílico de 96°.....	30 mL
Solución de OHK:	
OHK.....	0,01 g
Agua destilada.....	100 mL

Mezclar la solución saturada de azul de metileno en esta solución de OHK. Filtrar antes de su empleo.

-Alcohol ácido (solución decolorante)

CIH concentrado.....	3 mL
Alcohol etílico de 95°.....	97 mL

Técnica de coloración:

1. Cubrir el frotis con fucsina de Ziehl y se calienta con el fuego de un hisopo de algodón embebido en alcohol, evitar la evaporación agregando más colorante si fuera necesario, impedir así mismo, que el colorante hierva.
2. Lavar con agua corriente.

3. Decolorar con alcohol ácido evitando que queden cúmulos de colorante.
4. Lavar con agua corriente.
5. Hacer una coloración de contraste con azul de metileno durante 1 minuto.
6. Lavar con agua se seca y se observa en inmersión.

Interpretación:

Microorganismos ácido alcohol resistentes: Rojos - fucsia

Microorganismos no ácido alcohol resistentes: Color del contracolorante (azul)

ANEXO III

ELISA Indirecto de Paratuberculosis

Se describe la preparación de las diferentes soluciones de trabajo y se detalla las diferencias entre el ELISA indirecto clásico y el ELISA abreviado.

-Solución de antígeno

Bicarbonato de sodio (Na HCO₃)3 g
 Carbonato de sodio (Na₂ CO₃).....1,45 g
 Agua tridestilada1000 mL
 pH: 9,5 – 9,6

El antígeno sólido (recién comprado) se disuelve en agua destilada a razón de 500 µg por alícuota (una placa) en 100 µL de agua destilada. Identificar cada vial y congelar en freezer. Al momento de la preparación cada vial se diluye en 12 mL de solución de antígeno. Si se utiliza el antígeno con la bacteria entera formolada, se puede agregar entre 31 – 250 µg de bacilo por pocillo.

Para 100 µg s de bacilo/100 µL/pocillo calcular:

Si 1 pocillo (100 µL) ----- 100 µg de bacilo
 Para 1 placa que lleva ----- X = 12000 µg (12 mg)
 12 mL (12000 µL)

Para el ELISA clásico actualmente se utiliza una dilución de antígeno de 1/160: agregamos a 25 mililitros de solución de antígeno 156 µL de antígeno. Para el ELISA abreviado se utiliza una dilución de antígeno de 1/486: agregamos a 12 mililitros de solución de antígeno 25 µL de antígeno.

- ELISA-PBS y solución de lavado

Cloruro de sodio8,5 g
 Fosfato de sodio monobásico (anhidro)0,32 g

- Solución reveladora

Ácido cítrico.....	0,96 g
Citrato de sodio	1,20 – 1,62 g
ABTS.....	20 mg
Agua oxigenada 30%	25 µL
Agua destilada.....	100 mL
pH: 5	

Procedimientos generales:

1. Preparar el antígeno y agregar a cada pocillo 100 µL. Dejar incubar la placa en heladera toda la noche.
2. Lavar tres veces con solución de lavado ELISA-PBS.
3. Agregar 200 µL por pocillo de solución de bloqueo. Incubar 30 minutos en estufa de 37°C.
4. Lavar tres veces con solución de lavado PBS.
5. Agregar 100 µL por pocillo de las muestras diluidas y de los controles por duplicado según el esquema de siembra a utilizar.

ELISA clásico: Incubar 1 hora en estufa a 37 °C.

ELISA abreviado: Incubar 30 minutos a temperatura ambiente.

6. Lavar tres veces con solución de lavado PBS.
7. Agregar 100 µL por pocillo de conjugado 1/2500. Para el ELISA clásico incubar 1 hora en estufa a 37 °C. Para el ELISA abreviado, incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
8. Lavar tres veces con solución de lavado PBS.
9. Agregar 100 µL por pocillo de solución reveladora. Incubar 30 minutos aproximadamente al resguardo de la luz.
10. Realizar la lectura en el lector de ELISA, utilizar un filtro de 405 nm. Leer hasta por lo menos llegar a 1000 de DO de los controles positivos.

ANEXO IV

Preparación del agar para la prueba de inmunodifusión en gel de agar (AGID)

-Solución Buffer Borato

OHNa.....2g
Ácido Bórico.....9g
Agua destilada.....1000 mL
pH: 8.6 (8.4-8.6)

Esta solución buffer no modifica su pH, no se altera, ni permite el desarrollo de hongos ni bacterias en el transcurso del tiempo. Prácticamente su conservación es indefinida, solo se debe tener la precaución de conservarla en heladera bien tapada para evitar la concentración por evaporación. El ácido bórico es bacteriostático y su presencia en el buffer es crítica especialmente en el caso de sueros contaminados.

- Preparación del gel de agar al 1%

Disolver 1 gramo de agar (utilizar agar noble de alta pureza, Agar-Agar) en 100 mL del buffer borato anteriormente preparado. Llevar la suspensión a ebullición y esperar que se alcance la mayor transparencia. El agar de base debe ser purificado para que permita ver perfectamente las líneas de precipitación.

ANEXO V

Para la producción de una masa adecuada de la cepa D4ER de *Mycobacterium avium* para la elaboración de reactivos se probaron diferentes medios de cultivos, como el de Watson Reid y Dorset Henley. En nuestra experiencia tuvimos mejor desarrollo cuando se utilizó el caldo de carne glicerinado. Se modificó el protocolo de preparación sugerido por Bernardelli (2007).

Medio de caldo glicerinado

Extracto de carne.....	5 g
Cloruro de sodio (Na Cl)	5 g
Peptona Difco ó similar.....	1,5 g
Glicerina	70 mL
Agua destilada.....	1000 mL

Disolver las drogas en agua caliente. Fraccionar en botellas de vidrio y esterilizar en autoclave a 125°C – 130°C, durante 20 minutos, dejar enfriar. Luego se realizó la siembra de la cepa y su incubación en estufa a 37°C durante 2-3 meses.

La cosecha del cultivo obtenido se realizó en cabina de seguridad de tipo II, el cultivo se filtró y se fraccionó en frascos que se inactivaron por gamma irradiación. Posteriormente las micobacterias fueron procesadas con un disruptor celular a una presión de 40 ksi, el lisado celular se centrifugó a 10.000 G durante 20-30 minutos, y el sobrenadante se utiliza como antígeno.

ANEXO VI

Prueba de ROC con el paquete ROCRegression

Los modelos utilizados fueron semiparamétricos.

La siguiente fórmula se utiliza para graficar de manera tridimensional las curvas ROC:

```
fit.roc.sm <- ROCreg(method = "SM", model = c("~age", "~age"),
+ group = "status", tag.healthy = 0, marker = "PPD", data = PPD2,
+ control=controlROCreg(FPFint=NULL, nboot=100000,
+ resample.m="coutcome", ROC.model="binormal",
+ step.h=0.1, card.T=10, est.surv="empirical"))
> plot(fit.roc.sm)
```

Si se agrega lo siguiente:

```
plot (accuracy=c("AUC", "YI", "TH"))
```

Se podrá graficar áreas bajo la curva (AUC), la diferencia entre la tasa de verdaderos positivos la de falsos positivos o índice Youden (YI) y para estimar puntos de corte (TH).

Con la siguiente fórmula se puede agregar a los gráficos de AUC, líneas que representen el límite superior e inferior del intervalo de confianza 95%.

```
fit.auc.sm <- ROCregAUCci(method = "SM", model = c("~Inter1", "~Inter1"),
+ group = "status", tag.healthy = 0, marker = "PPD", data = PPD2)
> plot(fit.auc.sm$data$Inter1, fit.auc.sm$AUC, xlab="Inter1", ylab="AUC",
+ ylim=c(0,1), xlim=c(0,20), type="l", lwd=2)
> lines(fit.auc.sm$data$Inter1, fit.auc.sm$AUC.ll, col="red", lty=2)
> lines(fit.auc.sm$data$Inter, fit.auc.sm$AUC.ul, lty=2)
> abline(v=c(1,2,3,4,5,6), col="green")
> abline(h=0.5, col="black")
```

Las citas bibliográficas que se pueden consultar sobre este tipo de análisis estadístico son:

- Rodríguez-Álvarez MX, Tahoces PG, Cadarso-Suárez C, Lado MJ. Comparative study of ROC regression techniques. Applications for the computeraided diagnostic system in breast cancer detection. *Computational Statistics and Data Analysis*. 2011a; 55: 888–902.
- Rodríguez-Álvarez MX, Roca-Pardiñas J, Cadarso-Suárez C. A new flexible direct ROC regression model: Application to the detection of cardiovascular risk factors by anthropometric measures. *Computational Statistics and Data Analysis*. 2011b; 55: 3257–3270

ANEXO VII

Estadística Bayesiana

Los fundamentos de las pruebas estadísticas utilizadas se encuentran en el capítulo de materiales y métodos, en esta sección se aclararán algunas formulas y abreviaturas presentes en los modelos utilizados en el programa WinBUGS.

Modelo adaptado de Wang y colaboradores 2011:

En esta parte de la formula se calcula el likelihood ratio:

```

model {
  for (i in 1:n)
  {
    O[i] ~ dweib(v, lambda)
    gamma[i] ~ dnorm(0,taug)
    gammaz[i] ~ dnorm(0,taugz)
  }
  for (j in 1:m)
  {
    D[j]<-step(age[j]-O[id[j]])
  }
}

```

Posteriormente se calcula si ocurrió un cambio una vez pasado un tiempo:

```

timepc[j]<-max(age[j]-O[id[j]],0)
pr[j]<-D[j]*(p[2]-p[1])+p[1]
R[j]~dbern(pr[j])
zmean[j]<-D[j]*(mu0[2]-mu0[1])+mu0[1]+mu1*age[j]+gammaz[id[j]]

```

En esta parte se calcula el valor Ztau o la varianza:

```

Z[j]~dnorm(zmean[j],tauz)
tmean[j]<-beta0+beta1*Z[j]+beta2*age[j]+beta2c*timepc[j]+gamma[id[j]]
T[j]~dnorm(tmean[j],tau)
}

```

A continuación se calcula la distribución de la prior y del efecto de la/s covariable/s:

```

v ~ dgamma( 0.01, 0.01 )
lambda<-exp(v*loggam(1+1/v) - v*eta)#1
eta~ dnorm( 0.0, 0.0001)
for (i in 1:2){
  p[i]~dbeta(0.5,0.5)#1
  mu0[i]~dnorm( 0.0, 0.0001)
}
beta0~dnorm( 0.0, 0.0001)#1
beta1~dnorm( 0.0, 0.0001)
beta2~dnorm( 0.0, 0.0001)

```

```

beta2c~dnorm( 0.0, 0.0001)
mu1~dnorm( 0.0, 0.0001)
taug~dgamma(0.01,0.01)
s2g<- 1/taug
tau~dgamma(0.01,0.01)
s2<- 1/tau
tauz~dgamma(0.01,0.01)
s2z<- 1/tauz
b<- pow(lambda,-1/v)
taugz~dgamma(0.01,0.01)
s2gz<- 1/taugz
}

```

La cita bibliográfica que se puede consultar sobre este tipo de análisis estadístico es:

- Wang C, Turnbull BW, Nielsen SS, Gröhn YT. Bayesian analysis of longitudinal Johne's disease diagnostic data without a gold standard test. J Dairy Sci. 2011; 94: 2320-2328.

Para estudiar la influencia de algunas covariables se usó el modelo adaptado de Kostoulas y colaboradores 2013:

En esta parte de la formula se especifica la media y la varianza por cada grupo:

```

model {
  for( i in 1 :N ) {
    s[i] ~ dnorm(mu[i], ttau[i])
    mu[i] <- b0[T[i]]+b1[T[i]]*agec2[i]+b2[T[i]]*agec3[i]
    ttau[i]<-tau[1,T[i]]*agec1[i]+tau[2,T[i]]*agec2[i]+tau[3,T[i]]*agec3[i]
  }
}

```

A continuación el valor "T" se establece como NA para todas las observaciones y se supone que la respuesta promedio de la prueba se ve influenciada por la edad como una de las covariables ("b" simboliza el estado de infección y b1, b2, etc las covariables):

```

T[i] ~ dcat(P[agecat [i],])
}
b0[1] ~ dnorm(0.0, 1.0E-6)
b1[1] ~ dnorm(0.0, 1.0E-6) l(0,)
b2[1] <- b1[1]+theta[1] #b2[1] <- b1[1]+theta[1]
theta[1]~dnorm(0.0, 1.0E-6) l(0,)
for (j in 2:3){
  b0[j] ~ dnorm(0.0, 1.0E-6) l(b0[j]-1,)
  b1[j] ~ dnorm(0.0, 1.0E-6) l(b1[j]-1,)
  b2[j] <- b1[j]+theta[j] #b2[j] <- b1[j]+theta[j]
  theta[j]~dnorm(0.0, 1.0E-6) l(theta[j]-1,)
}

```

```

for (j in 1:3)
{
P[j,1:3] ~ ddirch(alpha[])
age[1,j]<-b0[j]
age[2,j]<-b0[j]+b1[j]
age[3,j]<-b0[j]-b2[j] #age[3,j]<-b0[j]+b2[j]
}
for (i in 1:3)
{
for (j in 1:3)
{
tau[i,j] ~ dgamma(1,1)
sigma[i,j]<-1/sqrt(tau[i,j])
s.rep[i,j]~dnorm(age[i,j],tau[i,j])
}
}

```

En esta parte se calculan las distintas areas bajo la curva:

```

AUC[1,i]<-step(s.rep[i,2]-s.rep[i,1])
AUC[2,i]<-step(s.rep[i,3]-s.rep[i,1])
AUC2[1,i]<-phi((age[i,2]-age[i,1])/sqrt(pow(sigma[i,2],2)+pow(sigma[i,1],2)))
AUC2[2,i]<-phi((age[i,3]-age[i,1])/sqrt(pow(sigma[i,3],2)+pow(sigma[i,1],2)))

```

Finalmente se calcula la sensibilidad y especificidad:

```

Se1[1,i] <-step(s.rep[i,2]-cutoff)
Se1[2,i] <-step(s.rep[i,3]-cutoff)
Sp1[1,i] <-step(cutoff-s.rep[i,1])
Se2[1,i]<-1-phi((cutoff-age[i,2])/sigma[i,2])
Se2[2,i]<-1-phi((cutoff-age[i,3])/sigma[i,3])
Sp2[2,i]<-phi((cutoff-age[i,1])/sigma[i,1])
}

```

La cita bibliográfica que se puede consultar sobre este tipo de análisis estadístico es:

- Kostoulas P, Browne WJ, Nielsen SS, Leontides L. Bayesian mixture models for partially verified data: age- and stage-specific discriminatory power of an antibody ELISA for paratuberculosis. *Prev Vet Med.* 2013; 111:200-5. doi: 10.1016/j.prevetmed.2013.05.006.