

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

AISLAMIENTO DE *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*
DESDE DEPOSICIONES DE BOVINOS DE LECHERÍA Y
DETECCIÓN DE ANTICUERPOS SÉRICOS MEDIANTE ELISA

JORGE PABLO THIERMANN WARNER

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

PROFESOR GUIA: PEDRO ABALOS PINEDA

SANTIAGO, CHILE
2003

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

AISLAMIENTO DE *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*
DESDE DEPOSICIONES DE BOVINOS DE LECHERÍA Y
DETECCIÓN DE ANTICUERPOS SÉRICOS MEDIANTE ELISA

JORGE PABLO THIERMANN WARNER

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUIA	: PEDRO ABALOS PINEDA
PROFESOR CONSEJERO	: MARÍA LUISA SÁNCHEZ
PROFESOR CONSEJERO	: ULISES VERGARA

SANTIAGO, CHILE
2003

ÍNDICE

	Páginas
1. RESUMEN	4
2. SUMMARY	6
3. INTRODUCCIÓN	8
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	10
5. HIPÓTESIS	28
6. MATERIAL Y MÉTODO	29
7. RESULTADOS	35
8. DISCUSIÓN	38
9. CONCLUSIONES	41
10. BIBLIOGRAFÍA	42
11. ANEXOS	47

1. RESUMEN

La Paratuberculosis o Enfermedad de Johne es una enteritis granulomatosa crónica de los rumiantes, causada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, comunmente conocido como *Mycobacterium paratuberculosis*. Esta enfermedad se caracteriza por poseer un período de incubación de más de dos años, infectándose el animal en los primeros meses de vida, principalmente en el período neonatal. La gran mayoría de los animales infectados la cursan en forma subclínica, lo que dificulta inmensamente su diagnóstico, debido a la baja sensibilidad de los métodos existentes. El objetivo de este trabajo fue comparar y relacionar dos métodos diagnósticos, uno bacteriológico y otro serológico, en animales de predios infectados de la Región Metropolitana, con el fin de aportar con información para la implementación de un adecuado método de control de esta enfermedad en el país.

Es así como se recolectó muestras de sangre y de deposiciones de 136 animales sintomáticos y asintomáticos procedentes de 2 rebaños lecheros infectados. Las muestras de suero fueron sometidas a una prueba de ELISA comercial y las muestras de deposiciones fueron cultivadas en medio de cultivo Herrold modificado con yema de huevo con y sin Micobactina J. Las muestras de deposiciones fueron procesadas previamente utilizando como decontaminante fecal el cloruro de hexadecilpiridinium y luego se realizó una incubación con los antibióticos, vancomicina, amphotericina B y ácido nalidíxico según el protocolo descrito por Whitlock y Rosenberger (1990).

El 10,29% de las muestras de deposiciones resultaron positivas al cultivo, siendo confirmadas como tal, por su lento crecimiento sólo en el medio con Micobactina J (a partir de la octava semana) y mediante la técnica de tinción de Ziehl Neelsen. El diagnóstico serológico mediante la prueba de ELISA detectó un 83,8% de animales positivos. En este estudio hubo un alto porcentaje de muestras de cultivo contaminadas con hongos (44,85%), lo que resultó en una falta de asociación entre la prueba del cultivo fecal y la prueba de ELISA. El análisis estadístico mostró que no existe asociación entre las técnicas empleadas ($P < 0,0001$; $kappa = 0,029$).

La alta tasa de contaminación de los cultivos se debió principalmente a que en algunas muestras se utilizó tubos, que en vez de tapa rosca, poseían un tapón de algodón cardé y que estaban además sellados con cinta "Parafilm"®. El 90% de las muestras contaminadas correspondió a este tipo de tubos. Además un grado alto de contaminación siempre es esperable, debido a que se trabaja con material fecal. Para mejorar la técnica, se sugiere probar el método propuesto por Stabel (1997), quien propone el uso de antibióticos (vancomicina y ácido nalidíxico) en el medio de cultivo.

2. SUMMARY

Paratuberculosis or Johne's disease is a chronic granulomatous enteritis, which affects mainly ruminants and is caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, commonly known as *Mycobacterium paratuberculosis*. It is characterized by a long period of incubation of over two years, being the animals infected during their first months of life and specially when they are newborn. Most of the infected animals are subclinical, which strongly difficults the diagnosis, due to the low sensitivity levels of the existing diagnostic techniques. The objective of this study was to compare and relate a bacteriological diagnostic technique and a serological one, applied to animals from infected herds from the central region of Chile (Region Metropolitana), in order to contribute with scientific information for the creation of an adequate control program for paratuberculosis in Chile.

Blood and fecal samples were collected from 136 symptomatic and non-symptomatic animals from two infected dairy herds. Fecal samples were cultured in Herrold's modified medium with egg yolk and with and without mycobactin J. Fecal samples were previously treated after Whitlock and Rosenberger's protocol for decontamination, using hexadecylpyridinium chloride and also an incubation in half strengthed brain heart broth with an antibiotic solution (vancomycin, amphotericin B and nalidixic acid). Blood samples were tested with a commercial ELISA kit.

10,29% of the cultured samples were positive, being classified as such due to their slow growth only in the tubes containing mycobactin J (after the eighth week) and confirmed through the Ziehl Neelsen technique. The ELISA test detected 83,8% of positive samples. A big problem in this study was the high percentage of contaminated culture samples (44,85%), which was the reason for the lack of association of the ELISA test with the fecal culture. The statistical analysis showed and confirmed our suspicion that there is no association possible in this study ($P < 0,0001$; $kappa = 0,029$).

The high rate of contamination was due to the usage, in some cases, of tubes without screw on caps. These tubes were sealed only with a hydrophobic cotton and

parafilm® tape. 90% of the contaminated samples corresponded to this kind of tube. A high rate of contamination is always expected when working with fecal samples. As a solution, we suggest to try the technique proposed by Stabel (1997), who includes antibiotics (vancomycin and nalidixic acid) in the culture medium.

3. INTRODUCCIÓN

La Paratuberculosis o Enfermedad de Johne es una entidad infecto contagiosa crónica, causada por *Mycobacterium paratuberculosis*, que cursa con una enteritis granulomatosa. Su diseminación es lenta, tanto entre animales como en el mismo animal, posee un período de incubación de más de dos años y afecta principalmente a rumiantes. Su cultivo bacteriológico es lento, demorándose entre 4 y 6 meses para su confirmación y es exigente necesitando medios especiales y selectivos, además de la adición de Micobactina J.

La enfermedad tiene distribución mundial y su presencia se ve favorecida en climas templados y con factores de riesgo, como alta densidad animal y manejo inadecuado. En Chile se describe por primera vez en 1958 por Grinbergs y Caorsi, en un trabajo publicado por la Universidad Austral de Chile. Desde entonces se sospecha que la enfermedad afecta endémicamente, pero no se han realizado estudios respecto su distribución. La determinación de su prevalencia es difícil debido a la gran cantidad de casos subclínicos. En el último tiempo los Médicos Veterinarios dedicados a la producción de leche han visto incrementado los casos clínicos y han creado la preocupación en ellos y en los productores. Recientemente en 2001, en el Laboratorio de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile se ha incrementado la demanda del diagnóstico serológico por ELISA y se ha aislado el agente desde intestino de caprinos sospechosos de cursar un cuadro clínico y de deposiciones de bovinos seropositivos*.

La transmisión se produce en el período neonatal por ingestión de heces contaminadas, especialmente en terneros menores de un mes que se amamantan de pezones sucios con deposiciones o que pastan en praderas contaminadas. Los terneros mayores de seis meses se hacen más refractarios a la infección experimental. Se ha informado de infecciones congénitas y de la excreción de la bacteria en la leche, calostro, secreciones uterinas y semen.

* Comunicación personal Dr. Pedro Abalos

En otras especies rumiantes existen algunas diferencias. Los caprinos por ejemplo, pueden infectarse experimentalmente cuando adultos por lo que se sospecha que este fenómeno ocurriría también en estado natural. Se ha descrito la transmisión entre especies de rumiantes (bovinos, ovinos, caprinos, cérvidos y camélidos sudamericanos). Existen otras mycobacterias dependientes de micobactina, similares a *M. paratuberculosis*, las cuales se han aislado en el ser humano, postulándose su potencial rol zoonótico.

La importancia económica de esta enfermedad radica en las pérdidas de animales, disminución de la producción de carne y de leche, gastos por tratamientos y restricciones comerciales y arancelarias.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1 Agente

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* es una pequeña bacteria intracelular, gram positiva, ácido-alcohol resistente y anaerobia facultativa. En 1895 Johnne y Frothingham identificaron bacilos ácido-alcohol resistentes asociados a cuadros clínicos de enteritis crónica en bovinos, describiendo así por primera vez este agente. En 1990 se le clasificó como *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*, aunque sigue denominándosele comúnmente como *M. paratuberculosis*. Posee homología antigénica y genética con otros dos miembros de la especie, *M. avium* subespecie *avium* y *M. avium* subespecie *silvaticum* (Thorel *et al.*, 1990). Con *Mycobacterium avium* subsp. *avium* presenta más del 99% de homología del ADN y las secuencias del ARNr 16s son idénticas entre estos dos organismos. El único elemento genético que los diferencia es la secuencia de inserción IS900, que existe sólo en *M. paratuberculosis*. Es justamente este elemento genómico el que se utiliza para el diagnóstico mediante la técnica de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR). La gran similitud antigénica con *M. avium*, conlleva muchas veces a diagnósticos equivocados, sobre todo cuando se utilizan pruebas inmunológicas que buscan anticuerpos o que detectan citoquinas (Manning y Collins, 2001). Una característica especial de este agente infeccioso es su alta dependencia del hospedero y su calidad de parásito intracelular obligado, debido a que requiere de una fuente de hierro para su crecimiento y multiplicación. Además para su cultivo *in vitro* es necesaria la adición de Micobactina J (Kennedy *et al.*, 2001).

Las experiencias de campo y de laboratorio indican que existen diferencias entre los organismos causantes de Paratuberculosis en las distintas especies de hospederos. Comúnmente la enfermedad ocurre en una especie pero no ha sido observada en todas las especies susceptibles que pastan juntas. Esta diferencia estaría asociada a la diversidad genética del agente infeccioso y establecida mediante el uso de enzimas de

restricción, las que han permitido detectar polimorfismo en el largo de los fragmentos o segmentos de restricción (RFLP, por su sigla en inglés) (Kennedy *et al.*, 2001).

Mediante esta metodología se han establecido 3 tipos principales del agente infeccioso, el bovino (C), el ovino (S) y el intermedio (I), los cuales a su vez han sido divididos en subtipos (Pavlik *et al.*, 1999). La preferencia de hospederos por parte de los distintos tipos de *M. paratuberculosis* es importante en el manejo de la enfermedad en rebaños mixtos. La Paratuberculosis en bovinos, caprinos y camélidos se da preferentemente por el tipo C, mientras que los ovinos suelen infectarse por el tipo S. Aunque algunos tipos tienen una fuerte preferencia por un determinado hospedero, esto no es absoluto y estos tipos pueden infectar diferentes especies (Kennedy *et al.*, 2001).

4.2 Hospedero

El *M. paratuberculosis* infecta a un amplio espectro de hospederos, siendo más frecuente en rumiantes como bovinos, ovinos, caprinos, cérvidos y camélidos sudamericanos, tanto domésticos como silvestres. Además ha sido aislada de una gran variedad de hospederos como aves ("woodpigeons"), cerdos, rinocerontes, conejos y primates. En humanos, se sospecha que el agente infeccioso tendría un rol en el desarrollo de la Enfermedad de Crohn, patología intratable que cursa con enteritis crónica (Kennedy *et al.*, 2001).

Un estudio realizado en Escocia ha revelado la presencia de este agente infeccioso en al menos 10 especies no rumiantes (comadreja, tejón, cuervo, especies de roedores, zorro y liebre, entre otras). Se ha postulado la existencia de ciclos silvestres, lo que podría socavar los esfuerzos de programas de control y erradicación, al no contemplar este factor, que facilitaría la diseminación de la enfermedad entre distintos planteles (Beard *et al.*, 2001).

No se describe predilección hacia ganado de leche o de carne. Es así como en ciertos países existe mayor prevalencia en el ganado lechero como consecuencia de

manejos intensivos, y en otros es más frecuente en ganado de carne debido a los movimientos que se realizan entre rebaños (Kennedy *et al.*, 2001).

4.3 Enfermedad

La Paratuberculosis es una enfermedad principalmente subclínica. Tiene un período de incubación extenso y los signos clínicos son sólo una manifestación terminal de la infección, que se da sólo en una pequeña minoría de los animales infectados. Los principales factores que contribuyen al inicio de la etapa clínica son probablemente la edad del animal al momento de la infección y la dosis de infección. Un rango de otros factores de riesgo se han propuesto como factores aceleradores o precipitantes del inicio de la etapa clínica. Estos incluyen la explotación intensiva, suelos ácidos, mala nutrición, stress por transporte, lactancia, parto, deficiencia de elementos esenciales e inmunosupresión por agentes como el virus de la Diarrea Viral Bovina (Kennedy *et al.*, 2001).

En bovinos los signos clínicos rara vez aparecen antes de los 2 años de edad y en la mayoría de los casos se desarrolla entre los 2 y los 6 años de edad. En todo caso, el rango está sesgado por las prácticas de eliminación de animales y las edades en las que se han encontrado signos clínicos varía entre los 0,5 y los 15 años (Chiodini *et al.*, 1984). La probabilidad de que la infección por *M. paratuberculosis* se establezca y persista en un individuo dependerá de su estado innato de susceptibilidad o resistencia, de su estado inmune, de la carga bacteriana, de la cantidad de veces que ha estado expuesto, de la duración de cada exposición y de la infectividad y patogenicidad de una cepa de mycobacteria para cada especie de hospedero (Chiodini, 1996; Sweeney, 1996).

La principal ruta de contagio es la vía oral, sobre todo durante los primeros meses de vida, aunque Stehman (1996) ha descrito además la infección fetal en caprinos y ovinos. La enfermedad clínica es afebril y se caracteriza por una diarrea crónica intratable, que en algunos casos puede ser intermitente, originando una baja de

peso progresiva que lleva a un estado de emaciación. Se presenta además edema submandibular y pelaje hirsuto, todo esto, a pesar de que el animal presenta buen apetito. Los animales que entran en la etapa clínica generalmente mueren. La diarrea no es tan evidente en los pequeños rumiantes (Clarke, 1997).

La duración de la fase clínica varía desde semanas hasta meses. Una mejoría temporal puede ocurrir al retirar a los bovinos afectados de la pradera, para alimentarlos en base a alimento seco. La diarrea puede ser continua o intermitente con marcada tendencia a la mejoría en la preñez tardía y reaparición en forma severa luego del parto (Chiodini *et al.*, 1984).

Algunos autores han clasificado a los individuos de los rebaños infectados en cuatro grupos (Larsen, 1973; Clarke, 1997):

- Clínicamente enfermos son aquellos animales que presentan signos clínicos, son fuertes diseminadores del agente infeccioso y presentan altas tasas de anticuerpos, y una baja respuesta inmune celular.
- Diseminadores asintomáticos (subclínicos) son los animales que no presentan signos clínicos en la fase subclínica tardía, excepto por una disminución en la producción láctea. Son diseminadores moderados y poseen una respuesta inmune celular y humoral moderada. En la fase subclínica temprana no hay signos clínicos, existe diseminación leve e intermitente, y presentan una alta respuesta inmune celular, pero bajas tasas de anticuerpos.
- Los animales portadores se encuentran en una fase latente, que no puede ser diagnosticada mediante métodos inmunológicos, ni por cultivo fecal. La biopsia de nódulos linfáticos mesentéricos permiten realizar el diagnóstico (Benedictus y Haagsma, 1986). No existe diseminación y no hay respuesta inmune detectable.
- Existe además la categoría de animal resistente no infectado. Estos animales han desarrollado una respuesta inmune protectora, que conduce a una eliminación completa de la bacteria (Chiodini *et al.*, 1984). Desafortunadamente, hasta el

momento, no se ha desarrollado un criterio diagnóstico que permita separar a este grupo de los portadores asintomáticos.

El gran problema de esta enfermedad es que la mayoría de los animales infectados no presentan el cuadro clínico, lo que dificulta su estudio epidemiológico y su control. Se ha estimado que por cada caso clínico, existen 25 casos subclínicos, de los cuales sólo 9 son detectables mediante las pruebas diagnósticas utilizadas (Whitlock *et al.*, 1991).

De todas maneras existen algunos estudios que estiman prevalencias reales a nivel animal del 3-7% y a nivel de rebaño del 31-71%. Sin embargo, en el 87,5% de los rebaños positivos, esa positividad estaría dada sólo por 1 animal infectado (Kennedy *et al.*, 2001).

Los signos clínicos reflejan el daño que ocurre en el intestino. Su alteración afecta la funcionalidad digestiva y de absorción, causando el síndrome de malabsorción intestinal. Los electrolitos y otros nutrientes osmóticamente activos permanecen a mayores concentraciones en el lumen, causando la retención del agua. A través de la pared intestinal dañada, se pierde también albúmina sérica. Debido al acúmulo de nutrientes que llegan al colon, se produce su fermentación y liberación de productos anormales que llevan a un olor particular en las deposiciones (Hoffsis *et al.*, 1990). En respuesta a la invasión masiva de la pared intestinal por *M. paratuberculosis* ocurren reacciones inmunes en la mucosa intestinal que la engrosan y la corrugan, afectando su estructura y funcionalidad, lo que contribuye a la diarrea crónica (Kennedy *et al.*, 2001).

Las lesiones patológicas clásicas que se pueden encontrar en bovinos incluyen la mucosa del íleon corrugada y engrosada con nódulos mesentéricos engrosados y edematosos y vasos linfáticos distendidos. Entre los hallazgos histopatológicos clásicos se incluye un infiltrado granulomatoso extenso de los vellos intestinales, abundantes células multinucleadas gigantes (células de Langhans) e innumerables bacilos ácido-alcohol resistentes intracelulares (Burgelt *et al.*, 1978).

En relación con de la enfermedad, en ganado bovino, se ha observado un aumento significativo en la incidencia de mastitis, infertilidad y un mayor lapso interparto (Johnson-Ifearulundun *et al.*, 1996). Las vacas infectadas presentarían un balance nutricional negativo más profundo en el postparto, producto de la disminuida capacidad de absorción de nutrientes, por el daño intestinal que esta enfermedad genera. Además los animales infectados tendrían una menor expectativa de vida (Johnson-Ifearulundu y Kaneene, 1997).

El tratamiento de la enfermedad con antibióticos no es económicamente viable ni recomendable, debido a que *M. avium* subsp. *paratuberculosis* presenta una alta resistencia. Además, la terapia debe extenderse por un largo período, pero inevitablemente la enfermedad recurre una vez terminada la terapia (Kennedy *et al.*, 2001).

4.5 Supervivencia del agente en el ambiente

Uno de los mayores desafíos en el control de la enfermedad es la gran capacidad de supervivencia del agente en el medio ambiente. Es así como se describe una viabilidad de varios meses en áreas contaminadas e incluso de 17 meses en el agua (Larsen *et al.*, 1956).

El organismo ha sido aislado de numerosas fuentes tanto en ambientes externos (praderas) como internos (salas de ordeño) (Whitlock *et al.*, 1991), así como también de moscas tanto en mataderos como de praderas (Kennedy *et al.*, 2001).

Los suelos ácidos favorecen la presencia del agente debido a que la acidez afecta la solubilidad del hierro encontrándose este más disponible. Es por esto que como práctica de control se recomienda la aplicación de cal sobre las praderas, ya que se ha visto que donde se realiza, la tasa de incidencia es menor (Johnson-Ifearulundu y Kaneene, 1999).

M. paratuberculosis es resistente a las concentraciones de cloro que se aplican en la potabilización del agua, pero es susceptible al hidróxido de sodio al 1-5% (Collins *et al.*, 2001) y también a altas temperaturas que reducen drásticamente su viabilidad (Kennedy *et al.*, 2001). Estudios recientes cuestionan que esta bacteria sea eficientemente eliminada en el proceso de pasteurización de la leche, lo cual es importante si consideramos su posible participación en la Enfermedad de Crohn (Stabel *et al.*, 2001).

4.6 Transmisión y excreción

La principal vía de excreción y de diseminación es a través de las heces, pero también se describe la presencia de esta mycobacteria en la leche, calostro, fluidos uterinos y en menor concentración en el semen. *M. paratuberculosis* habita principalmente el intestino delgado de su hospedero y a medida que la infección progresa, la concentración del agente en las heces aumenta drásticamente, incrementándose la efectividad de transmisión de la enfermedad. El número de organismos excretados por gramo de deposición de vacas afectadas y de ovejas con infección subclínica multibacilar es aproximadamente de 10^8 organismos por gramo de deposición (Chiodini *et al.*, 1984; Whittington *et al.*, 2000). A medida que la infección progresa, el bacilo se disemina por el resto del cuerpo y la enfermedad puede ser detectada en distintos órganos como hígado, bazo y nódulos linfáticos de los pulmones, de la cabeza y de la glándula mamaria. Además, la concentración del agente aumenta también en la leche, calostro y semen (Whitlock y Buergelt, 1996; Pavlick *et al.*, 2000).

Stehman (1996) describe la transmisión transplacentaria y afirma que aproximadamente el 10% de las vacas con infección subclínica producen fetos infectados. Por otra parte, la mitad de las vacas con infección clínica producirían fetos infectados (Sweeney, 1996).

Los pezones sucios con deposiciones, la propia leche y/o calostro contaminado, calostro almacenado de otras hembras infectadas o la posibilidad de amamantamiento

cruzado con otras vacas infectadas constituyen las principales fuentes del agente para los terneros. Estos estarán recibiendo dosis de *M. paratuberculosis* durante todo el período de lactancia, para luego continuar ingiriéndolo al pastar sobre praderas contaminadas (Kennedy *et al.*, 2001).

4.7 Diseminación

Dentro de los posibles mecanismos de diseminación de la enfermedad, Kennedy *et al.*, (2001) describen:

- Movimiento de animales: Este sería el mecanismo más importante. Las razones incluyen el compartir toros con otros predios, compra de vaquillas de reemplazo, el traslado de animales a exhibiciones y/o ferias y el dejar que pasten más allá de los límites del predio. Los animales de mayor riesgo son las vaquillas infectadas, ya que son introducidas en gran número a los rebaños, permanecen por períodos prolongados y tienen contacto íntimo con sus crías y con otros neonatos.
- Prácticas de abono y fuentes de agua contaminadas: Este factor es el segundo más importante, debido posiblemente a altas cargas en las deposiciones y sumando el hecho de que la bacteria sobrevive por mucho tiempo en el agua, hacen que la transmisión mecánica a través de drenajes de zonas fertilizadas o por comunicación de vías de aguas servidas entre predios sea muy efectiva.
- Praderas: Las praderas se contaminan fácilmente al ser fertilizadas con efluentes o deposiciones, como así también por los mismos individuos infectados que se encuentran pastando. El "soiling" también se describe como fuente de infección.
- Semen y Embriones: El riesgo por esta vía es muy bajo, aunque sí se debe tener cuidado con las hembras receptoras, ya que a través de la placenta, el endometrio o los fluidos uterinos pueden infectar al concepto.

- Equipos: Equipos como tractores y otros vehículos de transporte potencialmente pueden diseminar al *M. paratuberculosis*, si es que acarrean trozos grandes de deposiciones. El riesgo presentado por esta vía es menor, pero puede ser alto en predios infectados que los utilicen en la zona de crianza de terneros.
- Otros productos animales: Leche cruda y calostro de rebaños infectados pueden contener *M. paratuberculosis*, proveniente de la glándula mamaria misma o de contaminación fecal, y podrían ser vehículos de diseminación intra- e inter-rebaños, e incluso para otras especies, si se usan para alimentar y criar animales jóvenes. Por ende se recomienda no realizar esta práctica.

4.8 Diagnóstico

La respuesta inmunológica que primero se desarrolla ante una infección por *M. paratuberculosis* es de tipo celular. Específicamente ocurre una respuesta por parte de linfocitos TH1, llamada "tuberculoide", que se caracteriza por una infiltración tisular linfocítica y producción de interferón gamma, interleukina 2 y el factor de necrosis tumoral alfa, que en conjunto serían las encargadas de mediar esta inmunidad celular necesaria para contener la infección. La fase TH1 es la que predomina en la etapa subclínica, la cual puede durar meses a años, estando el bacilo contenido en macrófagos y granulomas. Los signos clínicos típicos de la Paratuberculosis aparecen al comenzar la etapa TH2 o "lepromatosa". No se conoce como se gatilla el inicio de esta etapa. Los linfocitos TH2 estimulan la producción de citoquinas (interleukinas 4, 5, 6 y 10), coordinando una respuesta humoral, la cual no es protectora ni detiene el progreso de la enfermedad. En esta etapa, la bacteria comienza a diseminarse por el cuerpo del animal (Manning y Collins, 2001).

En términos diagnósticos, la fase de producción de interferón gamma, de interleukina 2 y de factor de necrosis tumoral alfa es tempranamente detectable, siendo la fase humoral la útil para el diagnóstico tardío, una vez que el animal ya está diseminando al agente (Kennedy *et al.*, 2001).

Debido a que la mayoría de los individuos infectados son subclínicos, la detección de animales positivos a Paratuberculosis depende principalmente de las pruebas diagnósticas disponibles. Las pruebas utilizadas detectan al agente o respuestas inmunológicas ante la infección (como anticuerpos, citoquinas o lesiones). El gran inconveniente de las pruebas disponibles es su baja sensibilidad, la cual puede ser de 0% en estados tempranos de infección hasta sobre 80% en casos avanzados. En promedio, las pruebas disponibles poseen una sensibilidad del 20 al 45%. Por lo tanto que un animal salga negativo a la prueba no significa que esté libre de infección. En términos de especificidad, en teoría ni el cultivo fecal, el PCR o la histopatología debieran generar falsos positivos. Para la prueba de ELISA de absorción y el test de Inmunodifusión en gel de agarosa (AGID) se describen especificidades de sobre el 99,5%, por lo cual se recomiendan para realizar un tamizaje y así disminuir al máximo los falsos positivos (Kennedy *et al.*, 2001).

4.8.1 Detección del agente

En el animal vivo infectado y con cuadro clínico, la muestra más útil son las deposiciones, debido a la alta concentración de la bacteria en ellas.

Los métodos usados son (Kennedy *et al.*, 2001):

- Tinción directa de un frotis de deposiciones: Se realiza una tinción para encontrar bacilos ácido-alcohol resistentes (tinción Ziehl-Neelsen). Esta prueba tiene una baja sensibilidad y especificidad. Además se pueden confundir con bacterias saprófitas apatógenas. La ventaja es que es fácil de realizar, rápida y de bajo costo.
- Tinción directa de una impresión de tejido: Las muestras utilizadas pueden ser de íleon y nódulos linfáticos mesentéricos (pueden obtenerse "postmortem" en la necropsia o como biopsia por laparotomía en un animal vivo). Se realiza la misma tinción para bacilos ácido alcohol resistentes. Esta técnica tiene las mismas desventajas y ventajas que la anterior, pero posee mayor sensibilidad.

- Cultivo desde deposiciones o tejido: Esta prueba es definitiva para Paratuberculosis por ser muy selectiva. La especificidad debiera ser del 100% y no debería de haber falsos positivos.

El microorganismo ha sido exitosamente aislado de una amplia variedad de especies animales, sin embargo la sensibilidad de los ensayos varía. Así, algunas cepas de *M. paratuberculosis* son más difíciles de aislar que otras (por ejemplo las de ovinos o del bisonte), requiriendo tiempos de cultivo más prolongados o medios de cultivo enriquecidos. Se pueden encontrar otras especies de mycobacterias en muestras de deposición, y es por eso que todos los aislamientos deben confirmarse como *M. paratuberculosis* a través de métodos micobactina dependientes (crecimiento únicamente en medio suplementado con Micobactina J, un quelante de hierro, requerido para el crecimiento *in vitro* por *M. paratuberculosis*) y/o a través de la detección del segmento IS900 con una prueba genética validada como el PCR (Kennedy *et al.*, 2001).

El aislamiento no puede obtenerse rápidamente, debido al lento crecimiento de este organismo. Tanto el método de cultivo convencional (12-16 semanas) como el radiométrico (5-8 semanas) son efectivos para el aislamiento del organismo, cuando son realizados por laboratorios con experiencia (Collins *et al.*, 1990; Sockett *et al.*, 1992; Whittington *et al.*, 1998; Whittington *et al.*, 1999). La diferencia del tiempo que transcurre entre cada método, se debe al proceso de identificación. En el método convencional, los tubos son inspeccionados hasta que se detecte alguna colonia. En el cultivo radiométrico, un equipo electrónico monitorea las botellas para encontrar productos del metabolismo de las bacterias que contengan C14. El método radiométrico toma menos tiempo, debido a que los productos del metabolismo son detectables antes de que se empiecen a formar colonias de tamaño lo suficientemente grandes para ser detectadas a simple vista. Existen varios otros métodos automatizados para la detección de mycobacterias que se utilizan en medicina humana y que están siendo evaluados para su uso veterinario. La gran ventaja de estos métodos sobre el radiométrico es que no utilizan radioisótopos (Kennedy *et al.*, 2001).

El método del cultivo es útil tanto para muestras de tejido como para muestras de deposición. A la necropsia se deberían tomar muestras para cultivo así como también para realizar un examen histopatológico, a modo de maximizar la posibilidad de confirmar el diagnóstico de la infección causada por *M. paratuberculosis*. A pesar de que la distribución del organismo en el cuerpo del hospedero varía entre los individuos y entre las especies, el íleon, el yeyuno, el ciego, los nódulos linfáticos ileocecales y mesentéricos, garantizan una buena muestra para el cultivo desde tejido (Kennedy *et al.*, 2001).

4.8.1.1 Identificación del aislamiento

Los métodos usados son (Kennedy *et al.*, 2001):

- Identificación fenotípica: *M. paratuberculosis* requiere de Micobactina J, un sideróforo necesario para obtener hierro del medio, en el aislamiento *in vitro*. La muestra se incuba en un tubo con medio con micobactina y en uno sin micobactina. Si se encuentran bacterias ácido-alcohol resistentes, de crecimiento lento, sólo en el medio con Micobactina J, o si hay una marcada diferencia en el grado de crecimiento entre ambos tubos, el organismo en cuestión es clasificado como *M. paratuberculosis*.
- Identificación genotípica (Pruebas sobre la base de PCR para secuencias de inserción): La secuencia de inserción IS900, es considerada única *de M. paratuberculosis*. Cuando se utiliza para confirmar la identidad de una bacteria ácido-alcohol resistente, aislada desde un cultivo, la sensibilidad de la prueba es de 100% y la especificidad bordea el 100%. Sin embargo existen reportes de falsos positivos debido a "primers" no específicos, lo que amerita seguir analizando la muestra cuando aparentemente se recupera a *M. paratuberculosis* desde circunstancias inusuales o no esperadas.

- Análisis de tipificación genotípica molecular: Se ha avanzado bastante en establecer un protocolo estandarizado para el fingerprinting del ADN de cepas de *M. paratuberculosis*, utilizando polimorfismo del largo de segmentos de restricción (RFLP por su sigla en inglés). Por ejemplo, el método se puede aplicar a cepas de diferentes hospederos y distintos lugares geográficos, para proveer de perfiles genéticos que puedan ser útiles en el análisis de la epidemiología molecular de la Paratuberculosis.

4.8.2 Detección de la respuesta inmune

- Respuesta humoral

Existen tres ensayos comunes para la detección de anticuerpos:

- AGID (Inmunodifusión en gel de agarosa)
- FC (Fijación del complemento)
- ELISA (Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas)

Muchos autores han utilizado la histopatología o el cultivo fecal para caracterizar el verdadero estado de infección, el cual luego utilizan como referencia para comparar los resultados de pruebas serológicas. Esta aproximación tiene sus desventajas, principalmente por la intermitencia de la eliminación de *M. paratuberculosis* por las deposiciones y la frecuente indetectabilidad de lesiones, en las etapas tempranas de la enfermedad. Como resultado se obtienen variados reportes de sensibilidad de estas pruebas serológicas, uno para animales subclínicos y otro para enfermos clínicos. En los casos subclínicos se obtienen tasas de sensibilidad menores y en los casos clínicos, mayores valores (Kennedy *et al.*, 2001).

Los ensayos serológicos tienen su principal funcionalidad como métodos de tamizaje, es decir, para establecer el estado de infección de una población (hay infección/no hay infección). Debido a la lenta diseminación de la Paratuberculosis, los

diseñadores de programas de control recomiendan que el tamizaje de una población esté enfocado hacia animales igual o mayores a los 2 años, a modo de maximizar el valor diagnóstico del tamizaje (Kennedy *et al.*, 2001).

La prueba más utilizada es el ELISA de absorción, debido a que es más sensible que la AGID y la FC. Además es más específico que la FC ya que posee una etapa previa de absorción de anticuerpos inespecíficos. La especificidad del ELISA debiera ser sobre el 99%. La sensibilidad en cambio varía con la etapa de infección en la cual se encuentre el animal. Así se describen sensibilidades del 22% para animales subclínicos que no diseminan y en contraparte sensibilidades del 86% en infectados con signología clínica (Kennedy *et al.*, 2001)

- Respuesta celular

Se describen dos ensayos que detectan inmunidad celular. La prueba intradérmica con PPD de *M. paratuberculosis* o Johnina y la prueba del interferón gamma bovino. En general la prueba del PPD no se recomienda por su baja especificidad. La prueba del interferón gamma tampoco ha tenido éxito masivamente y se utiliza más que nada en investigación (Kennedy *et al.*, 2001).

Se han utilizado otras pruebas de diagnóstico entre las que se cuentan: PCR, inmunofluorescencia indirecta, radioinmunoensayo, inhibición de la migración de macrófagos, transformación de leucocitos, pero con poca utilidad práctica (Kennedy *et al.*, 2001).

4.8.3 Histopatología

Los hallazgos histopatológicos incluyen infiltración granulomatosa extensa de las vellosidades intestinales, abundantes células gigantes multinucleadas y la presencia de gran cantidad de bacilos ácido-alcohol resistente. Las lesiones pueden no ser detectables al inicio de la infección y también se puede dar el caso de que no se

presenten en todas las zonas recomendadas para tomar la muestra (Kennedy *et al.*, 2001).

4.9 Control

Debido a que la enfermedad de Johne no tiene tratamiento efectivo conocido que se justifique económicamente, las medidas preventivas constituyen el punto principal en el control de esta enfermedad. Existe un conjunto de medidas de control que pueden ser adoptadas individual o conjuntamente. Las medidas que se empleen en un programa de control deberán elegirse según su factibilidad de ser aplicadas y debieran ser respaldadas por un criterio científico (National Johne's Disease Program, 1996).

Lo más utilizado son las clásicas prácticas de manejo como mantener un ambiente limpio, sobre todo donde estarán los recién nacidos, asegurar de que los neonatos ingieran calostro libre de *M. paratuberculosis*, separarlos lo antes posible de sus madres, ojalá 12-24 horas después de nacidos y criarlos en un ambiente limpio, en donde no tengan contacto con heces de animales adultos infectados. Se puede lograr un buen nivel de control combinando las distintas medidas preventivas y sobre todo, respetando las normas establecidas en los programas de control, como el realizar seguimientos periódicos y detectar los predios positivos (Kennedy *et al.*, 2001).

La práctica de eliminar del rebaño a los individuos o grupos enteros infectados depende de los métodos diagnósticos empleados, por lo tanto existirá un alto porcentaje de falsos negativos que quedarán en el predio, debido a las bajas sensibilidades de las pruebas. Esta práctica tiene poca efectividad si no es acompañada de otras medidas de manejo para prevenir la exposición de los animales susceptibles. Otra alternativa posible es generar dos rebaños, uno infectado y otro libre y manejarlos separadamente. Para que las medidas adoptadas sean efectivas, se requiere de la cooperación y comunicación entre el gobierno, los productores, los veterinarios y las demás personas involucradas en la aplicación de estas medidas. Se han desarrollado vacunas atenuadas

y bacterinas, pero no producen buena inmunidad ni impiden la infección de todos los individuos. (Kennedy *et al.*, 2001).

4.10 Pérdidas económicas

Las pérdidas económicas en bovinos de lechería debido a la Paratuberculosis se pueden dividir en directas, indirectas e inaparentes.

En los costos directos se incluyen los debidos a la enfermedad clínica, a infecciones subclínicas y a los generados por programas de control.

- Costos por enfermedad clínica:

Los costos por enfermedad clínica incluyen las pérdidas previas a la eliminación del animal debido a la pérdidas en producción láctea, costos de exámenes y de tratamientos. Pérdidas por eliminación o muerte del animal, debido a un menor valor comercial de la canal y el uso ineficiente del capital. Pérdidas debido a eliminación o muerte prematura, debido a la utilidad que se esperaba obtener de ese animal.

Las vacas de alta producción, infectadas con *M. paratuberculosis*, están más propensas a desarrollar el estado clínico de la enfermedad (Doyle, 1956; Desmecht, 1975; Benedictus *et al.*, 1987). Muchos estudios describen una disminución del 15-20% de la producción láctea en la última lactancia en vacas con Paratuberculosis clínica (Burgelt y Duncan, 1978; Benedictus *et al.*, 1987; Johnson-Ifeorunlu *et al.*, 1996). La mala absorción causa una menor eficiencia de conversión alimentaria, por lo que un animal infectado debe comer más que un individuo sano, por unidad de producción (Kennedy *et al.*, 2001).

- Costos por infección subclínica:

Vacas con Paratuberculosis subclínica producen hasta 6% menos leche que en la penúltima lactancia previa a la eliminación (con menor contenido de grasa y proteína) y hasta 16% menos en la última lactancia (Benedictus *et al.*, 1985; Wilson *et al.*, 1996).

Otras pérdidas producto del estado subclínico de la enfermedad, pueden ser causados por mayores tasas de mastitis e infertilidad, como también producto de mayores tasas de eliminación de animales (Merkal *et al.*, 1975; Abbas *et al.*, 1983; Wilson *et al.*, 1996; Johnson-Ifeorlundu *et al.*, 1996). Las pérdidas económicas comienzan usualmente a partir de la segunda lactancia (Wilson *et al.*, 1996).

- Costos por control:

Los costos del control de la Paratuberculosis consisten en los costos de servicios veterinarios, en costos de programas de pruebas diagnósticas y en los costos del cambio de manejo por parte de la mano de obra contratada, específicamente destinada a las instalaciones de crianza. Sin embargo estos cambios de manejo pueden resultar en el control de otras enfermedades (Kennedy *et al.*, 2001).

Los costos indirectos de la Paratuberculosis resultan de las restricciones en el mercado, de las pruebas diagnósticas en animales que se exportan o que se comercializan en el mercado doméstico (aranceles del laboratorio y del veterinario) y de los fondos para la investigación de la Paratuberculosis. Los costos de incorporar prácticas de manejo preventivas como la crianza de grupos y los centros de crianza artificial, son otra fuente de pérdida económica. Animales de planteles o áreas infectadas pueden sufrir sanciones económicas o ser obligados a ser vendidos sólo para el sacrificio (Kennedy *et al.*, 2001).

Otras formas de pérdidas, menos obvias, son los costos inaparentes que incluyen la pérdida de potencial genético producto de la eliminación temprana y de las restricciones de comercio. Así como los productores de animales de reemplazo de predios infectados pueden estar limitados a vender genética superior, los dueños de

predios no infectados deseados de mantener su estatus sanitario, al poseer rebaños totalmente cerrados, limitan su acceso a genética superior. Sólo una selección limitada desde rebaños negativos puede ser una alternativa para estos productores (Groenendaal *et al.*, 1999).

Existen pocos antecedentes de la enfermedad en Chile y aunque luego de su primer aislamiento en el sur (Grinbergs y Caorsi, 1958), se realizaron estudios de su presencia en la zona central mediante serología, pruebas cutáneas y cultivo de deposiciones en la década del 70 (Mercado, 1975; Cortés, 1976), recién en los últimos años se está reconociendo a la enfermedad como un problema, solicitándose el diagnóstico de laboratorio con mayor frecuencia. Es en este escenario en el que se desea aportar con antecedentes sobre la relación entre, presencia de anticuerpos y de la bacteria en las deposiciones, a modo de contribuir con información para la implementación de planes de manejo de esta enfermedad en el país.

5. HIPÓTESIS

La presencia de anticuerpos contra *Mycobacterium paratuberculosis* en bovinos es indicio de eliminación de la bacteria en sus deposiciones.

5.1 Objetivos

General

- Relacionar la presencia de anticuerpos contra *Mycobacterium paratuberculosis* y el aislamiento bacteriológico desde deposiciones bovinas.

Específicos

- Detectar anticuerpos mediante una prueba de ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) en rebaños sospechosos de tener la enfermedad.
- Aislar *Mycobacterium paratuberculosis* desde muestras de deposiciones de bovinos seropositivos y seronegativos contra la bacteria.
- Comparar estadísticamente los resultados obtenidos por una prueba de ELISA y del cultivo bacteriológico desde deposiciones.

6. MATERIAL Y MÉTODO

6.1 Rebaños lecheros

Se seleccionaron dos rebaños lecheros donde se había detectado previamente anticuerpos contra *M. avium* supsp. *paratuberculosis* y en los cuales hay antecedentes clínicos y patológicos de la presencia de la enfermedad, ubicados en la Región Metropolitana. Dentro de estos, se seleccionaron 136 vacas lecheras que tuvieran al menos una lactancia. A los rebaños seleccionados se les procedió a realizar previamente una prueba de ELISA para estratificar a los animales según el resultado. Del rebaño A se utilizaron 44 animales y del rebaño B 92. A los individuos seleccionados se les tomó nuevamente una muestra de sangre para realizar una segunda prueba de ELISA, el mismo día que se tomaron las muestras de deposiciones para realizar el cultivo fecal.

6.2 Tamaño muestral

El tamaño de muestra calculado correspondió a 136 animales, considerando un error alfa de 5%, una diferencia de 10%, una potencia de 80% y una prevalencia estimada de 15% (Fleiss, 1981).

6.3 Muestras

De cada animal seleccionado se obtuvo simultáneamente una muestra de deposición y una muestra de sangre. Las muestras fecales se obtuvieron por vía rectal mediante una manga de palpación rectal limpia y seca que posteriormente se dio vuelta para mantener la muestra en su interior, sellándola con un nudo hecho con la misma manga. Cada muestra se rotuló con el número de identificación del animal, y se guardó en una caja isotérmica para su transporte hasta el laboratorio de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, donde fueron mantenidas en refrigeración para su procesamiento 24 horas más tarde. Las muestras de sangre se obtuvieron por punción de la vena coccígea en tubos

“Vacutainer®” estériles en cantidad aproximada de 5 ml por animal; una vez en el laboratorio, se obtuvieron los sueros por centrifugación y fueron procesados inmediatamente.

6.4 Examen bacteriológico

6.4.1 Medio de Cultivo

Se utilizó el medio de cultivo recomendado por el Australian Standard Diagnostic Techniques (Stephens, 1987) para el aislamiento primario de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* que corresponde al medio Herrold modificado con yema de huevo y con y sin Micobactina J (Allied Monitor, Inc., USA) en tubos de agar inclinado con tapa rosca y también en tubos con tapón de algodón cardé, sellados con “Parafilm®”. Entre otros componentes, este medio lleva verde de malaquita como antifúngico y Micobactina J cuya función es dejar el hierro disponible para el uso de *M. paratuberculosis*. La composición y modo de preparación del medio de cultivo se presentan en el Anexo 5.

6.4.2 Procesamiento de la muestra

El procesamiento de la muestra de deposición se realizó siguiendo las recomendaciones del Australian Standard Diagnostic Techniques (Stephen, 1987) y con las modificaciones propuestas por Whitlock y Rosenberger (1990) que permiten una mejor eficiencia en la recuperación de la bacteria. Una muestra de 2-5 gramos de deposición se colocó en un tubo con 15 ml de solución salina estéril, se agitó y se dejó decantar por 30 minutos. 5 ml de sobrenadante fue transferido a un tubo de centrifugación estéril conteniendo 25 ml de Cloruro de Hexadecylpyridium (HPC) al 0,9% en caldo cerebro corazón diluido a la mitad de la concentración normal y se incubó por 24 horas a 37°C. Luego el tubo se centrifugó a 900 x g durante 30 minutos. El “pellet” obtenido se resuspendió en 1ml de caldo cerebro corazón diluido a la mitad

de la concentración normal con vancomicina (100µg/ml), ácido nalidíxico (100µg/ml) y amphotericina B (50µg/ml) y se incubó por 48 horas a 37°C.

Cada tubo con medio de Herrold fue inoculado con aproximadamente 100µl del sedimento obtenido. Se inocularon tres tubos por muestra, uno sin Micobactina J y dos con Micobactina J.

6.5 Examen Serológico

Para la detección de los anticuerpos séricos contra *M. avium* subsp. *paratuberculosis* se utilizó una prueba de ELISA, del laboratorio comercial SVANOVA® Biotech (Suecia) de acuerdo al siguiente procedimiento recomendado por el fabricante.

6.5.1 Preparación de las muestras

Las muestras de suero se diluyeron en una solución buffer, utilizando una puntilla desechable diferente para cada muestra y luego agitadas antes de transferirlas a la microplaca. Los sueros fueron diluidos 1:100 con una solución buffer de PBS-Tween (Phosphate buffer saline) (5µl de suero en 495µl de diluyente).

6.5.2 Procedimiento

Antes del ensayo, todos los reactivos se llevaron a temperatura ambiente y se mezclaron suavemente en un "vórtex". Cada ensayo consistió de los siguientes pasos secuenciales:

- a) Dilución de cada muestra y de los controles en una relación de 1/100 con el buffer PBS-Tween.

- b) Selección en la microplaca⁽¹⁾ de los pocillos para los controles (negativo y positivo) añadiendo luego 100µl de cada control previamente diluido. Se utilizó los controles en duplicado.
- c) Adición de 100µl de las muestras diluidas en los pocillos seleccionados.
- d) Sellar la microplaca e incubar por 30 minutos a temperatura ambiente (18-25°C) sobre un agitador de placas.
- e) Escurrir las placas con buffer PBS-Tween. Llenar los pocillos (mínimo 300µl) en cada lavado, vaciar todo el líquido de los pocillos y golpear fuertemente la microplaca para eliminar el resto de líquido. El lavado se repite 3 veces.
- f) Añadir 100µl del conjugado HRP (Horseradish peroxidase)-IgG-anti-bovino a cada pocillo.
- g) Sellar la placa e incubar por 30 minutos a temperatura ambiente (18-25°C) sobre un agitador de placas.
- h) Escurrir la placa con buffer PBS-Tween (repetir el punto e).
- i) Añadir 100µl de solución sustrato a cada pocillo. Incubar por 10 minutos a temperatura ambiente (18-25°C). Comenzar con la cuenta regresiva cuando el primer pocillo es llenado.
- j) Detener la reacción añadiendo 50µl de solución "Stop" en el mismo orden en que se llenaron los pocillos con la solución sustrato.
- k) Mover fuertemente la placa. Dentro de 15 minutos luego de añadir la solución Stop, se debe medir la absorbancia o densidad óptica (DO) de las muestras y de los controles a 450nm en un lector de ELISA. Se blanquea con aire.

¹ El antígeno viene pegado a la microplaca.

6.5.3 Cálculo e interpretación de resultados

Para obtener una validación de los resultados del ensayo, antes de calcular e interpretar los resultados de las muestras, los valores DO de los controles se deben comparar con el siguiente criterio de aceptación:

- Criterio de aceptación para el Control Positivo y Control Negativo

Los valores duplicados deben tener una DO >1.00, y no deben diferir entre ellos en más de 25% . En el caso del control negativo su PP (Porcentaje de positividad) debe ser <10%. Si cualquiera de estos criterios no se cumple, la prueba no es válida y se debe repetir.

- Cálculo del Porcentaje de Positividad (PP)

$$PP = \frac{\text{promedio de la DO de la muestra} \times 100}{\text{Promedio de la DO del control positivo}}$$

- Interpretación de los resultados de las muestras

PP	Interpretación
≥ 53	Positivo
32-52	Sospechoso
≤ 31	Negativo

Si bien este "kit" entrega valores positivos, sospechosos y negativos, para efecto del análisis estadístico, los sospechosos fueron transformados a valores positivos o negativos solamente. Esto se hizo distribuyendo a los sospechosos según su porcentaje

de positividad, respecto al promedio del criterio para clasificar a un animal como sospechoso. De esta manera, todos los sospechosos con un porcentaje de positividad igual o superior a 42 fueron reclasificados como positivos y los que se encontraban con un valor inferior a este rango, como negativos.

6.6 Análisis estadístico

Análisis estadístico mediante Prueba de Hipótesis para muestras asociadas (McNemar) mediante la distribución de X^2 y determinación de la fuerza de asociación mediante índice *kappa*.

7. RESULTADOS

7.1 Examen bacteriológico de deposiciones

7.1.1 Cultivo

El aislamiento de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* fue posible utilizando como medio de cultivo el de Herrold modificado con yema de huevo. De los 136 animales muestreados, 14 dieron positivo al cultivo, correspondiendo a un 10,29% de las muestras. En el rebaño A, donde se muestrearon 44 animales, 3 dieron positivo, correspondiendo al 6,82%. En el rebaño B, 11 animales salieron positivos, siendo el 11,96% de los 92 animales muestreados.

El criterio utilizado para declarar como positivo a una muestra fue el desarrollo de varias colonias blanquecinas pequeñas o bien algunas de mayor tamaño, a partir de la octava semana de incubación y sólo en los tubos con Micobactina J. Además cada caso fue confirmado mediante la técnica de tinción de Ziehl-Neelsen, útil para la detección de bacterias ácido-alcohol resistente.

Uno de los principales problemas de este estudio fue la alta tasa de contaminación de los tubos. El porcentaje de tubos contaminados fue de 44,85%, siendo de 22,73% en las muestras del rebaño A y 55,43% en las muestras del rebaño B. Del total de tubos contaminados, el 16,4% correspondió a tubos con tapa rosca y el restante 83,6% correspondió a tubos sin tapa rosca.

Tabla 1 Resultados del cultivo bacteriológico

Resultado del Cultivo	Animales		
	Rebaño A	Rebaño B	Total
Positivos	3	11	14
Sin crecimiento	31	30	61
Contaminados	10	51	61
Total	44	92	136

7.2 Examen serológico

7.2.1 ELISA

Del rebaño A se obtuvo 44 muestras positivas al ELISA y del rebaño B, 70 positivas y 22 negativas.

Tabla 2 Resultados del ELISA SVANOVA®

Resultado del ELISA	Animales		
	Rebaño A	Rebaño B	Total
Positivos	44	70	114
Negativos	0	22	22
Total	44	92	136

7.3 Análisis estadístico

El análisis estadístico mediante la prueba de McNemar, demostró que no existe asociación entre el resultado del cultivo fecal y los resultados obtenidos en el ELISA SVANOVA®. Esto se demuestra por el bajo valor de p obtenido, que fue de $P < 0,0001$. Concordantemente la fuerza de asociación fue pobre, con un valor de $kappa = 0,029$.

Debido al alto porcentaje de muestras contaminadas en el estudio, calculamos si había asociación entre los resultados del ELISA SVANOVA® y sólo las muestras no contaminadas del cultivo bacteriológico. Los resultados de la prueba de McNemar mostraron que no hay asociación entre ambas pruebas, con un valor de $P < 0,0001$. La fuerza de asociación fue pobre con un valor de $kappa = 0,028$.

8. DISCUSIÓN

En este trabajo fue posible aislar *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* desde deposiciones de bovinos de lechería utilizando el método propuesto en Australian Standard Diagnostic Techniques (Stephens, 1987). Aunque en un porcentaje menor de lo esperado, se logró un resultado positivo en 14 muestras (10,29%) de las 136 analizadas. Tal como se indica en la literatura (Collins, 1994) las colonias comenzaron a hacerse visibles a partir de la 8^{va} semana de incubación, presentando la morfología clásica descrita para *Mycobacterium paratuberculosis* (O.I.E., 1996), caracterizadas por ser pequeñas (1mm de diámetro), incoloras, translúcidas y hemisféricas, además de poseer bordes redondos y parejos y una superficie lisa. Se observó que en algunos casos se desarrollaron colonias de mayor tamaño y en menor número por tubo, fenómeno que estaría dado por la carga inicial en la muestra de deposición. Si en la muestra hay gran cantidad de bacterias, estas crecerán hasta formar varias colonias que irán limitando su tamaño. En cambio, si la carga bacteriana inicial es menor, la cantidad de colonias formadas será menor, teniendo más espacio para crecer y así formando colonias más grandes.

Desafortunadamente en este trabajo se obtuvo un alto número de tubos contaminados, especialmente con hongos. Esto a pesar de la utilización de un decontaminante y de antibióticos en el precultivo. Se estima que la causa más probable sería la utilización de algunos tubos sin tapa rosca, llevando un tapón de algodón cardé y un sello de "Parafilm ®". Esta contaminación fue visible alrededor de la 6^{ta} semana de incubación y fue visible el hecho que comenzó desde el tapón, propagándose hacia el otro extremo del tubo. La contaminación de tubos con tapa rosca fue mucho menor y esta correspondió exclusivamente a agentes bacterianos, que no fueron inhibidos por la etapa de decontaminación previa ni por el precultivo con antibióticos. Un grado alto de contaminación siempre es esperable cuando se trabaja con material fecal. El 90% de los tubos contaminados correspondieron a los sin tapa rosca.

Según Collins (1996), el hecho de centrifugar la muestra para obtener una mayor concentración de la bacteria, inevitablemente genera también una concentración de agentes contaminantes. Esto podría explicar el alto grado de contaminación alcanzado, pero nuestra contaminación fue mayoritariamente de tipo externa, es decir, por agentes que no se encontraban en la muestra.

Tal vez una medida que puede aminorar tan alto grado de contaminación, es la propuesta por Stabel (1997) quien incluye en el medio de cultivo 2 tipos de antibióticos (ácido nalidíxico y vancomicina a concentraciones de 50 μ g/ml).

La experiencia de este estudio, nos obliga a recomendar que sólo se utilicen tubos con tapa rosca para disminuir el grado de contaminación con agentes externos. Debido a que se trabaja con deposiciones, la contaminación interna es muy probable de ocurrir, por lo que recomendamos seguir el protocolo de preparación de la muestra propuesto por Whitlock y Rosenberger (1990) y además sugerimos probar la utilización de antibióticos en el medio de cultivo (Stabel, 1997).

En el diagnóstico serológico de Paratuberculosis se obtuvo un porcentaje alto de animales sospechosos al ELISA, los cuales no podían ser incluidos en el análisis estadístico. Se considera que el rango para sospechosos dado por SVANOVA® es muy amplio (32-52, un 20% dentro de la escala de valores de porcentaje de positividad) por lo que se optó por establecer un "cut-off" intermedio de 42%. Esto nos permitió transformar a los sospechosos en positivos y negativos. El criterio utilizado por SVANOVA® de establecer tan amplio margen de sospechosos, resulta en una omisión automática de todo falso positivo o falso negativo, ya que estos se incluyen en este rango. Por lo tanto, podríamos decir que al establecer este nuevo "cut off" estaríamos aumentando hasta cierto punto tanto la sensibilidad como la especificidad.

Llama la atención la gran cantidad de resultados positivos al ELISA SVANOVA®, el cual utiliza el antígeno lipoarabinomannan (LAM). El "kit" no contiene un antígeno de *Mycobacterium phlei* que utilizan otros productos comerciales para purificar el suero de anticuerpos contra otras micobacterias y que podrían interferir en los resultados

generando falsos positivos. Una vez realizado el cultivo, en 31 de las muestras (70,45%) del rebaño A que dieron positivo a este ELISA no obtuvimos crecimiento bacteriológico en cultivo. En el rebaño B, hubo 22 muestras (23,91%) con estas características. En total se detectaron 53 muestras (38, 91%) positivos en la prueba de ELISA pero negativos al crecimiento en cultivo. Este hecho nos hace cuestionar la prueba de ELISA del laboratorio SVANOVA®, puesto que entrega un alto número de resultados positivos de los cuales esperábamos obtener también un resultado positivo en el cultivo.

El hecho de que hubo un alto número de cultivos contaminados, que fueron considerados dentro de los resultados negativos, pudo interferir en este resultado, pues no sabemos si en alguno de ellos estaba presente *Mycobacterium paratuberculosis*.

Cuando consideramos el eliminar a los contaminados, a modo de observar que ocurría con la asociación, tampoco entregó un resultado satisfactorio. Esto podría explicarse por la drástica disminución del número de muestras (de 136 a 75, una disminución del 44, 86% de las muestras), lo que no permitiría un análisis correcto.

En un estudio similar en nuestro país obtuvieron un 7,6% de contaminación solamente y un 16% de resultados positivos al cultivo bacteriológico. Además, compararon dos pruebas de ELISA, una del laboratorio IDEXX® y otra del laboratorio SVANOVA®. La prueba IDEXX® entregó un 8% de resultados positivos versus un 16,8% entregado por el "kit" SVANOVA®. Ellos concluyeron que el ELISA IDEXX® tuvo igual sensibilidad que el SVANOVA®, pero una mayor especificidad y una mayor concordancia con el cultivo fecal (Soto, 2001).

Algunos autores como Collins (1996) y Whitlock *et al.* (2000) encontraron en sus estudios que efectivamente existe asociación entre presencia de anticuerpos y eliminación de la bacteria en las deposiciones. Según estos autores, a medida que en el animal infectado se desarrolla la enfermedad, aumenta también la probabilidad de encontrar al agente en las deposiciones y de obtener resultados positivos a una prueba de ELISA.

9. CONCLUSIONES

1. La técnica de aislamiento mediante el medio de cultivo de Herrold modificado con yema de huevo y Micobactina J resultó efectiva para el aislamiento de la bacteria.
2. La contaminación en este estudio resultó alta en tubos sin tapa rosca, por lo que recomendamos la utilización de tubos que tengan tapa rosca. Sugerimos utilizar el procedimiento de decontaminación previa descrita por Whitlock y Rosenberger (1990) y experimentar la adición de antibióticos al mismo medio de cultivo, según Stabel (1997).
3. No se logró establecer una asociación entre la presencia de anticuerpos y la diseminación de la bacteria por las deposiciones.

10. BIBLIOGRAFÍA

ABBAS B.; RIEMANN H.P.; HIRD D.W. (1983). Diagnosis of Johne's disease (paratuberculosis) in Northern California cattle and a note of its economic significance. *Calif. Vet.* 37: 20-24.

BEARD P.M.; DANIELS M.J.; HENDERSON D.; PIRIE A.; RUDGE K.; BUXTON D.; RHIND S.; GREIG A.; HUTCHINGS M.R.; MCKENDRICK I.; STEVENSON K.; SHARP J.M. (2001). Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland. *J. Clin. Microbiol.* 39: 1517-1521.

BENEDICTUS G.; DIJKHUIZEN A.A.; STELWAGEN J. (1985). Economic losses to farms due to paratuberculosis. *Tijdschrift. Diergeneesk.* 110 (8): 310-319.

BENEDICTUS G.; HAAGSMA J. (1986). The efficacy of mesenteric lymph node biopsy in the eradication of paratuberculosis from an infected dairy farm. *Vet. Q.* 8 (1): 5-11.

BENEDICTUS G.; DIJKHUIZEN A.A.; STELWAGEN J. (1987). Economic losses due to paratuberculosis in dairy cattle. *Vet. Rec.* 121: 142-146.

BUERGELT C.D.; DUNCAN J.R.D. (1978). Age and milk production data of cattle culled from a dairy herd with paratuberculosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 173: 478-480.

BUERGELT C.D.; POOL M.O.; WILLIAMS E. (1978). Pathological evaluation of paratuberculosis in naturally infected cattle. *Vet. Path.* 15: 196-207.

CHIODINI R.J.; VAN KRUININGEN H.J.; MERKAL R.S. (1984). Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. *Cornell Vet.* 74: 218-262.

CHIODINI R.J. (1996). Immunology: resistance to paratuberculosis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 12(2): 305-312.

CLARKE C.J. (1997). The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *J. Comp. Path.* 116: 217-261.

COLLINS M.T.; KENEFICK K.B.; SOCKETT D.C.; LAMBRECHT R.S.; MCDONALD J.; JORGENSEN J.B. (1990). Enhanced radiometric detection of *Mycobacterium paratuberculosis* using filter concentrated faecal specimens. *J. Clin. Microbiol.* 28: 2514-2519.

COLLINS M.T. (1994). Clinical approach to control of bovine paratuberculosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 204: 208-210.

COLLINS M.T. (1996). Diagnosis of paratuberculosis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 12(2): 357-371.

COLLINS M.T.; SPAHR U.; MURPHY P.M. (2001). Ecological characteristics of *M. paratuberculosis*. *Bull. Int. Dairy Fed.* 362/2001, (IDF) Brussels, pp 32-40.

CORTÉS P.J. (1976). Diagnóstico de paratuberculosis en bovinos por pruebas de hipersensibilidad cutánea y fijación de complemento. Tesis para optar al Título Profesional de Médico Veterinario de la Universidad de Chile. 35p.

DESMECHT M. (1975). La paratuberculose. Symptomatologie et facteurs favorissants. *Ann. Med. Vet.* 119: 371-381.

DOYLE T. (1956). Johne´s disease. *Vet. Rec.* 68: 869-886.

FLEISS J. L. (1981). *Statistical Methods for Rates and Proportions*. Second Edition. John Wiley and Sons Inc. New York, USA, pp 118.

GRINBERGS J.; CAORSI I. (1958). Enfermedad de Johne o paratuberculosis en Chile. 3ª Convención de Médicos Veterinarios, Chillán, Nov. 1958. Publicaciones Científicas de la Universidad Austral de Chile, pp 9-13.

GROENENDAAL H.; JALVINGH A.W.; NIELEN M.; HORST H.S. (1999). An epidemiological and economic study to evaluate the control of Johne´s disease on dairy herds in the Netherlands: a stochastic simulation model. Poster presentation at Soc. Vet. Epi. Prev. Med. 24-26 March, Bristol.

HOFFSIS G.F.; STREETER R.N.; RINGS D.M.; ST. JEAN G. (1990). Therapy for Johne´s disease. *Bov. Prac.* 25: 55-58.

JOHNSON-IFEARULUNDU Y.J.; KANEENE J.B.; SPRECHER D.J. (1996). The effect of subclinical Johne´s disease on reproductive outcomes in dairy cattle: some preliminary results. *In: Proc. 5th International Colloquium on Paratuberculosis* 29 Sept-4 Oct. Madison, USA, pp 147-150.

JOHNSON-IFEARULUNDU Y.J.; KANEENE J.B. (1997). Relationship between soil type and *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 210: 735-740.

JOHNSON-IFEARULUNDU Y.J.; KANEENE J.B. (1999). Distribution and environmental risk factors for paratuberculosis in dairy cattle herds in Michigan. *Am. J. Vet. Res.* 60(5): 589-596.

KENNEDY D.J.; HOLMSTROM A.; PAVLIK I.; CARTER M.; BERNADELLI A.; NISHIMORI K. (2001).- Revision of OIE Code Chapter on Paratuberculosis Supporting Document, 48 p.

LARSEN A.B.; MERKAL R.S.; VARDAMAN T.H. (1956). Survival time of *Mycobacterium paratuberculosis*. Am. J. Vet. Res. 54: 120-129.

LARSEN A.B. (1973). Johne's disease-immunization and diagnosis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 163: 902-904.

MANNING E.J.B.; COLLINS M.T. (2001). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 20: 133-150.

MERCADO F.G. (1975). Diagnóstico de paratuberculosis en bovinos por pruebas de hipersensibilidad cutánea, examen microscópico y cultivo de fecas. Informe Práctica Profesional para optar al Título Profesional de Médico Veterinario de la Universidad de Chile. 35p.

MERKAL R.S.; LARSEN A.B.; BOOTH G.D. (1975). Analysis of the effect of inapparent bovine paratuberculosis. Am. J. Vet. Res. 36(6): 837-838.

NATIONAL JOHNE'S DISEASE PROGRAM. (1996). Johne's Disease in Cattle, Handbook for Veterinarians. CSL Veterinary. 35 p.

O.I.E., 1996. Paratuberculosis (Johne's disease) *In*: Manual of standards for diagnostic tests and vaccines, pp 218-228.

PAVLIK I.; BARTL J.; HORVATHOVA A. ; DVORSKA L.; MATLOVA L.; FISCHER O.; DU MAINE R.; ROZSYPALOVA Z. (1999). Study of differing *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DNA fingerprints from farm and wild ruminants in the Czech Republic during 1995-1998. *In*: Proc. 6th International Colloquium on Paratuberculosis, 14-18 February, Melbourne, Australia, pp 188-199.

PAVLIK I.; MATLOVA L.; BARTL J.; SVASTOVA P.; DVORSKA L.; WHITLOCK R. (2000). Parallel faecal and organ *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* culture of different productivity types of cattle. Vet. Microbiol. 77(3-4): 309-324.

SOCKETT D.C.; CARR D.J.; COLLINS M.T. (1992). Evaluation of conventional and radiometric fecal culture and a commercial DNA probe for diagnosis of *Mycobacterium paratuberculosis* infections in cattle. Can. J. Vet. Res. 56: 148-153.

SOTO J.P. (2001). Diagnóstico de Paratuberculosis bovina: Comparación de dos test inmunoenzimáticos (ELISA) y examen bacteriológico de fecas en rebaños infectados. Tesis de grado de la Universidad Austral de Chile Facultad de Ciencias Veterinarias. 69 p.

STABEL J.R. (1997). An improved method for cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples and comparison to three other methods. J. Vet. Diagn. Invest. 9: 375-380.

STABEL J.; PEARCE L.; CHANDLER R.; HAMMER P.; KLIJN N.; CERF O.; COLLINS M.T.; HEGGUM C.; MURPHY P. (2001). Destruction by heat of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk and milk products. Bull. Int. Dairy Fed. 362/2001, (IDF), pp 53-61.

STEHMAN S.M. (1996). Paratuberculosis in small ruminants, deer, and South American camelids. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 12(2): 441-455.

STEPHENS L.R. (1987). Johne's Disease (Paratuberculosis). Australian Standard Diagnostic Techniques for Animal Disease, No.21. 11p.

SWEENEY R.W. (1996). Transmission of paratuberculosis. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 12(2): 305-312.

THOREL M.F.; KRICHEVSKY M.; LEVY-FREBAULT V.V. (1990). Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. *nov.*, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. *nov.*, and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. *nov.* Int. J. Systematic Bact. 40: 254-260.

WHITLOCK R.H.; ROSENBERGER A.E. (1990). Fecal culture protocol for *Mycobacterium paratuberculosis*. A recommended procedure. Proc. US Animal Health Association. 94: 280-285.

WHITLOCK R.H.; ROSENBERGER A.E.; SIEBERT M.; SWEENEY R. (1991). Environmental survey of *Mycobacterium paratuberculosis* on dairy farms with a known history of Johne's disease. Proc. US Animal Health Association. 95: 276-280.

WHITLOCK R.H.; BUERGELT C. (1996). Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 12(2): 345-356.

WHITLOCK R.H.; WELLS S.J.; SWEENEY R.W.; VAN TIEM J. (2000). ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. *Vet. Microbiol.* 77: 387-398.

WHITTINGTON R.J.; MARSH I.; TURNER M.J.; MCALLISTER S.; CHOY E.; EAMENS G.J.; MARSHALL D.J.; OTTAWAY S. (1998). Rapid detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in clinical samples from ruminants and in spiked environmental samples by modified BACTEC 12B radiometric culture and direct confirmation by IS900 PCR. *J. Clin. Microbiol.* 36: 701-707.

WHITTINGTON R.J.; MARSH I.; MCALLISTER S.; TURNER M.J.; MARSHALL D.J.; FRASER C.A. (1999). Evaluation of modified BACTEC 12B radiometric medium and solid media for culture of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* from sheep. *J. Clin. Microbiol.* 37: 1077-1083.

WHITTINGTON R.J.; REDDACLIFF L.A.; MARSH I.; MCALLISTER S.; SAUNDERS V. (2000). Temporal patterns and quantification of excretion of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in sheep with Johne's disease. *Aust. Vet. J.* 78(1): 34-37.

WILSON D.J.; ROSSITER C.A.; HAN H.R.; SEARS P.M. (1996). Financial effects of *Mycobacterium paratuberculosis* on mastitis, culling and milk production in clinically normal dairy cattle. *In: Proc. 5th International Colloquium on Paratuberculosis* 29 Sept-4 Oct. Madison, USA, pp 151-158.

11. ANEXOS

ANEXO 1 Resultados del cultivo bacteriológico del rebaño A

C = Contaminado

Animal Nr.	Resultado
2562	C
2616	C
2633	-
2640	-
2667	-
2736	-
2756	+
2758	-
2770	-
2771	-
2800	C
2856	-
2871	+
2891	-
2901	-
2905	-
2907	-
2909	-
2922	-
2938	-
2939	-
2961	-
2969	C
2990	-
2993	-
3019	-
3035	-
3039	-
3057	+
3071	-
9204	-
9300	-
9312	-
9314	-

9322	-
9354	-
9401	-
9422	-
3035	C
2922	C
9401	C
2736	C
2905	C
2939	C

ANEXO 2 Resultados del cultivo bacteriológico del rebaño B

C = Contaminado

Animal Nr.	Resultado
5	C
15	C
26	-
32	C
36	-
38	+
39	C
40	-
43	-
46	+
62	C
75	C
84	C
94	-
95	+
168	C
172	+
200	C
228	-
238	C
249	-
260	C
261	-
266	-
297	-
315	C
317	C
342	+
360	-
423	C
462	+
465	C
521	C
566	C
609	C
612	-
620	C

638	C
657	C
848	C
696	-
710	-
787	-
790	C
795	-
797	C
820	C
825	C
837	C
847	C
887	-
889	C
896	-
915	C
919	C
926	C
932	C
934	C
939	-
955	C
957	+
963	-
984	C
989	-
131vq	-
138vq	+
182vq	-
194vq	C
217vq	C
219vq	C
239vq	C
241vq	C
257vq	-
265vq	C
276vq	-
282vq	C
310vq	+
307vq	-
312vq	C

314vq	-
318vq	+
344vq	-
355vq	C
357vq	C
365vq	C
372vq	C
397vq	-
402vq	C
412vq	C
436vq	-
451vq	C
455vq	+

ANEXO 3 Resultados de la prueba de ELISA SVANOVA® del rebaño A

Animal Nr.	Resultado
2562	+
2616	+
2633	+
2640	+
2667	+
2736	+
2756	+
2758	+
2770	+
2771	+
2800	+
2856	+
2871	+
2891	+
2901	+
2905	+
2907	+
2909	+
2922	+
2938	+
2939	+
2961	+
2969	+
2990	+
2993	+
3019	+
3035	+
3039	+
3057	+
3071	+
9204	+
9300	+
9312	+
9314	+
9322	+
9354	+
9401	+
9422	+
3035	+

2922	+
9401	+
2736	+
2905	+
2939	+

ANEXO 4 Resultados de la prueba de ELISA SVANOVA® del rebaño B

Animal Nr.	Resultado
5	+
15	+
26	+
32	+
36	+
38	+
39	+
40	-
43	+
46	+
62	-
75	+
84	+
94	-
95	+
168	+
172	+
200	+
228	+
238	-
249	-
260	+
261	+
266	+
297	+
315	-
317	-
342	+
360	+
423	-
462	+
465	-
521	+
566	+
609	-
612	+
620	+
638	+
657	+

848	+
696	+
710	-
787	+
790	+
795	+
797	+
820	+
825	+
837	+
847	+
887	-
889	+
896	+
915	-
919	-
926	+
932	+
934	-
939	+
955	+
957	+
963	+
984	+
989	+
131vq	+
138vq	+
182vq	+
194vq	+
217vq	+
219vq	+
239vq	+
241vq	+
257vq	-
265vq	-
276vq	+
282vq	-
310vq	+
307vq	-
312vq	-
314vq	+
318vq	+

344vq	+
355vq	+
357vq	+
365vq	-
372vq	+
397vq	-
402vq	+
412vq	+
436vq	+
451vq	+
455vq	+

ANEXO 5 Composición y preparación del medio de cultivo de Herrold modificado con yema de huevo y Micobactina J (Stephens, 1987)

Para la preparación de 500 ml de medio de cultivo de Herrold modificado con yema de huevo y Micobactina J se requiere de los siguientes materiales:

- 1 Frasco con tapa rosca de 1000 ml
- Dosificador
- Tubos con tapa rosca
- Etiquetas para rotular
- Lápiz marcador
- Agua destilada deionizada 500 ml
- NaOH (0,1 M)
- Micobactina J (MJ)
- Etanol 75%
- 4-6 Huevos (“spf” o de gallinas que no han recibido antibióticos)
- Atrapa yemas
- Verde malaquita 2% autoclavada 2,6 ml
- Proteosa peptona 4,50 g
- NaCl 2,25 g
- Agar 7,50 g
- Extracto de carne 1,35 g
- Glicerol 13,5 ml
- Piruvato de Na 2,00 g

Preparación:

Proteosa peptona, NaCl, Agar, Extracto de carne, Glicerol y Piruvato de Na se deben disolver en 445 ml de agua destilada deionizada y se debe ajustar el pH en 7,2 con NaOH.

Se debe reconstituir la Micobactina J con etanol a una concentración de 1mg/ml, y transfiriendo 1 ml al medio.

El siguiente paso es autoclavar el frasco a 121°C por 20 minutos. Luego se deja enfriar en baño termostático a 60°C y se añade asepticamente 30 ml de yema de huevo. Se debe esterilizar la superficie de cada huevo,

sumergiéndolos en etanol al 75% por 30 minutos. Luego se hace una abertura de 1 cm² en un extremo con una pinza estéril. Se debe separar la clara de la yema, sin romper la yema (para esto se puede utilizar un atrapa yema). A continuación se agrega 1,3 ml de verde malaquita al 2%. Se debe mezclar bien, para luego proceder a repartir asépticamente con un dosificador especial, 5 ml de medio Herrold en tubos estériles con tapa rosca, los cuales posteriormente deben ser tendidos.