



UNIVERSIDAD DE LAS AMÉRICAS
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y AGRONOMÍA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA

**Prevalencia de paratuberculosis en un predio extensivo comuna de
Curacaví Región Metropolitana, Chile**

Profesor guía: Roberto Muñoz Álvarez

Profesor Corrector: Vicente Aljaro Merino

Alumno: Sergio Guerrero Castro

SANTIAGO- CHILE

2016

Agradecimientos

Esta tesis está dedicada a mis padres, señora e hijas y hermanos los que me han acompañado en este camino.

A mis amistades en general y de la Universidad que más que mis compañeros han sido mis amigos.

A los docentes de tesis que me han entregado todas las herramientas en los años de carrera para reforzar mi espíritu de esfuerzo, perseverancia y las ganas de ser un mejor profesional.

Índice

Agradecimientos.....	1
Índice.....	2
Introducción.....	5
Revisión bibliográfica.....	6
Descripción de la bacteria.....	6
Transmisión de la enfermedad.....	8
Patogenia.....	10
Manifestaciones clínicas.....	12
Diagnóstico de la enfermedad.....	19
Tratamiento.....	21
Situación en Chile.....	22
Control y erradicación.....	24
Potencial zoonótico.....	26

Objetivos.....	29
Objetivo General.....	29
Objetivo Específico.....	29
Materiales y métodos.....	30
Materiales.....	30
Métodos.....	31
Fórmula de Prevalencia (P).....	32
Análisis y presentación de resultados.....	33
Discusión.....	35
Conclusiones.....	37
Bibliografía.....	38
Anexo 1. Resultado de muestras.....	42
Anexo 2. Análisis de las muestras.....	44

Índice de figuras

Figura 1. Imagen de Mycobacterium avium paratuberculosis (MAP).....	7
Figura 2. Esquema de patogenia de Paratuberculosis.....	11
Figura 3. Imagen de signo clínico por Paratuberculosis.....	16
Figura 4. Lesión macroscópica por Paratuberculosis.....	17
Figura 5. Lesión microscópica por Paratuberculosis.....	18

Índice de gráficos

Gráfico 1: Gráfico en torta de seroprevalencia de paratuberculosis.....	33
Gráfico 2: Gráfico de barra de prevalencia.....	34

Índice de tablas

Tabla 1	42
----------------------	----

Introducción

La paratuberculosis o enfermedad de Johne, es una enfermedad bacteriana producida por *Mycobacterium avium* sub especie, *Paratuberculosis (Map)*, que afecta a rumiantes, principalmente bovinos, ovinos y caprinos, produciendo una enteritis crónica e incurable que termina irremediablemente con la muerte del animal (Forshell, 2001 citado por Kruze y col, 2007).

La paratuberculosis fue descrita por primera vez en Alemania por Johne y Frothingham en la especie bovina, en la cual la enfermedad ha sido muy bien caracterizada y está ampliamente difundida en la mayoría de los países, especialmente en rebaños lecheros. (Pradenas, 2008).

Esta enfermedad, de distribución mundial, causa grandes pérdidas económicas en rebaños lecheros debido a una menor producción de leche y eliminación prematura de animales con pérdida de material genético (Hutchinson 1996, Van Schaik, 1996, citado por Pradeñas y col, 2008).

La enfermedad es considerada más que un problema individual, un problema de rebaño (Kalis et al 2000), y se caracteriza por presentar una baja prevalencia individual pero una alta prevalencia predial (Pradenas, 2008).

La enfermedad es principalmente una infección subclínica, con un periodo de incubación prolongado y los signos clínicos son sólo la manifestación terminal de la infección, que se desarrollan en una minoría de los animales infectados (Kennedy, Benedictus, 2001).

La vía de infección es oro-fecal, siendo susceptibles los menores de 3 meses por el incompleto desarrollo del sistema inmune, contagiándose principalmente de calostro y/o leche contaminada o durante la crianza por alimento o agua contaminados con *Map* (Clark, 1997; Stabel, 1998).

La importancia de esta enfermedad radica en que puede existir dentro de un rebaño sin ser detectado durante años si no se realiza pruebas, los síntomas pueden confundirse con otras enfermedades y es causa cuantiosas pérdidas económicas debido a menor producción de leche, menor valor de la canal al sacrificio y disminución del rendimiento reproductivo y en que actualmente existe preocupación por el posible rol zoonótico en la enfermedad de Crohn de los seres humanos, en la cual, ya hay evidencia científica (Collins, 2003; Kuenstner, 2015).

1. Revisión bibliográfica

Descripción de la bacteria

Map es un patógeno intracelular facultativo, Gram positivo, ácido alcohol resistente, aerobio y cuya 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 que sus colonias sean detectables en los medios de cultivo (Chacón, Bermúdez 2004).

Como las bacterias del género *Map* posee un genoma rico en nucleótidos G+C y su pared celular tiene un alto contenido de ácidos micólicos. Como característica especie-específica destacan su dependencia del sideróforo micobactina para el crecimiento in vitro y la presencia del segmento de inserción IS900 en su genoma, que se ha utilizado para la detección específica de este patógeno (Harris y Barletta 2001), (Chacón y Bermúdez 2004).

Una bacteria perteneciente al Orden Actinomycetales, Familia Mycobacteriaceae denominada *Mycobacterium avium* subespecie paratuberculosis (*Map*). Este agente requiere medios de cultivo especiales y demora en el laboratorio 16 semanas en desarrollar. Con humedad elevada, es muy resistente a las condiciones ambientales y sobrevive término medio 9 meses en el estiércol o abono fermentado, 11 meses en el suelo y 17 meses en el agua. La exposición a la luz solar directa, calor y desinfectantes específicos inactivan al microorganismo. Como la bacteria es de crecimiento lento en el intestino delgado del animal infectado produce una enteritis, que se observa en la necropsia como un engrosamiento y plegamiento de la mucosa intestinal, con aspecto de circunvoluciones cerebrales y por esta lesión el animal enfermo es incapaz de absorber nutrientes (Traversa, 2005).

Se conocen tres grupos diferentes de cepas de *M. paratuberculosis*, uno de ellos, ampliamente distribuido, ocasiona la enfermedad en el ganado vacuno y es fácil de cultivar a partir de heces o tejidos tras incubación de 6 a 12 semanas. El segundo grupo está formado por cepas ovinas y caprinas, difíciles de cultivar a partir de las heces, ya que en ellas los gérmenes son muy numerosos. El tercer grupo incluye las cepas identificadas en ovejas procedentes de Islandia, Canadá y Sudáfrica. La cepa específica para la cabra de Noruega no es patógena para las vacas. Las cepas aisladas en ciervos son similares a las bovinas. Las cabras salvajes son sensibles a las cepas bovinas de Nueva Zelanda (Radostits, 2004).

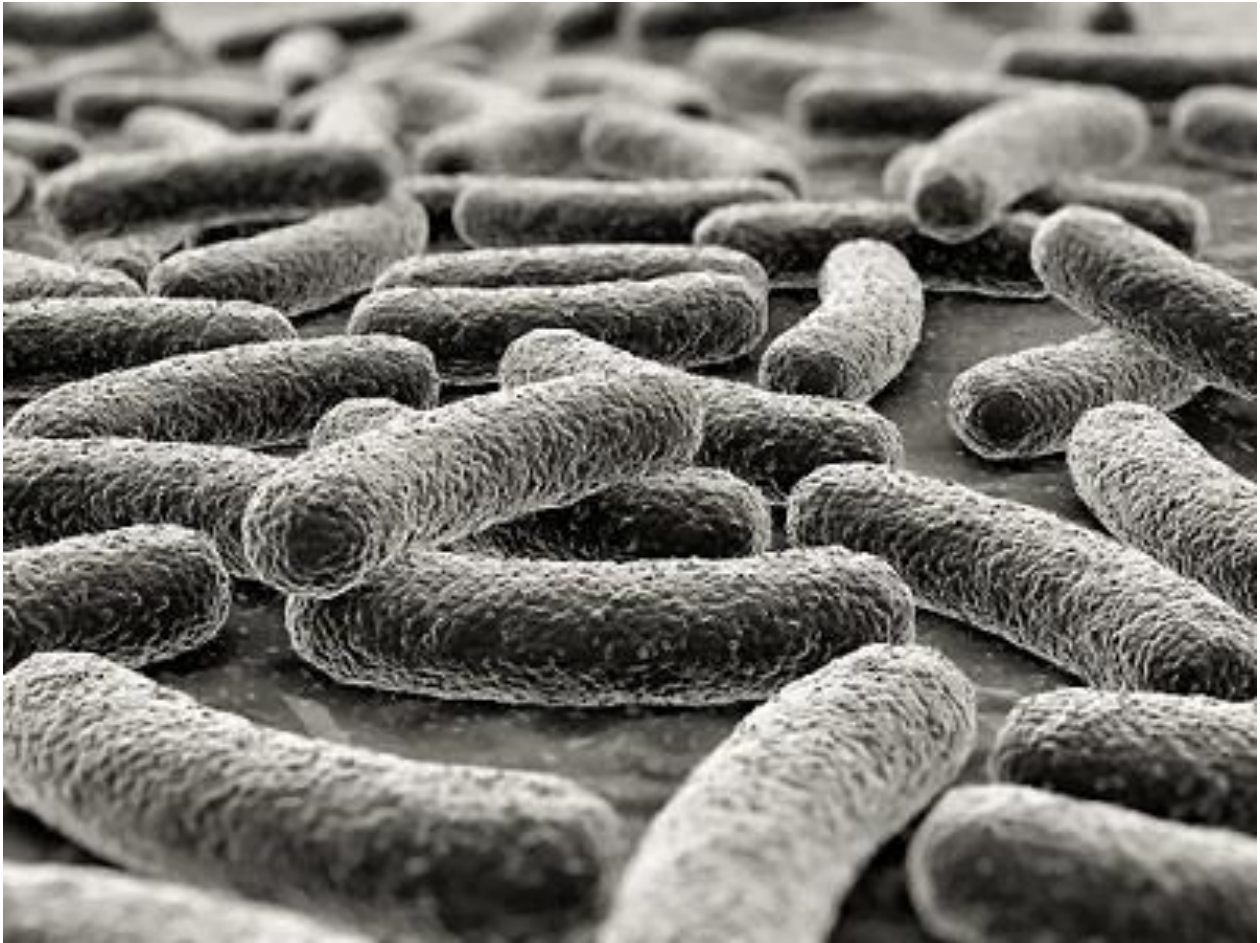


Figura 1: Imagen de *Mycobacterium avium paratuberculosis* (MAP) por Richards 2015

Transmisión de la enfermedad

Los gérmenes del complejo *Map* son ubicuos y pueden aislarse del suelo, plantas, el agua y la comida para animales. En la paja del suelo de los establos se han aislado en grandes cantidades he aquí una fuente importante de transmisión.

La ingestión parece ser la vía normal para contraer la infección (Kazda, Cook 1988)

Los animales infectados excretan la bacteria en las heces, el calostro y la leche. Los animales jóvenes adquieren la infección generalmente por contaminación del medio o por ingesta de leche contaminada de una vaca infectada. La infección también puede transmitirse del animal preñado infectado al feto. El contenido bacteriano en las heces se encuentra antes que los signos clínicos sean evidentes, de ahí que los animales portadores “silenciosos” constituyen una importante fuente de transmisión. La exposición de los animales no infectados suele ocurrir cuando se introducen animales portadores al efecto de ampliación o de reposición del rebaño. Aunque las probabilidades de que los animales adultos expuestos resulten infectados son escasas, los animales jóvenes son altamente sensibles. (OIE, 2011).

La enfermedad se transmite por la ingesta de alimentos y agua contaminados por las heces de animales infectados que excretan el microorganismo. Debido a que el período de incubación normalmente es largo, los animales pueden estar excretando gérmenes por las heces durante 15 a 18 meses antes de que aparezcan los primeros signos clínicos (Radostis, 2004).

La enfermedad es diseminada por eliminación del microorganismo por las heces de los animales infectados de todas las categorías, pero el riesgo se incrementa cuando es un animal clínicamente enfermo que excreta entre $1,3 \times 10^5$ y $5,9 \times 10^9$ microorganismos por gramo de materia fecal. La principal forma de transmisión es cuando el ternero recién nacido está expuesto en la maternidad a las hembras que tiene las ubres contaminadas con materia fecal o directamente por la ingesta de calostro o leche de vacas infectadas. La transmisión transplacentaria también puede ocurrir en el útero de una vaca positiva ya sea vientre natural o receptora de una transferencia embrionaria. Investigaciones sobre la contaminación del suelo han determinado que también juega un rol en la transmisión, los suelos ácidos, los cuales contienen mayor número de micobacterias, porque el hierro necesario para la multiplicación del agente aumenta la solubilidad cuando el pH del suelo disminuye y en esas regiones se registran mayor número de casos de paratuberculosis. El tiempo de supervivencia del *Map* se reduce en

períodos de sequía, exposición a la luz solar, pH del suelo mayor a 7 y bajo contenido de hierro (Traversa, 2005).

La enfermedad se transmite por la ingestión de alimento y aguas contaminadas por heces de animales infectados que excretan el microorganismo (Sweeney, 1996). El periodo de incubación es normalmente largo, los animales pueden estar excretando gérmenes por las heces durante 15 a 18 meses antes de que aparezcan signos clínicos. Se cree que los animales pueden convertirse en excretadores permanentes o temporales del germen sin presentar la enfermedad. Los gérmenes han sido aislados en los genitales y semen de toros infectados, y como resisten la adición de antimicrobianos y la congelación, es frecuente la infección intrauterina. Sin embargo, pequeñas cantidades de gérmenes inoculadas experimentalmente en el útero de las vacas en el momento de la inseminación artificial se destruyen y no causan infección general de la madre o hipersensibilidad persistente.

Es posible aislar los gérmenes de los líquidos uterinos de vacas con infección clínica (Rohde, 1990) y experimentalmente los gérmenes se adhieren a los óvulos pese a haber hecho un lavado en 10 pasos para asegurarse de la eliminación de patógenos potenciales de los embriones.

Patogenia

Las bacterias ingeridas entran en la pared intestinal a través de la mucosa del intestino delgado, principalmente en la región del íleon a través de las células M que residen en las placas de peyer, eventualmente *Map* sobrevive y se replica dentro de los macrófagos subepiteliales (Clark, 1997).

Whitlock y Buergelt, 1996, han dividido la infección por *Map* en cuatro etapas, dependiendo de la gravedad de los signos clínicos, el potencial de arrojar microorganismos en el medioambiente y la facilidad con la cual la enfermedad puede ser detectada usando los actuales métodos de laboratorio. Por cada vaca con avanzada enfermedad de John, hay entre 15 a 25 infectadas, y de estas solo el 25-30% será detectado con técnica de diagnóstico.

Después de un periodo de incubación de varios años (2 a 5) se produce una enteritis crónica linfadenopatía mesentérica, que cursa con una inflamación granulomatosa a nivel del íleon, linfonodos ileosecales o en la zona adyacente del colón. La pared intestinal se edematiza y engrosa, se forman pliegues imitando la apariencia de un cartón corrugado dando lugar a mala absorción y enteropatía perdedora de proteínas (Stabel, 1998).

Patogenia

Paratuberculosis

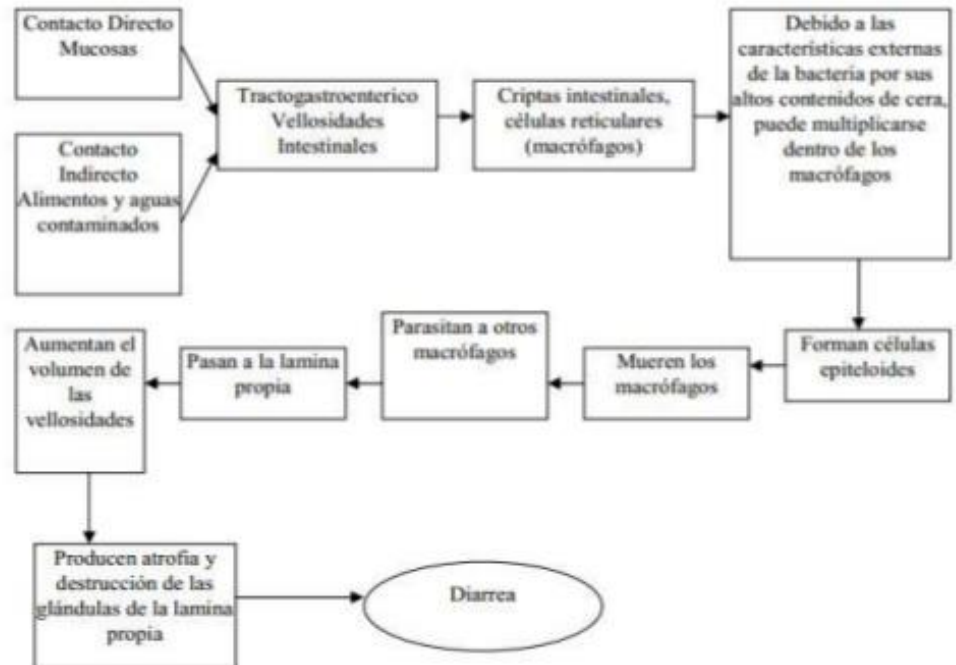


Figura 2: Esquema de patogenia de Paratuberculosis por García 2014

Manifestaciones clínicas

Los signos clínicos característicos de la paratuberculosis como la pérdida progresiva de peso, edema submandibular y diarrea intermitente que no responde al tratamiento permiten sospechar de la enfermedad en los animales vivos. Desafortunadamente, tanto en los rumiantes domésticos como en la mayoría de los animales silvestres la enfermedad cursa en forma asintomática dificultando el diagnóstico (Collins, 1996).

Los signos clínicos cardinales de paratuberculosis en el ganado es la pérdida de peso progresiva con diarrea crónica o intermitente (Clark, 1997). A pesar de que la infección es adquirida por animales en edades tempranas (< 6 meses), los signos clínicos solo aparecen varios años después, generalmente después del segundo o tercer parto (Stabel, 1998).

Whitlock y Buergelt, 1996, han dividido la infección por *Map* en cuatro etapas, dependiendo de la gravedad de los signos clínicos, el potencial de arrojar microorganismos en el medio ambiente y la facilidad con la cual la enfermedad puede ser detectada usando los actuales métodos de laboratorio. Por cada vaca con avanzada enfermedad de John, hay entre 15 a 25 infectadas, y de estas solo el 25-30% será detectado con técnicas de diagnóstico.

Etapa I: Animales hasta 2 años de edad que no presentan signos clínicos de enfermedad pero son eliminadores de *Map* por las heces en cantidades no detectadas por los métodos de diagnósticos actuales. Sin embargo, es posible aislar la bacteria a partir de tejido intestinal (Whitlock, Burguelt, 1996; Tiwari, 2006).

Etapa II: Ganado adulto que no presenta signos clínicos de la enfermedad, pero puede tener un sistema inmune alterado y presentar enfermedades concomitantes como mastitis e infertilidad, cojera o reducida producción de leche, por lo cual, en esta etapa muchos animales son eliminados del rebaño. La mayoría del ganado aca puede arrojar *Map* en sus heces y servir de fuente de infección al rebaño. La tasa de progresión de la enfermedad a través de la etapa II es muy variable y probablemente es influenciado por una amplia gama de factores, tales como: Edad a la exposición inicial al *Map*, la dosis infectante en esa exposición inicial, la frecuencia de volver a la exposición a través del tiempo, los factores genéticos de ambos (huésped y organismos), factores ambientales, factores nutricionales, los efectos de producción y una variedad de otros factores de estrés. Un porcentaje de animales infectados (15% - 25%) puede ser detectado mediante pruebas fecales (Whitlo y Bruguet, 1996 ;Twari y et al, 2006).

Etapa III: Llamada “punta del iceberg” en términos del número total de animales infectados en el rebaño. Los animales progresan al estadio de paratuberculosis clínica, generalmente entre los 2-10 años post infección, pero también se ha observado en animales tan jóvenes como 6 meses y tan viejos como 15 años. Acá hay pérdida de peso gradual, aunque el apetito se mantenga normal y diarrea intermitente que puede durar semanas, disminución en la producción de leche. Constantes fisiológicas son normales. En esta etapa de infección rara vez los animales permanecen en el rebaño, ya que generalmente son sacrificados por la pérdida de peso, la baja producción de leche y la no repuesta al tratamiento a la diarrea (Whitlo y Bruguet, 1996 ;Twari et al,2006).

La población de Map en las células intestinales en esta etapa ya es muy alta. La capacidad de absorción normal del intestino se suprime, lo que resulta en la pérdida de peso con una enteropatía perdedora de proteínas, principalmente albumina. La mucosa intestinal se ve engrosada y asociada a linfadenopatía. la infección se disemina a varios sitios extraintestinales, incluyendo glandula mamaria pulmones ganglio linfáticos hepáticos. Casi todos los animales son positivos a cultivo fecal y pruebas serológicas (Whitlo y Bruguet, 1996; Twari et al, 2006).

Etapa IV: Los animales en enfermedad clínica avanzada están débiles, demacrados y suelen tener diarrea crónica y profusa. Hay edema submandibular por la hipoproteinemia. La muerte se produce como resultado de la deshidratación y la caquexia (Whitlo y Bruguet, 1996; Twari et al, 2006).

Los signos clínicos se manifiestan después de una situación de estrés, como por ejemplo el parto. Los signos son un reflejo de la patología intestinal, que se traduce en un síndrome de mala absorción, caracterizado por una fermentación deficiente en el colon y una diarrea de olor particular, baja de peso y pérdida de masa muscular debido a la hipoproteinemia que conlleva a un edema. Hay antecedentes de que la presencia de la infección en el rebaño incrementa la incidencia de mastitis e infertilidad y acorta la esperanza de vida de los animales. (Abalos, 2001).

- Infección latente

No se presentan signos clínicos o algún cambio evidente de peso corporal o estado físico, pero los animales pueden estar excretando el agente causal.

Dentro de los posibles enfermos están los terneros, los novillos y las vacas hasta los 2 años de edad.

Las pruebas diagnósticas no detectan la infección en este estadio, sin embargo se puede cultivar el agente a partir de fecas o demostrar su presencia en tejidos del animal.

- Enfermedad sub-clínica

Son los portadores adultos, que no presentan ningún signo clínico evidente pero pueden padecer otra enfermedad como mastitis o infertilidad. El cultivo de fecas será negativo en la mayoría de los casos, alcanzando solo un 15 a 25% de resultados positivos. Las pruebas serológicas también resultan negativas y los animales pasan al siguiente estado.

- Enfermedad crónica

Los signos comienzan a aparecer después de los 2 años de edad, siendo más frecuentes entre los 2 y 6 años. Se observa pérdida gradual de peso, pero el apetito es normal. Varias semanas después se presentarán cuadros de diarrea y disminuirá la producción de leche, mientras que las constantes fisiológicas se encuentran dentro de rangos normales.

Los casos son siempre esporádicos, debido a la lentitud con la que se extiende la enfermedad.

La disminución de la producción de leche a menudo resulta ya aparente en la lactancia antes de que comiencen las diarreas.

Las heces son blandas y ligeras, sin mal olor ni restos de sangre, restos epiteliales y moco. Las diarreas pueden ser continuas o intermitentes y con una marcada tendencia a mejorar al final de la preñez, para reaparecer de nuevo de forma grave tras el parto.

También puede haber una mejoría temporal cuando se retira a los animales enfermos de los pastos y se alimentan con alimento seco.

- Enfermedad clínica avanzada

La emaciación es el signo más evidente, acompañado de edema submandibular, que generalmente desaparece al comenzar las diarreas, estas son fecas líquidas expulsadas a chorros, a la que se le llama diarrea explosiva.

La enfermedad puede durar de semanas hasta meses, pero siempre termina en deshidratación grave, emaciación y debilidad general, por lo que es necesario sacrificar al animal.

El valor del rescate de los animales clínicamente afectados es despreciable, debido a la intensa emaciación de los mismos. La base para evaluar los efectos de la infección son un balance energético negativo y una menor inmunidad celular.

La lenta diseminación y la cronicidad de la enfermedad no suponen una pérdida económica aguda, si no recurrente. La mayoría de los estudios económicos ha investigado la asociación entre producción y paratuberculosis clínica y sub-clínica, definidas por la bacteriología o la histopatología de los animales seleccionados para el sacrificio (Wilson, 1993)

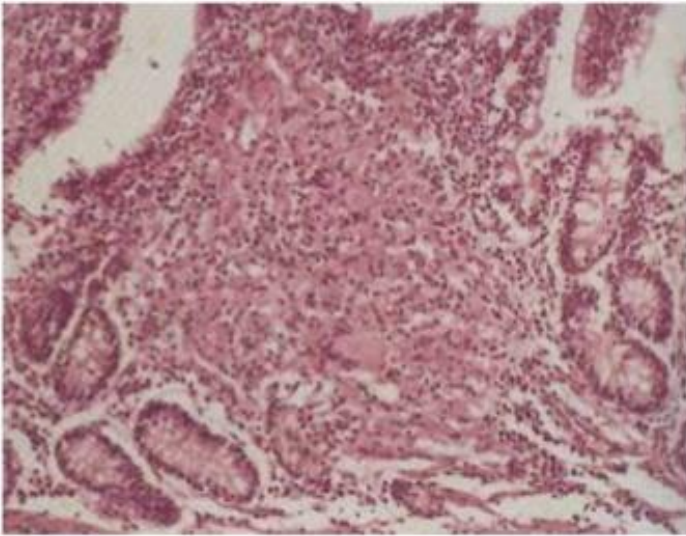


Figura 3: Imagen de deterioro de condición corporal debido a Paratuberculosis por Sandoval
2017



- ***Enteritis proliferativa (Paratuberculosis)***
Yeyuno. Plegamientos circulares intensos causados por engrosamiento de la mucosa.

Figura 4: Lesiones macroscópicas por Paratuberculosis, por García 2014



- *Engrosamiento de la mucosa causado por una acumulación de linfocitos, células epiteliales y células de Langhans, predominantemente en las vellosidades.*

Figura 5: Lesión microscópica por Paratuberculosis, por García 2014

Diagnóstico de la enfermedad

La confirmación del diagnóstico en animales vivos es un poco más difícil, aunque con los antecedentes locales de la enfermedad generalmente no hay mayor problema para un clínico. Las técnicas de confirmación son esencialmente microbiológicas a partir de heces o mediante pruebas serológicas. (Gasquez 2008)

La mayoría de las pruebas diagnósticas actualmente disponibles se basan en la detección de la respuesta inmune humoral, y en la detección de *Map* en las heces a través de cultivo fecal o mediante a la prueba molecular de PCR; sin embargo, estas pruebas no son capaces de detectar infección en animales en estadios iniciales de la enfermedad (Whitlock et al 2000 citado por Pradeñas et al 2008).

El cultivo fecal a pesar de tener baja sensibilidad (50%), es el método más ampliamente usado para la detección del agente y es considerado como la gold estándar, con una especificidad superior al 99%. Sin embargo, no es capaz de detectar animales que excretan mac por las deposiciones en cantidades inferiores a las 100 ufc/g de heces (Collins 1996, Stabel 1997, Stabel 1998, Kallis 2001).

El cultivo fecal, presenta las desventajas de ser laborioso de alto costo y extremadamente lento para entregar un resultado, ya que se requieren 8 a 16 semanas de incubación para detectar la presencia de colonias visibles (Pradenas et al 2008).

La detección de anticuerpos anti-map en el suero de animales infectados mediante la prueba de ELISA es actualmente el método de diagnóstico más ampliamente usado para el monitoreo de rebaños infectados ya que, contrariamente al cultivo fecal es una prueba fácil de realizar rápida y de bajo costo. Sin embargo a pesar de tener una moderada especificidad (90-99%) su sensibilidad promedio es baja (45%) pudiendo alcanzar hasta 85% en animales con signos clínicos pero no supera el 15% en animales con infección subclínica debido a que la respuesta inmune humoral se desarrolla tardíamente en los animales infectados (Cosito, 1994, Collins 1996, Whitlock 1996, Stabel 1998).

En consecuencia la principal ventaja de las pruebas serológicas es que no permiten detectar infección en animales jóvenes cuando aún no desarrollan signos clínicos a pesar de excretar las bacterias por las deposiciones. (Sockett et al 1992, Sweeney et al 1995 citado por Pradenas 2008).

Para el diagnóstico de ParaTB se utilizarán las siguientes pruebas disponibles:

Cultivo fecal individual: Es el método de cultivo más común y se considera el “gold standard” en el animal vivo. Su sensibilidad es variable y depende de la fase de infección, del nivel de eliminación fecal y de la homogeneidad de la muestra, especialmente en fases de eliminación leve. Alguna variabilidad existe también entre diferentes tipos y protocolos de cultivo. La especificidad del cultivo se considera 100%. (SAG, 2011).

Cultivo de pool fecal: Es un método de cultivo fecal agrupado (pool), donde varias muestras fecales (hasta 5) constituyen un cultivo unitario. Este procedimiento requiere de muestras fecales individuales y tiene una sensibilidad similar al cultivo fecal individual y varía según la fase de la infección y del nivel de eliminación fecal. (SAG, 2011).

Cultivo de muestras ambientales: Muestras ambientales colectadas de pozos purineros o de áreas donde una gran proporción del rebaño está congregado o transita frecuentemente (patios de estabulación, pasillos, maternidades, patios de espera, etc.). (SAG, 2011).

Cultivo de tejidos: La infección por Map afecta principalmente a la parte final del intestino delgado y ciego adyacente. Las bacterias Map están en un número muy superior al de otras bacterias, en muestras de heces y tejidos intestinales. Las colonias primarias de Map pueden aparecer en cualquier momento a partir de las 5 a 14 semanas, después de la inoculación. (SAG, 2011).

ELISA: Es la prueba más utilizada para la detección de anticuerpos circulantes anti-Map tanto en suero sanguíneo como en leche. Su sensibilidad promedio es de 45% pudiendo variar entre 25% en animales subclínicos hasta 75% en animales con sintomatología clínica. (SAG, 2011).

PCR: Para detectar la presencia de Map, a través de pruebas moleculares. La secuencia de inserción IS900 puede ser usado como método de diagnóstico, así como para la confirmación de identidad de una colonia sospechosa de Map a partir de un cultivo. Su desventaja principal es que no es cuantitativa, es decir no se puede evaluar la cantidad de bacterias eliminadas. Lo otro que resulta de esta desventaja es que si la cantidad de bacterias es muy baja, la sensibilidad es muy baja y no se puede distinguir de una bacteria viva o fragmentos de DNA del medio ambiente. (SAG, 2011).

Histopatología: Demostración de la respuesta inflamatoria y la presencia de Map en cortes histológicos de mucosa intestinal (ileon) y nódulos linfáticos mesentéricos. (SAG, 2011).

Tratamiento

Actualmente no existe ningún fármaco antimicrobiano para el tratamiento de la enfermedad de Johne, sin embargo se han empleado algunos antibióticos tales como clofazimina, isoniazida y estreptomina, los cuales no curan la enfermedad, los tratamientos son muy largos y aún existen la diseminación fecal a pesar del cuadro clínico mejorado. Dado el tratamiento es caro y poco gratificante, solo se utiliza para prolongar la vida de los animales muy valiosos (Rebhun, Chuck, 1995; Stabel, 1997; Radostids,1999).

Situación en Chile

En Chile, la enfermedad fue descrita por primera vez en bovinos por Grinbergs y Caorsi (1958) en la provincia de Valdivia.

En Chile la paratuberculosis en los animales es endémica, habiéndose reportado en rebaños bovinos lecheros, con antecedentes serológicos que sugieren más del 50%, similar a lo descrito en Norteamérica y Europa. Se estima que esta tasa lejos de bajar estaría aumentando debido a que no existe medidas efectivas de prevención y control de la infección a nivel de rebaños, debido principalmente a un desconocimiento de la biología de infección (Kruze, 2007 ; Retamal, 2010).

En los últimos 10 años el laboratorio de Diagnóstico del Instituto de Microbiología, Universidad Austral de Chile, ha registrado en varios estudios la presencia de paratuberculosis, especialmente en el sur de Chile, en donde se determinó mediante la técnica de ELISA, una prevalencia predial para la especie bovina de 74,1%. También toma importancia la infección dentro de la especie caprina y más recientemente ciervos y guanacos (Kruze, 2007; Burgos, 2011).

La paratuberculosis es una enfermedad incluida en la lista de la OIE que afecta a múltiples especies, por tal motivo los países miembros tienen la responsabilidad de comunicar la situación respecto de ésta enfermedad. Según Soto (2002), en nuestro país no existen antecedentes oficiales sobre prevalencia de paratuberculosis bovina, es posible sospechar que existe un porcentaje elevado de rebaños infectados, especialmente rebaños lecheros. Según Collins (2005), la prevalencia de la paratuberculosis en Chile sería de un 50%.

Durante 1995 se monitoreó en esta especie la paratuberculosis, en lecherías de la V a VII Región del país que tuvieran una dotación de vacas igual o mayor a 40. El estudio se diseñó con el objetivo de obtener la prevalencia predial de la zona central del país. La prueba de diagnóstico utilizada fue ELISA, con la cual se obtuvo un total de 56 vacas seropositivas de un total de 1.855 muestreadas. Las vacas seropositivas provenían de 32 planteles de 86 muestreados lo que arrojó una prevalencia predial de paratuberculosis para la zona central del país (V a VII Región) en lecherías con más de 40 vacas, de 36,5% con un 90% de confianza (Abalos, 2002)

El rango de la prevalencia obtenida va desde 21,9% a 51,1%, esto considerando el error con que se diseñó el estudio (40%). Con este estudio no se pudo obtener prevalencias regionales,

pero si es interesante informar el porcentaje de positividad de los predios muestreados por región, es así como en la V Región se obtuvo un 80% de los predios muestreados positivos, 40% en la Región Metropolitana, 46% en la VI Y 56% en la VII región. Es importante mencionar que la prevalencia se puede evaluar individual y predialmente, es decir, cuantos animales son positivos a las pruebas diagnósticas, y cuantos rebaños tienen animales positivos a pruebas diagnósticas , respectivamente (Abalos, 2002).

La literatura nos habla que hay muy pocos estudios acerca de la prevalencia en el ámbito nacional sobre la enfermedad, sin embargo en la zona sur hay algunas referencias que nos puede permitir hacer un parámetro a grandes rasgos de la enfermedad en forma predial e individual de esta, lo cual esta tesis nos puede servir para entregar antecedentes importantes sobre la distribución de la paratuberculosis.

Sin embargo no podemos descartar que la enfermedad haya estado presente hace mucho tiempo atrás, como fue descrito por Grinbergs y Caorsi en 1958 en el instituto de microbiología que se describió por primera vez.

Después en las provincias de Osorno, Valdivia y Llanquihue se obtuvieron muestras de material fecal en animales con signos clínicos dando un 35,9% positivos y los cuales fueron confirmados por exámenes histopatológicos.

En un proyecto de Fondo SAG se comprobó que esta enfermedad esta ampliamente diseminada en el sur de Chile, dado que alrededor del 75% de los rebaños lecheros están infectados dicho por Kruze y Col. (2007).

Control y erradicación

En el ganado bovino, la infección comienza en animales muy jóvenes, pero los signos de enfermedad no aparecen hasta que el animal es adulto. Animales infectados pasan la infección a los recién nacidos través de la leche o las heces contaminada con *Map*. De ello se desprende que el saneamiento del rebaño y el manejo del estiércol son críticos para el control de la enfermedad de Johne. Los fundamentos del control son simples, pero a causa de características biológicas del organismo y la lenta aparición de cambios patológicos, un programa de limpieza del rebaño puede tomar 5 años o más (Collins, 2004).

La base del control de esta enfermedad es la correcta higiene, tratamiento y manejo de purines, chequeo y eliminación de animales infectados, sin embargo, con respecto a esto último, la baja sensibilidad de los métodos de laboratorio dificultan el diagnóstico, además no hay ningún método 100% seguro para detectar a todos los animales infectados, especialmente los jóvenes (Soto, 2002; Collins, 2010).

Debido a que los terneros recién nacidos son los susceptibles a la infección por *Map*, es importante mantenerlos lejos del estiércol de los adultos, manteniendo un sistema de crianza higiénico (agua y alimento libre de contaminación fecal). Los terneros deben nacer en un ambiente limpio y seco con contaminación fecal mínima. Deben ser criados por separados y alejarlos de las madres inmediatamente después del parto. Se deben alimentar hasta el destete con sustitutos lácteos pasteurizados considerados libres de paratuberculosis, si se alimentan con calostro debe ser de vacas ELISA negativo, lo cual debe recogerse en condiciones higiénicas para limitar la contaminación fecal, lo cual implica la preparación de los pezones (Rebhum, Chuck, 1995; Kruze, 2007).

El análisis de los animales mayores de 2 años y luego el sacrificio de las vacas positivas a ELISA es el inicio de un programa de control, cuando sea económicamente posible. En su defecto, tendrá que etiquetar, separar y no usar su calostro. Luego lo recomendable es hacer un cultivo de heces, el cual permite detectar los animales no reconocidos por la prueba anterior. Es recomendable chequear a todas las vacas al término de la lactancia de forma periódica y advertir al propietario de solo comprar animales negativos a la enfermedad (Radostits, 1999; Salgado, 2015).

Como ya se mencionó, una importante fuente de infección son los purines, que son usados usualmente como fertilizante del suelo agrícola, y debido a la gran resistencia del organismo a

diversas condiciones ambientales y a desinfectantes se debe evaluar un tratamiento que pudieran disminuir la tasa de sobrevivencia en el purín y en el ambiente (Burgos, 2011; Salgado, Collins, 2015).

Debido a las características epidemiológicas de la enfermedad, los programas de control de paratuberculosis son complejos, de alto costo y a largo plazo, y requieren de pruebas diagnósticas eficientes para detectar el mayor número posible de animales infectados. Si a estos aspectos se suma la falta de familiaridad de los productores con la enfermedad, la ausencia de programas de control y regulación de movimiento de animales, es posible esperar que la paratuberculosis continúe diseminándose (Kruze, 2007).

Potencial zoonótico

Ha habido controversias con que *Map* sea un potencial agente etiológico a la enfermedad de Crohn en humanos, la cual posee signos clínicos y patológicos muy similares a la paratuberculosis bovino (Magnano, 2009).

La leche contaminada con *Map* constituye el mayor riesgo como fuente de infección al humano, por lo tanto, la pasteurización disminuye significativamente la transmisión, sin embargo, el riesgo no se elimina totalmente ya que la estructura de la pared bacteriana, así como la capacidad de este agente de formar agrupaciones cuando se encuentra en suspensión y en alta concentración, le otorgan una mayor resistencia a procesos de descontaminación de alimentos, y en particular a la pasteurización de la leche. Esto traduce en la presencia de bacilos viables en productos lácteos comercializados al público, contribuyendo a un factor relevante en la epidemiología de la enfermedad de Crohn (Cirone, 2014).

Algunos estudios de países como Estados Unidos, Argentina, Reino Unido y República checa, se han centrado en detectar la presencia de *Map* viable en leche comercial pasteurizada y subproductos, donde se ha podido aislar por cultivo entre un 1,6 % a un 2,8 % de muestra positivas, demostrando que el patógeno es capaz de sobrevivir en ocasiones a la pasteurización, siendo un riesgo potencial para la Salud Pública (Gilardoni, Mundo, 2008; Cirone, 2007).

Map también puede transmitirse a través de la contaminación de las aguas superficiales, praderas, alimento o siembras fertilizadas con purines que no han recibido tratamiento eficiente previo (Salgado, Collins, 2015).

También se ha identificado *Map* en áreas intestinales afectada de pacientes enfermos mediante PCR, para identificar la frecuencia de inserción *IS900*, considerado un biomarcador específico de *Map*, sin embargo, hay estudios que no han logrado detectar la bacteria en personas enfermas y, por otro lado, también se ha detectado en individuos sanos. Debido a esto, aún faltan más antecedentes, pruebas diagnósticas eficientes y más estudios científicos para que la comunidad médica pueda establecer conclusiones si *M paratuberculosis* es zoonótica (Collins, 2015; Retamal, 2011; Naser, 2014).

Para la OIE No se ha demostrado claramente que la paratuberculosis sea una zoonosis. Sin embargo, se ha detectado ocasionalmente el agente causal de la enfermedad de John (*M. paratuberculosis*) en algunos pacientes con la enfermedad de Crohn. Esta es una afección

inflamatoria intestinal de los humanos, crónica y dolorosa, con diarreas, que se asemeja a la enfermedad de Johne.

A través de los productos animales como carne, derivados lácteos y agua contaminada se han producido graves problemas de salud pública por la transmisión del Map de los animales a los humanos y el potencial para infección subsecuente y quizás la enfermedad de Crohn, una patología del intestino, crónica y debilitante, es relacionada por algunos con el Map. Los estudios revelan que una simple asociación entre el Map y la enfermedad de Crohn, son divergentes e inconclusos. Ningún estudio ha promovido más allá de una asociación entre organismo y la enfermedad de Crohn, para enfocarlos en casualidad directa (Manning, Collins, 2001).

La enfermedad de Crohn produce una inflamación crónica en el intestino delgado con algunos signos y síntomas clínicos como pérdida de peso, dolor abdominal, diarrea o constipación, vómito y malestar general. La mayor incidencia se presenta en personas jóvenes. Aunque la causa de ésta enfermedad no está totalmente definida, se considera un desorden en la respuesta inmune a un estímulo del ambiente o del sistema inmune. (Fonkalsrud, 1995).

Estudios epidemiológicos muestran un crecimiento de la incidencia y prevalencia de la enfermedad de Crohn en las últimas décadas. Varias bacterias han sido implicadas como agentes etiológicos de la enfermedad de Crohn tales como: Klebsiella, Chlamydia, Eubacterium, Peptostreptococcus, Bacteroides fragilis, Listeria monocytogenes, Brucella abortus, Yersinia pseudoparatuberculosis, Yersinia enterocolitica y especies de Mycobacterium (Fonkalsrud, 1995).

La contaminación de la leche con el Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis se puede realizar a través de contaminación fecal o por producción directa de leche contaminada, también por animales asintomáticos. Diferentes estudios demuestran que el Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis podría estar frecuentemente presente en leche de vacas de granjas y en los estanques de recolección industrial. Ya que la mayoría de los productos lácteos y la leche en sí, son tratadas con calor antes de su consumo, es crucial la efectividad de la pasteurización de la leche para eliminar Map. Investigaciones recientes han demostrado la supervivencia del Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis bajo condiciones de pasteurización (Herman, 2006).

Ahora, si se agregaran las especies de *Mycobacterium* a la lista de patógenos microbianos transmitido por alimentos, las consecuencias económicas a las industrias afectadas serian profundas y de largo alcance. Ningún esfuerzo se ha hecho para estimar el impacto socioeconómico potencial de la enfermedad (Kennedy, Benedictus, 2001).

Objetivos

Objetivo general

Determinar la seroprevalencia de paratuberculosis en un predio de la comuna de Curacaví, Región metropolitana. Chile.

Objetivos específicos

Detectar anticuerpos contra *Mycobacterium avium* sub especie *Paratuberculosis* mediante la prueba serológica ELISA.

Determinar animales positivos a Paratuberculosis con signología clínica.

Materiales y métodos

Materiales

- Manga para sujeción

- Caja isotérmica

Ice Pack

- Tubos estériles tapa roja sin anticoagulante.

- Jeringas 5 ML

- Agujas 18g x 1 1/2

- Contenedor para material desechable y corto punzante.

- Guantes de procedimiento

- Alcohol desnaturalizado 96°

- Toalla de papel

Métodos

Se agruparon los animales seleccionados y se introdujeron a la manga de sujeción, se limpió la zona a utilizar con toalla de papel y luego se procedió a la desinfección del área con algodón y alcohol.

Se tomó una muestra sanguínea extraída de la vena coccígea con aguja de 5 ml la cual se depositó en tubo ensayo tapa roja sin anticoagulante estéril.

Se determinó la prevalencia de la Paratuberculosis presente en Curacaví, usando la siguiente fórmula epidemiológica.

Formula de prevalencia

P = Número de bovinos enfermos en un momento en el tiempo

X 100

Número total de animales en riesgos en ese momento en el tiempo

Análisis y presentación de resultados

Los resultados obtenidos se analizaron con estadística descriptiva y se presentaron mediante gráficos y tablas según corresponda.

Resultados

1 Grafico torta prevalencia

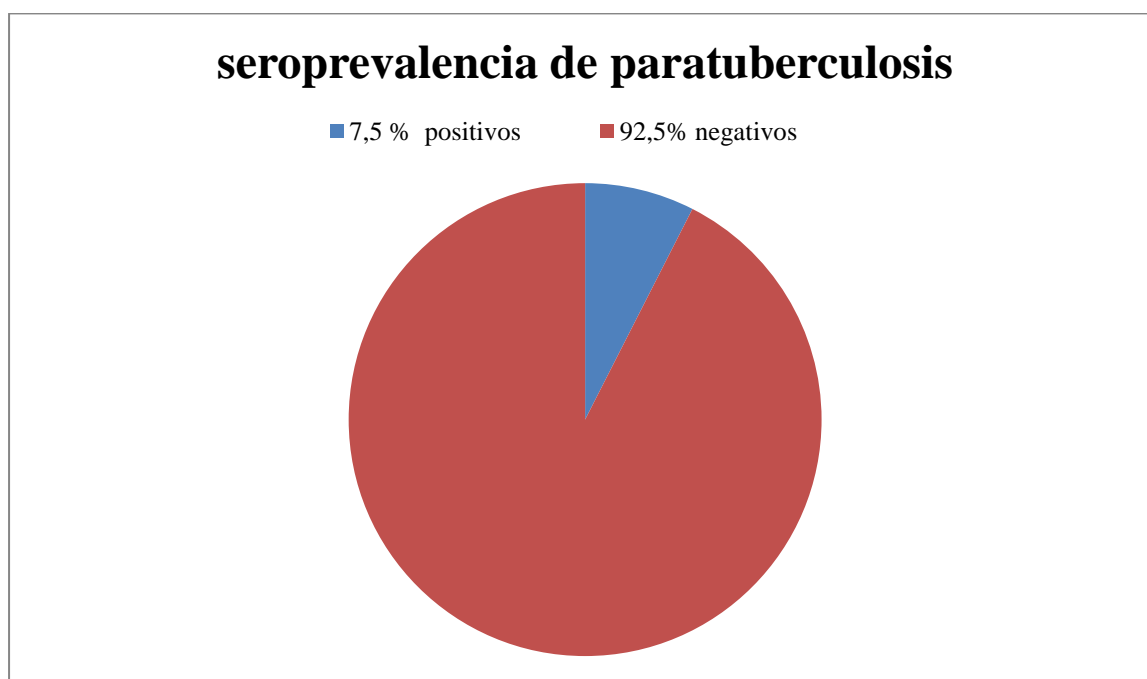
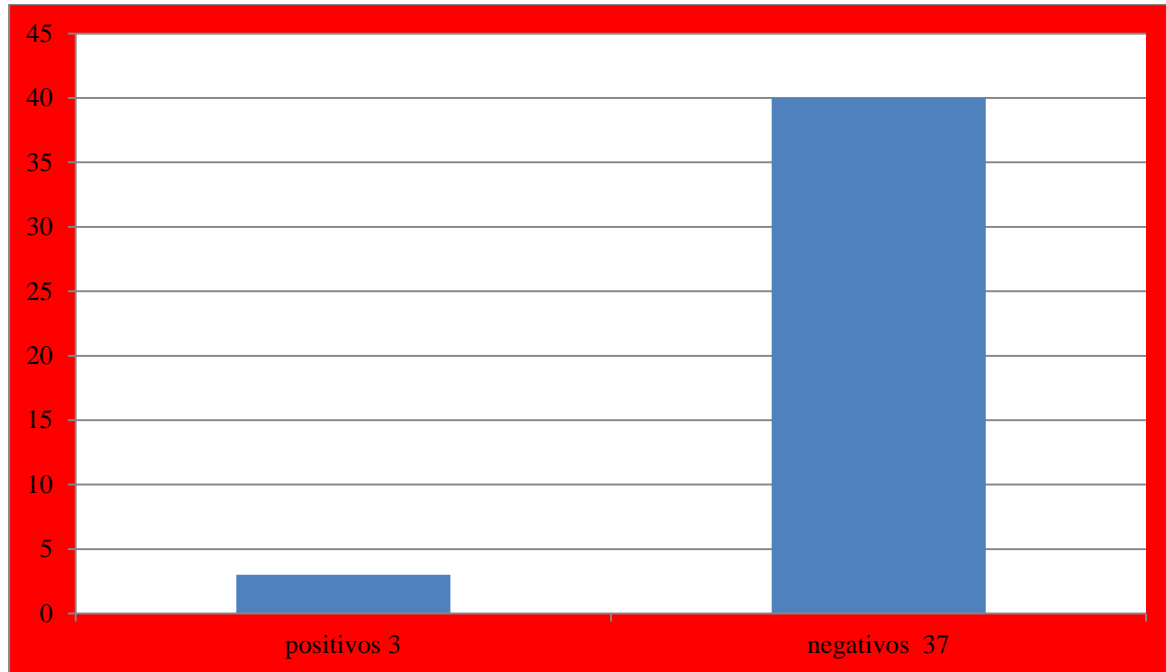


Gráfico de barra de prevalencia



Numero de animales positivos a la enfermedad mediante la técnica de ELISA.

Todos los animales están sin signología compatible con Paratuberculosis.

Discusión

Este resultado puede estar reflejado en la revisión bibliográfica, Whitlock y Buergelt (1999) señala 4 etapas de la enfermedad, donde en la primera etapa no hay signos clínicos pero los animales son eliminadores de *Map* por las fecas en bajas cantidades. Generalmente los animales entre 2 a 5 años post infección comienzan a presentar signos clínicos y aumentar la sensibilidad de las pruebas.

Por otra parte, el hecho de que hay un periodo de incubación largo que puede ser por más de 5 años, hace mucho más difícil identificación de más animales infectados, pero sin signos clínicos. En efecto otra parte de animales pudo haber estado en esta etapa silenciosa de la enfermedad.

Cabe señalar, que según la Norma Técnica del SAG (2011), la edad de muestreo a animales para detectar paratuberculosis en un rebaño, es a partir de los 6 meses.

Lo más importante entonces, es la prevención de la enfermedad y el control de ésta, llevando a cabo ciertos puntos, de acuerdo con Collins (1994), estas medidas básicas incluyen limpieza de las áreas de parto y separación del recién nacido de su madre lo antes posible, alimentación de las crías con calostro de hembras comprobadamente negativas a *Map*, uso de sustituto lácteo o leche pasteurizada, eliminación de animales comprobadamente infectados, manejo de los animales recién nacidos lejos del contacto con materia fecal de animales adultos, y evitar la contaminación de los alimentos con material fecal de animales adultos.

En consecuencia, es posible asumir que estos factores fueron las razones más probables que explicarían la perpetuación de la infección por todos estos años, en conjunto con la falta de una política de control y erradicación de la enfermedad

Esta infección origina elevadas pérdidas económicas y carece de tratamiento efectivo en la actualidad, todo ello nos lleva a considerar que la única forma de controlar la enfermedad es aplicar medidas de tipo preventivo, para lo que sería necesario conocer, en un principio, los niveles de incidencia y prevalencia en al menos el área geográfica mencionada en la investigación, para poder aplicar un programa sanitario. Sería, así mismo, preciso evaluar la viabilidad económica de las posibles medidas de control a emplear, y, por otro lado, sería interesante conocer la eficacia de las mismas.

Otras medidas de tipo preventivo radican en evitar factores de estrés y una buena alimentación, ello favorecerá la respuesta frente a la infección y disminuirá el porcentaje de animales que desarrollan la enfermedad. Parece demostrada la eficacia de una dieta equilibrada en minerales, vitaminas y con una relación Ca/P adecuada (Chiodini y col., 1984).

Al respecto, no existe duda alguna que la compra o introducción de animales infectados con *Map*, o con estado incierto de infección, es la principal vía de diseminación de *Map* entre los rebaños (Sweeney 1996, Kennedy y Benedictus 2001).

La prueba de ELISA utilizada en este estudio demostró ser eficaz en el diagnóstico de la Paratuberculosis bovina al detectar 3 (7,5%) animales reaccionantes positivos, sin embargo, Whitlock y col. (2000), quienes manifiestan que al utilizar simultáneamente, en rebaños infectados, el cultivo fecal y la prueba de ELISA para el diagnóstico de la Paratuberculosis bovina, generalmente el cultivo fecal detecta más del doble de animales positivos.

Esto demuestra la utilidad de las pruebas serológicas de ELISA para el diagnóstico de la enfermedad, ya que a pesar de no ser capaces de detectar a todos los animales infectados, entregan una imagen clara de la magnitud de la enfermedad en un rebaño. Podríamos pensar que al utilizar dos o más pruebas en forma simultánea para el diagnóstico de la Paratuberculosis bovina, es posible detectar una mayor cantidad de animales infectados de una sola vez, disminuyendo de esta forma el tiempo necesario para controlar y erradicar la enfermedad de un rebaño.

Los resultados obtenidos permiten concluir que mediante el uso de esta prueba es posible detectar un número de animales infectados, aumentando el tiempo para controlar y erradicar la enfermedad. Y así tener un impacto económico no tan grave.

Conclusiones

En este estudio, realizado en la comuna de Curacaví Región Metropolitana, se detectó la seroprevalencia de paratuberculosis en el predio estudiado fue de 7,5%.

Se detectaron anticuerpos en 3 bovinos.

No se determinó signología compatible con la enfermedad.

Bibliografía

- 1 Tratado de las enfermedades del ganado bovino ovino porcino caprino y equino, O.M Radostits, C.C.Gay , D.C.Blood, K.W.Hinchcliff.
- 2 Van Schaik G, M Pradeñas, A Mella, J Kruze. 2007. Diagnostic validity and costs of pooled fecal samples and individual blood or fecal samples to determine the cow- and herd- status ysfor *Mycobacterium avium* subsp. Paratuberculosis. *Prev Vet Med*
- 3 COLLINS, M. T., U. SPAHR, P. M. MURPHY. 2001. Ecological Characteristics of *M. paratuberculosis*. En: *Mycobacterium paratuberculosis*. FIL/IDF Bull. 362: 32-40.
- 4 BARROS, M, PRADO, R, GARCIA, J, LEYTON, G, SALAZAR, H, TUSCHNER, A, 2005. Tópicos de producción bovina. Primera Edición, Santiago, Chile, Fundación Chile, 120 p. Harris, N.;Barletta, R.2001.*Mycobacterium avium* subsp. Paratuberculosis in Veterinary Medicine. *Clinical Microbiology Reviews*. Vol 14 (3):489-512.
- 5 Clark, C. 1997 The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *J.Comp. Pathol*. Vol. (116):217-221.
- 6 Pradenas,M.; kruze,J.; Van Schaik, G.2008. “Sensibilidad del cultivo de pool fecal para detectar infección por *mycobacterium paratuberculosis* en rebaños de bovino de leche y su relación con la prueba de ELISA”.*Arch. Med.Vet*. vol.40 (1): 31-37.
- 7 Collins, M.; 2004.Update on Paratuberculosis: Control and zoonotic potential. *Irish Veterinary Journal*. Vol 57(1): 49-52.
- 8 Abalos, P.; Retamal ,P.2010. “Paratuberculosis”. *Enfermedades animales producidas por agentes biológicos*. Editorial Universia, Santiago, Chile. Pp:216-222.
- 9 Burgos, P.2011. Determinación del estatus infección por *Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis* mediante cultivo de muestras ambientales en rebaños lecheros de la Región

de los Lagos y su relación con la seroprevalencia predial. Memoria de Título. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.

10 Cirone K.; Morsella,C.; Romano, M.; Paolicchi, F. 2007. ; *Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis*. Presencia en los alimentos y su relación con la enfermedad de Crohn. Revista Argentina de Microbiología. Vol. 39(1):57-68.

11 Collins, M. 2003^a. "Paratuberculosis Review of present knowledge".acta veterinaria Scandinavica. Vol 44(3-4): 217-221.

12 Collins, M. 2003b. Update on paratuberculosis: Epidemiology of Johne's disease and biology of ; *Mycobacterium paratuberculosis*. Irish Veterinary Journal. Vol. 56 (11): 565-574.

13 Collin, M. 2015. Crohn's Disease and the Farm. International Research Symposium: Game-Changing Concepts in Crohn's Medicine. USA. <http://thecrohnsinfection.org/dr-collins-crohnsdisease-and-the-farm>.

14 Collins, M.;Eggleston, V.;Manning, E. 2010. Control exitoso de la enfermedad de Johne en nueve hatos lecheros: Los resultados de un ensayo de campo de seis años . J. Daris Sci. Vol. 93 (4): 1638-1643.

15 Giladoni, L. y Mundo, S. 2008.Paratuberculosis Bovina. Rev. Infovet Vol. 13. (102):11-14.

16 Harris, N.; Barletta, R. 2001. *Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis* in Veterinary Medicine. Clinical Microbiology Reviews. Vol 14(3):489-512.

17 Hermon, A.2015 MAP Diagnostics. International Research Symposium: Game-Changing Concepts in Crohn's Medicine. USA. <http://thecrohnsinfection.org/map-diagnostics-dr-amy-hermon-taylor>.

18 Jorge, M; Traversa, M.; Schettino,D.; Fresnada, K.;Iparraguirre, M. 2005.Epidemiología e importancia económica de la paratuberculosis bovina. http://www.produccionanimal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/

- 19 Kennedy, D. Y Benedictus, G. 2001. Mycobacterium Avium Subsp. bovinos_en_general/70paratuberculosis_bovina.pdf. Análisis de muestras paratuberculosis infection in agricultural species. Rev. Sci. Tech. Of.Int.Epiz.vol 20 (1). Pp:151-179.
- 20 Kruze, j., Salgado, m., Collins, M. 2007. Paratuberculosis en rebaños caprinos Chilenos. Arch. Med. Vol. 39 (3). Pp: 147-152.
- 21 Kuenstner, J.,Chamberlin. W., Naser S., Collins, M.,Ddow, C., Aitken, J.,Weg, S., Telega, G., Haas, D., Eckstein, T., Kail, M., Welch, C., Petrie, T. 2015.Resolution of Crohn's disease and complex regional pain síndrome following treatment of paratuberculosis. Word Journalof Gastroenterology. Vol 21(13): 4048-4062.
- 22 Magnano, G,; Macias, A.;Pérez,V.; Schnaider, M.;Bérgamo, E.;Giraudó, J.;subsp. Paratuberculosis en leche ultrapasteurizada para consumo humano. INVET Vol. 11(2): 93-97.
- 23 Manning,E,:Collins, M. 2010. "History of Paratuberculosis".Behr,M. y Collins, M.(eds) Paratuberculosis: organism, disease, control.USA. Editorial Cabi.Pp.1-8.
- 24 Naser, S., Sagramisingh, S.,Naser. 2014. Mycobacterium Avium Subspecies paratuberculosis Cuses Crohn's Disease in Some Inflammatory Bowel Disease Patients. World Journal of Gastroenterology Vol 20 (23): 7403-7415.
- 25 Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), 2011. Dsponible en: http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Media_Center/docs/pdf/Disease_cards/PARATUBERCULOSIS-ES.pdf

26 Servicio Agrícola Ganadero (SAG) 2011. Instructivo de norma técnica de clasificación sanitaria de rebaños en paratuberculosis bovina o enfermedad de Johne. Ministerio de Agricultura, Chile. <http://www.sag.cl>

Anexo 1

Tabla 1: Resultados de la prueba realizada

1	0,036	Negativo
2	0.028	Negativo
3	0.149	Negativo
4	0.089	Negativo
5	0.072	Negativo
6	0.028	Negativo
7	0.036	Negativo
8	0.052	Negativo
9	0.041	Negativo
10	0.056	Negativo
11	0.058	Negativo
12	0.044	Negativo
13	0.122	Negativo
14	0.043	Negativo
15	0.051	Negativo
16	0.09	Negativo
17	0.068	Negativo
18	0.131	Negativo
19	0.082	Negativo
20	0.039	Negativo
21	0.046	Negativo

22	0.072	Negativo
23	0.058	Negativo
24	0.043	Negativo
25	0.0190	Negativo
26	0.056	Negativo
27	0.223	Positivo
28	0.065	Negativo
29	0.054	Negativo
30	0.283	Positivo
31	0.057	Negativo
32	0.096	Negativo
33	0.117	Negativo
34	0.150	Negativo
35	0.11	Negativo
36	0.046	Negativo
37	0.066	Negativo
38	0.49	Positivo
39	0.066	Negativo
40	0.042	Negativo

Anexo 2

Análisis de las muestras

Se utilizó la técnica de ELISA para la detección de anticuerpos específicos de mycobacterium avium subsp.paratuberculosis, con el kit Parachek® , el cual es importado desde Estados Unidos.

Este Kit fabricado por la empresa Prionics USA,Inc. Utiliza la técnica de ELISA indirecto para la detección de anticuerpos frente a mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis (Map) en suero y leche.

La sensibilidad del Kit es de un 80% para los animales con sintomatología clínica de paratuberculosis y 60% en animales subclínicos. La especificidad llega a 99%.

El Kit Parachek® contiene:

- Placas antigenadas (Antígeno de M. paratuberculosis).
- Control positivos y negativos.
- Diluyente verde, el cual contiene M. Phlei.
- Solución de lavado – 100x concentrado (IgG antibovina marcada con peroxidasa).
- Diluyente azul: tampón de dilución de conjugado.
- Substrato.
- Solución de parada.
- Espectrofotómetro.

Protocolo laboratorio Cals

Las muestras fueron centrifugadas por 30 segundos para separar el suero del plasma.

Se tomó 25 μL de suero y fue diluido con 475 μL de diluyente verde. Se dejó reposar por 30 minutos.

Se tomaron 100 μL de la dilución y se añaden a las placas antigenadas, la cual posee los controles positivos y negativos. Se incubaron por 30 minutos a 22 °C. Luego los anticuerpos no específicos se eliminan mediante lavado.

Se preparó la solución con 100 μL de conjugado y 10 ml de diluyente azul. Se aplicaron 100 μL de esta solución a cada uno de los pocillos, se incubaron y luego se lavaron.

Se añadió sustrato. La velocidad de conversión del sustrato es proporcional a la cantidad de inmunoglobulinas presentes. Se agrega la solución de parada y el color se mide fotométricamente. Se leyó a una densidad de 450 nm y se utilizó 620 nm como longitud de onda de referencia.

Para interpretar los resultados se usó el software que viene con el Kit Parachek. Se usaron valores de Cut Off.

- Media cinética: media control negativo + 0,100
- Media punto final: media control negativo + 0,150

La muestra sería positiva si es que su valor de absorbancia es superior a los valores del Cut Off.