

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**



DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS DE *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* EN SUEROS DE BOVINOS DE 6 FINCAS DE LA COSTA SUR, POR MEDIO DE LA TÉCNICA ELISA

JACQUELINE MARIBEL GIL MORENO

Médica Veterinaria

GUATEMALA, NOVIEMBRE DE 2014

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE VETERINARIA**



**DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS DE *Mycobacterium avium*
subespecie *paratuberculosis* EN SUEROS DE BOVINOS DE 6
FINCAS DE LA COSTA SUR, POR MEDIO DE LA TÉCNICA ELISA**

TRABAJO DE GRADUACIÓN

PRESENTADO A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD

POR

JACQUELINE MARIBEL GIL MORENO

Al conferírsele el título profesional de

Médica Veterinaria

En el grado de Licenciado

GUATEMALA, NOVIEMBRE DE 2014

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
JUNTA DIRECTIVA**

DECANO:	M.Sc. Carlos Enrique Saavedra Vélez
SECRETARIA:	M.V. Blanca Josefina Zelaya de Romillo
VOCAL I:	Lic. Zoot. Sergio Amilcar Dávila Hidalgo
VOCAL II:	M.Sc. Dennis Sigfried Guerra Centeno
VOCAL III:	M.V. Carlos Alberto Sánchez Flamenco
VOCAL IV:	Br. Javier Augusto Castro Vásquez
VOCAL V:	Br. Juan René Cifuentes López

ASESORES

Dra. JACQUELINE ESCOBAR MUÑOZ
M.A. JAIME ROLANDO MÉNDEZ SOSA
M.V. JULIA VIRGINIA BOLAÑOS DE CORZO

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

En cumplimiento con lo establecido por los reglamentos y normas de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su consideración el trabajo de graduación titulado:

DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS DE *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* EN SUEROS DE BOVINOS DE 6 FINCAS DE LA COSTA SUR, POR MEDIO DE LA TÉCNICA ELISA

Que fuera aprobado por la Honorable Junta Directiva de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Como requisito previo para optar al título de:

MÉDICA VETERINARIA

ACTO QUE DEDICO A:

A DIOS
Y SANTÍSIMA
VIRGEN MARÍA:

Por estar presentes en cada instante de mi vida.

A MIS PADRES:

Carlos Enrique Gil y Patricia Moreno de Gil por su apoyo y esfuerzo que día con día me brindaron. Este logro también es de ustedes.

A MIS HERMANAS:

Roxana Gil Moreno y Yessyca Gil Moreno por el apoyo y cariño brindado.

A MIS SOBRINOS:

Alejandro, José Mauricio, Fátima, Pablo Andrés y Valery con mucho cariño.

A MIS ABUELOS:

Antonio Moreno (Q.E.P.D.) y Evangelina Marroquín (Q.E.P.D).

A MIS TIOS:

Gabriel Gil, Erica Moreno, Luis Moreno, Estuardo Moreno, Blanca Moreno con mucho cariño.

A MIS PRIMOS:

A todos con cariño y en especial a Nancy, Ivy, Kelly, Steve y Yesenia.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS Y
SANTÍSIMA
VIRGEN MARIA:

Por su infinita misericordia para conmigo y permitirme una vez más el regalo de la vida para poder culminar uno de los sueños más grandes de mi vida. Gracias Dios mío por guardarme como a la niña de tus ojos y esconderme bajo la sombra de tus alas. Salmo 17.8

A USAC Y FMVZ:

Por haber sido mi casa de estudios.

A MIS CATEDRÁTICOS:

Por el conocimiento compartido, especialmente al Dr. Manuel Rodríguez Zea y Dr. Jorge Orellana.

A MIS ASESORES:

Dra. Jacqueline Escobar, Dr. Jaime Méndez, Dra. Virginia de Corzo y Dr. Francisco Escobar por su apoyo y dedicación en la revisión de mi trabajo de investigación.

A MIS PADRINOS:

Dra. Evelin Godoy , Dra. María Eugenia Paz y Dr. Arturo Baca por todo el apoyo, guía y comprensión brindada para lograr este sueño.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. HIPÓTESIS	2
III. OBJETIVOS	3
3.1 Objetivo General	3
3.2 Objetivo Específico.....	3
IV. REVISIÓN DE LITERATURA	4
4.1 Enfermedad de Johne o Paratuberculosis	4
4.2 Período de incubación.....	5
4.3 Lesiones	5
4.4 Distribución geográfica.....	5
4.5 Especies afectadas	6
4.6 Epidemiología	6
4.7 Inmunopatología	8
4.8 Tratamiento	9
4.9 Impacto económico	9
4.10 Diagnóstico de Laboratorio	9
4.10.1 Pruebas bacteriológicas	10
4.10.1.1 Tinción de Ziehl Neelsen.....	10
4.10.2 Cultivo bacteriológico	10
4.10.3 Técnicas histopatológicas	11
4.10.4 Pruebas de inmunidad celular	11
4.10.5 Pruebas moleculares.....	11
4.10.6 Técnica de PCR	12
4.10.7 Pruebas serológicas.....	12
4.10.7.1 ELISA.....	12
4.11 Género <i>Mycobacterium</i>	13
4.12 Características generales de <i>Mycobacterium avium</i> subespecie <i>paratuberculosis</i>	14

4.13 Características de <i>Mycobacterium avium</i> subespecie <i>paratuberculosis</i> .	15
4.14 Metabolismo.....	15
4.15 Resistencia y persistencia.....	16
4.16 Vacunas.....	17
4.17 Salud Pública.....	17
4.18 Notificación ante las autoridades.....	18
4.19 Programa de control.....	18
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
5.1 Materiales.....	20
5.1.1 Área de estudio.....	20
5.1.2 Recursos humanos.....	20
5.1.3 Recursos biológicos.....	20
5.1.4 Recursos de laboratorio.....	20
5.2 Metodología.....	21
5.2.1 Diseño del estudio.....	21
5.2.2 Muestreo.....	21
5.2.3 Tamaño de la muestra.....	22
5.2.4 Tipo de muestra.....	22
5.2.5 Obtención de las muestra.....	22
5.2.6 Procedimiento de laboratorio	22
5.2.6.1 Preparación de los reactivos	22
5.2.6.1.1 Solución de lavado.....	22
5.2.6.1.2 Conjugado.....	22
5.2.6.2 Procesamiento de las muestras.....	23
5.2.7 Interpretación de resultados.....	24
5.2.7.1 Suero.....	24
5.2.8 Análisis de datos.....	24
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
VII. CONCLUSIÓN	26
VIII. RECOMENDACIONES.....	27

IX. RESUMEN	28
SUMMARY.....	29
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
XI. ANEXOS	33

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro No. 1

Resultados obtenidos del análisis para la determinación de anticuerpos contra *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* mediante la técnica de ELISA ..34

Cuadro No. 2

Estimación de proporciones.....34

Cuadro No. 3

Ficha de resultados de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* mediante la técnica ELISA de doscientos sueros de bovino35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No. 1

Presencia de anticuerpos contra *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* mediante la técnica de ELISA..... 40

I. INTRODUCCIÓN

Mycobacterium avium subespecie *paratuberculosis*, conocido también como MAP, produce la enfermedad denominada enfermedad de Johne en los bovinos, produciendo enteritis crónica, con síntomas como diarrea, pérdida de peso, disminución de la absorción de nutrientes, edema submandibular y desmejoramiento corporal progresivo que conduce eventualmente a la muerte del animal afectado. La paratuberculosis produce pérdidas económicas tales como la disminución en la producción de leche, bajas en la producción de terneros, incremento en los costos veterinarios y costos relacionados con el diagnóstico y medicamentos utilizados; así como la pérdida de valor económico y prestigio de los reproductores, ocasionando la pérdida de mercados nacionales e internacionales.

El ganado bovino enfermo con paratuberculosis puede excretar células viables en la materia fecal y contaminar el ambiente, de esta manera el microorganismo puede llegar hasta aguas superficiales u otras fuentes de agua de consumo humano, por lo que ésta representa un potencial vehículo de transmisión. Esta micobacteria es muy resistente a la purificación con cloro, a las bajas temperaturas y al incremento del pH, condiciones que podrían encontrarse en los sistemas de suministro de agua potable.

Actualmente en Guatemala no existen estudios que reflejen la prevalencia de paratuberculosis en las fincas ganaderas del país, por lo que este estudio contribuye a generar información sobre el estatus sanitario en seis fincas de la costa sur, alertando a las autoridades competentes para tomar las precauciones del caso y como corolario facilitar el comercio e importación de ganado a países libres de la enfermedad.

II. HIPÓTESIS

El 100% de los sueros de bovinos analizados por medio de la técnica ELISA no poseen anticuerpos contra *Mycobacterium avium* subespecie paratuberculosis.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

- Generar información sobre la presencia de anticuerpos contra *Mycobacterium avium* subespecie paratuberculosis en fincas de la Costa Sur de Guatemala.

3.2 Objetivo Específico

- Determinar la presencia de anticuerpos contra *Mycobacterium avium* subespecie paratuberculosis, mediante la técnica ELISA en sueros de ganado bovino de 6 fincas de la Costa Sur de Guatemala.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Enfermedad de Johne o Paratuberculosis

Al observar en un hato bovino, animales con diarrea intermitente, pérdida de peso, edema submandibular y desmejoramiento del estado corporal, existen razones para pensar que la paratuberculosis puede ser la causa.

La observación de casos clínicos de paratuberculosis en las diferentes etapas productivas (parto) o estacionales (déficit de alimento), representan la parte visible del problema, ya que habrá una proporción mayor del hato infectado que son portadores subclínicos de la enfermedad. La paratuberculosis se caracteriza macroscópicamente por una enteritis crónica que produce diarrea y resulta en un proceso de caquexia y desmejoramiento progresivo de mala absorción y pobre conversión alimenticia, que conduce a la muerte del animal enfermo. En un hato infectado, puede clasificarse a los animales en cuatro estados:

Estado 1: No infectados (sanos)

Estado 2: Infectados no identificados por las técnicas diagnósticas (falsos negativos)

Estado 3: Infectados asintomáticos

Estado 4: infectados y clínicamente enfermos (10)

La enfermedad se presenta en animales adultos o vaquillonas de primer o segundo servicio, después del parto, así como en ovinos adultos mayores de 12 meses. En venados se presenta en animales adultos, así como en animales jóvenes de 12 a 15 meses de edad, con alta susceptibilidad a la infección y un grado de expresión de la enfermedad muy repentino. (10)

4.2 Período de incubación

Se han informado períodos entre 4 meses a 15 años. Los terneros generalmente se infectan poco después del nacimiento pero rara vez muestran signos clínicos antes de los 2 años de edad (11).

4.3 Lesiones

A la necropsia los casos graves se evidencian por la caquexia, atrofia serosa y edema. Las lesiones específicas se localizan en las porciones terminales del intestino delgado, donde se observa la mucosa engrosada y arrugada. Histológicamente las lesiones son las de una inflamación granulomatosa que se localiza fundamentalmente en zonas de tejido linfoide organizado intestinal (placas de Peyer, válvula iliocecal y linfonódulos adyacentes). (10)

La carga de micobacterias presentes en las lesiones también dependen de la forma inmunopatológica y oscila desde la presencia masiva de los bacilos hasta la más extrema escasez. (10)

La localización más constante de las lesiones paratuberculosas, es la válvula iliocecal y los ganglios linfáticos yeyunales caudales. Algunas veces se observan lesiones asociadas a paratuberculosis como calcificación del endotelio de válvulas cardíacas y arteria aorta en su salida del corazón. (10)

4.4 Distribución geográfica

La paratuberculosis se encuentra en muchos países del mundo. De acuerdo a la literatura, Suecia y algunos estados de Australia están libres de ésta enfermedad. (9)

4.5 Especies afectadas

La paratuberculosis afecta a rumiantes domésticos y silvestres, entre ellos: ganado bovino, ovino y caprino, y entre silvestres llamas, alpacas, camellos, búfalos, ciervos y renos. Se ha aislado *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* de especies no rumiantes como: conejos, gatos, zorros, comadreas, tejón europeo, osos, mapaches, armadillos, zarigüeyas, ratones de la madera. Se ha informado de la enfermedad en conejos silvestres, primates y cerdos. Los caballos y los perros se pueden infectar de forma experimental. (8,9)

4.6 Epidemiología

La paratuberculosis es una de las enfermedades infecciosas más frecuentes del ganado lechero y de carne. La enfermedad clínica causa pérdidas económicas en la industria láctea y cárnica. Los animales portadores subclínicos en el hato eliminan intermitentemente *Mycobacterium paratuberculosis* lo que ocasiona la contaminación del suelo y un porcentaje de animales termina manifestando la enfermedad. (6)

La infección ocurre principalmente en animales jóvenes, mediante vía oral-fecal, aunque también se ha demostrado la vía intrauterina. La probabilidad de infección disminuye a medida que la edad progresa, siendo los adultos menos susceptibles, aunque no exentos de contagio, dependiendo de la carga bacteriana a la que estén expuestos. (6)

Existen algunos factores que aumentan el riesgo de propagar y transmitir la paratuberculosis en un establecimiento, como la introducción de nuevos animales, sitio de reunión habitual de los mismos, densidad poblacional alta, falta de remoción de materia fecal y lavado deficiente de las ubres previo al parto. (2)

Esta enfermedad es de progreso lento, requiriendo un considerable número de años desde que se instala en el hato hasta que se observan animales con signos. En corrales cerrados con infección existe un incremento constante en el porcentaje de animales infectados con *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*, mientras que en corrales abiertos sanos se corre el riesgo de incorporar animales infectados si no se realiza el diagnóstico previo. (2)

Esta bacteria es resistente a condiciones medioambientales adversas y su supervivencia en un establecimiento con animales enfermos podría estimarse entre 10 y 12 meses en materia fecal o agua estancada. Existe alta probabilidad de encontrar tasas mayores de seroprevalencia de la enfermedad en hatos bovinos que pastorean en áreas con suelos arcillosos-arenosos y arcillosos, donde la filtración de agua es alta y el pH es bajo. Estas micobacterias sobreviven mejor en ambientes ácidos, por lo que en suelos con estas condiciones, tienen ventajas competitivas con otros microorganismos. (2)

En cuanto a ovejas y cabras la mayor prevalencia de paratuberculosis estaría asociada a establecimientos con suelos de bajo pH y menor retención de agua.

La deficiencia de cobre (primaria y secundaria) y selenio podría afectar negativamente al sistema inmunológico de los bovinos, así como la capacidad de respuesta a la infección con *Mycobacterium paratuberculosis* predisponiéndolos al desarrollo de la enfermedad. (2)

La incidencia parece aumentar a nivel mundial. Las infecciones son más comunes en ganado bovino lechero. Cerca del 20 a 50% de los hatos están infectados en muchos países productores de lácteos. El porcentaje de mortalidad es aproximadamente del 1% en la mayoría de los hatos y hasta 50% de los animales pueden infectarse sin presentar síntomas, provocando pérdidas en la

producción. Al aparecer los síntomas, la paratuberculosis es progresiva y los animales afectados finalmente mueren. (3) Existe limitada evidencia epidemiológica de la transmisión natural desde la fauna silvestre al ganado bovino y viceversa. Los conejos pueden servir como reservorios, debido al alto índice de excreción de organismos en las heces. (3)

4.7 Inmunopatología

El ingreso de *Mycobacterium paratuberculosis* es mediante la vía oral y la principal localización es en el tejido linfoide del intestino delgado. Las bacterias penetran por las células epiteliales de las células de las placas de Peyer, son transferidas por macrófagos a las zonas interfoliculares, desarrollando granulomas localizados o difusos en el resto de la mucosa adyacente. (10)

Esto último condiciona la manifestación de lesiones, los niveles de anticuerpos y la respuesta inmune celular en ciertas formas patológicas como las focales, multifocales, difusas multibacteriales, difusas linfocíticas y difusas intermedias, estando las tres últimas asociadas a manifestaciones clínicas. (10)

Mycobacterium paratuberculosis está adaptado a sobrevivir en el hospedador a pesar de las reacciones inmunes adversas en contra de este, ya que una vez que infecta a los macrófagos interfiere en su interior con la maduración del fagosoma evadiendo la primera línea de defensa del mismo contra patógenos bacterianos.

Los tipos de células del sistema inmune involucradas en la respuesta del hospedador, las citoquinas que las comunican y los factores genéticos del mismo que controlan la infección son los elementos a caracterizar para comprender mejor la patogenia de la enfermedad. Después de la infección con *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* la primera respuesta es de tipo celular y con el

tiempo los animales infectados establecen una respuesta humoral con desarrollo de altos títulos de anticuerpos. (10)

4.8 Tratamiento

No existe tratamiento satisfactorio para la paratuberculosis, quedando como único recurso la confirmación con un diagnóstico rápido y la eliminación del animal.

En teoría algunas combinaciones de antibióticos podrían ser exitosas, sin embargo se necesitaría de un tratamiento a largo plazo y probablemente no económico. *Mycobacterium avium* es susceptible a pocas drogas relativamente y la posibilidad de recuperación completa es baja. (2,3)

4.9 Impacto económico

La enfermedad clínica incluye pérdidas por disminución de la producción de carne y leche, costos de diagnóstico y tratamiento, eliminación y muerte de animales, menor pago por canal por baja de peso y mala absorción. Animales con infección subclínica producen un 6% menos de leche. (4)

Se produce un aumento de la susceptibilidad a otras enfermedades infecciosas (estimando entre 4 a 7 veces mayor el desarrollo de mastitis respecto de las no infectadas). Disminución de la fertilidad, con incremento del intervalo entre partos. (2)

4.10 Diagnóstico de laboratorio

Se disponen de métodos básicos y técnicas de biología molecular como:

- Pruebas bacteriológicas, por tinción de Ziehl Neelsen y cultivo de la muestra clínica en medios específicos.
- Pruebas de inmunidad celular, por detección de gamma interferón en plasma.
- Pruebas moleculares, por PCR y epidemiología molecular
- Técnicas histopatológicas.
- Medición de la inmunidad humoral o pruebas serológicas por detección de anticuerpos humorales por ELISA o inmunodifusión (IDA).

4.10.1 Pruebas bacteriológicas

4.10.1.1 Tinción de Ziehl Neelsen

La tinción de improntas realizadas a partir de tejidos afectados con lesiones macroscópicas, es de utilidad en casos de paratuberculosis ya que las micobacterias son claramente visibles dentro de los macrófagos residentes en la lesión. Solamente se considera positivo cuando se observan bacilos fuertemente coloreados y agrupados en nidos que contienen entre 10 y 20 células bacterianas. (10)

4.10.2 Cultivo bacteriológico

El diagnóstico denominado “Gold Standard” (prueba de oro), es el aislamiento de *Mycobacterium paratuberculosis* a partir de muestras de materia fecal, leche, semen o tejidos afectados. El cultivo de la bacteria es difícil, ya que conlleva un desarrollo entre 30 y 120 días. Las colonias blanquecinas puntiformes, crecimiento lento, y dependencia a la micobactina “J” usada como cofactor de crecimiento exclusivo en *M. paratuberculosis* en medios de cultivo sólido como el Herrold, son indicadores de su presencia. Otros medios de cultivo utilizados son el Lowenstein-Jensen, Middlebrook sólido o líquido enriquecidos o el de Watson-Reid. Aunque el cultivo es de importancia, no se han estandarizado los métodos

utilizados mundialmente y los laboratorios varían según su capacidad para la detección de *Mycobacterium paratuberculosis*. (10)

4.10.3 Técnicas histopatológicas

Con tinciones de rutina como la hematoxilina y eosina se observa una enteritis granulomatosa de variable intensidad ubicada en las últimas porciones del intestino delgado, en las primeras del intestino grueso, linfonódulos y linfáticos adyacentes. La tinción con Ziehl Neelsen es de mucha utilidad en tejidos. Como técnica de mayor sensibilidad confirmatoria en la inmunohistoquímica con antisueros anti *Mycobacterium paratuberculosis* es altamente recomendable. (10)

4.10.4 Pruebas de inmunidad celular

Detección del gamma interferón, es una prueba que detecta infección temprana ya que identifica una citoquina liberada por los linfocitos en el plasma sanguíneo, luego de incubarlos con el antígeno específico. Esta prueba es útil en bovinos jóvenes recientemente infectados y que aún no han desarrollado anticuerpos séricos dependientes de linfocitos B. La identificación de un animal positivo no es sencilla, ya que debe realizarse el diagnóstico paralelamente con la tuberculosis, diferenciando ambas respuestas en la misma prueba. (10)

4.10.5 Pruebas moleculares

Mycobacterium paratuberculosis constituye un grupo homogéneo de micobacterias que no son posibles diferenciar claramente por métodos bioquímicos, serológicos u otras técnicas convencionales. Un análisis de la diversidad molecular de las cepas de *Mycobacterium paratuberculosis* aisladas de diversos animales y humanos ayuda a establecer el grado de heterogenicidad en cepas aisladas en una variedad de hospedadores susceptibles a esta

micobacteria. Cepas compartidas entre diferentes hospedadores (bovinos, venados, ovinos, humanos) reflejarían un alto grado de transmisión entre especies. (10)

4.10.6 Técnica de PCR

Métodos basados en PCR (reacción en cadena de la polimerasa) permiten identificar y caracterizar *Mycobacterium paratuberculosis* aislados de diferentes hospedadores, aun sin la necesidad de observar las colonias desarrolladas en el cultivo. Utilizando como blanco los *primers* al IS900, permite una rápida detección de pocas bacterias presentes en diferentes muestras clínicas como material fecal, sangre, leche, tejidos y biopsias. A pesar de su especificidad, no permite diferenciar entre aislamientos de *Mycobacterium paratuberculosis*. (10)

4.10.7 Pruebas serológicas

Se aplican en bovinos adultos desde los 3 años de edad. La certeza del diagnóstico serológico se presenta cuando el animal manifiesta signos clínicos como diarrea y edema submandibular. ELISA es la prueba más utilizada en el mundo con una especificidad cerca del 90% y una sensibilidad del 55 al 65%, aumentando con los casos clínicos hasta más del 90%. En la detección de paratuberculosis en ovinos con ELISA e IDA son valiosos, ambos detectan diferentes subpoblaciones de ovejas infectadas, observándose una mayor sensibilidad con ELISA (98.2 - 99.5 % de especificidad y 35 -54 % sensibilidad). (10)

4.10.7.1 ELISA

Hasta el momento es la prueba más sensible y específica para los ensayos de anticuerpos séricos con *Mycobacterium paratuberculosis* en ganado bovino. (5)

ELISA (Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas), fue desarrollado en 1960. Esta prueba consiste en unir anticuerpos a enzimas, las cuales conservan la capacidad de catalizar una reacción que genera un producto final visualmente detectable mientras permanece unida a los anticuerpos. Los sitios de unión de los anticuerpos permanecen libres para reaccionar con su antígeno específico. La utilización de las enzimas como marcadores presentan las siguientes ventajas:

- La enzima no se altera durante la actividad, puede catalizar la reacción de muchas moléculas de sustrato, lo que amplifica en gran medida la reacción y mejora la detección.
- Los anticuerpos conjugados con la enzima son estables y pueden almacenarse durante un tiempo relativamente largo.
- La información de un producto final coloreado permite la observación directa de la reacción o la lectura espectrofotométrica automatizada. (2)

4.11 Género Mycobacterium

Mycobacterium se clasificó dentro de la familia Mycobacteriaceae, orden Actinomycetales, clase Actinomycetes. Basándose en dos características presentes en todos los miembros de este género, como son: Morfología y resistencia ácido-alcohol. (2)

Algunas ocasiones las micobacterias presentan un crecimiento filamentosos o pseudodomicelias y aunque no forman estructuras de tipo fúngico (esporas, conidias, cápsulas, hifas), este género es llamado así, debido al aspecto fungoide de las colonias de *Mycobacterium tuberculosis*. (2)

4.12 Características generales de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*

La Paratuberculosis o Enfermedad de Johne es producida por una bacteria denominada *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (Map), observado por primera vez por H. A. Johne y L. Frothingham en el año de 1895. (2)

En la primera descripción de paratuberculosis, el agente fue caracterizado como una micobacteria de tipo aviar, seguidamente, debido a las particularidades de la afección se consideró como una enteritis pseudotuberculosa bovina, diferenciada de la de tipo aviar y designada como *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis* (Twort y cols. 1912). Más tarde el microorganismo recibió la denominación de *Mycobacterium paratuberculosis* (Bergey y cols. 1923) y *M. johnei* (Francis 1943), nombres que actualmente son utilizados. (1)

La identificación de la bacteria es dificultosa y el desacuerdo a la hora de determinar si *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* es una especie independiente de *Mycobacterium avium* o no, produjo una gran polémica en torno a su nomenclatura y situación taxonómica. Las características fenotípicas de la bacteria hicieron que fuese contemplada como un agente diferente de la micobacteria aviar durante largo tiempo, hasta que la alta homología genética detectada entre estas dos y las llamadas micobacterias de la paloma torcaz (Saxegaard y cols. 1988), reabrió el debate al sugerir que se trataba de la misma especie. (1)

Los resultados de este estudio concluyen en la recomendación de clasificar a los tres agentes como subespecies diferentes dentro del mismo complejo. Finalmente en el año de 1990, Thorel y cols. propusieron la taxonomía oficialmente aceptada en la actualidad, apoyándose en los estudios previos de

caracterización genética y fenotípica y en su arduo trabajo de taxonomía numérica. (1)

4.13 Características de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*

Son bacilos rectos o ligeramente curvos de 1 a 10 micrómetros de largo y de 0.2 a 0.6 micrómetros de ancho, aerobios, de lento crecimiento, inmóviles y Gram positivos debido a la presencia de una envoltura compleja la cual esta provista de ácidos micólicos, que le dan la característica de resistencia a esta técnica. (Gram). (4)

La envoltura está constituida por:

- Cápsula: cuya síntesis parece estar controlada por mecanismos reguladores dependientes del huésped en micobacterias patógenas.
- La pared celular: formada por la unión covalente entre peptidoglicano, arabinogalactano y los ácidos micólicos.
- La membrana citoplasmática: cuya composición es similar a la de otras bacterias. El lipoarabinomano es un fosfolípido unido a la membrana que atraviesa toda la envoltura celular y cuya composición difiere entre las distintas especies micobacterianas.

Las características del desarrollo diferencial entre cepas de *Mycobacterium paratuberculosis* aisladas con relativa facilidad de los bovinos de aquellas aisladas con mayor dificultad de los ovinos, ha hecho que se consideren dos posibles variantes de *Mycobacterium paratuberculosis*, la variedad bovina y ovina. (10)

4.14 Metabolismo

Las micobacterias son microorganismos aerobios o microaerófilos, quimiorgatofos y su temperatura óptima de crecimiento se sitúa entre 30 y 45 °C.

Utilizan glicerol o piruvato como fuente de carbono y energía, como fuente de nitrógeno pueden utilizar asparagina, glutamato y amonio. Son prototofas para todos los aminoácidos, purinas, pirimidinas y vitaminas del complejo B. Producen exoquelina y micobactina, dos sideróforos necesarios para metabolizar el hierro. (10)

Son aisladas en medios de cultivo sólidos con base de huevo como (Herrold, Löwenstein-Jensen, Stonebrink, Petragnani, Coletsos, Ogawakudoh), o con base sintética. Pueden también crecer en medios líquidos como: Middlebrook 7H9, Watson-Reid, Dubos, Sula, Sauton, o Proskauer-Beck. Dependiendo de la especie a cultivar pueden suplementarse los medios con micobactina, hemina, ácido oleico, albúmina, dextrosa, catalasa u otras sustancias. (10)

4.15 Resistencia y persistencia

Posee una compleja pared celular que hace que *Mycobacterium avium* subespecie *Paratuberculosis* sea una bacteria muy resistente a condiciones adversas. Puede sobrevivir en agua de estanque esterilizada de 9 meses y 163 días en agua de río, en agua con corriente con pH no neutro hasta 14 meses y en agua destilada hasta 15 meses, reduciéndose la concentración inicial en 1 Log¹⁰ cada 68.5 días. La supervivencia en heces puede llegar hasta los 246 días, en purines hasta 287 días y entre 21 y 28 días durante la digestión anaeróbica de purines, aunque supuestamente la mezcla de heces y orina produce un efecto bactericida. Permanece 55 semanas en ambientes secos y sombríos, y 48 semanas en agua de presa no expuesta a la luz solar. Pueden recuperarse células viables después de largos periodos de congelación y es capaz de sobrevivir e incluso replicarse en el interior de protistas ambientales. Además su resistencia le permite soportar tratamiento de esterilización aplicados a leche y agua destinada al consumo humano. (2)

Parece ser sensible a la luz solar, altas temperaturas, desecación, elevada concentración de calcio. Puede ser inactivado mediante desinfectantes en suspensión acuosa como el amonio (3%), formol (5%), compuestos cresólicos (1:32), fenol (1:40), bicloruro de mercurio (1:1000), hipoclorito cálcico (1:50), cloro, cianamida cálcica o etanol. El efecto de estas sustancias es menor en heces secas, aunque puede incrementarse si se combinan con detergentes. (2)

4.16 Vacunas

Los tipos de vacunas a utilizar pueden ser vivas, atenuadas, liofilizadas, vivas atenuadas a las que se les incorpora un adyuvante como aceite añadido en la reconstitución y bacterinas muertas por tratamiento térmico. La vacunación puede provocar una reacción en el área de la inyección, así también puede interferir con programas de erradicación basados en las pruebas inmunológicas y en la eliminación de los animales identificados como infectados o sensibilizados con *Mycobacterium paratuberculosis*. (5,8)

Productos de diagnóstico: La PPD johnina es una preparación de los productos del crecimiento y de la lisis de *Mycobacterium paratuberculosis* tratados por el calor. La tuberculina PPD aviar es una preparación de productos del crecimiento y lisis de *Mycobacterium paratuberculosis* D4ER o TB 56 tratados por el calor. Estas dos preparaciones se utilizan mediante inyección intradérmica, para revelar la hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) como una medida de identificación de los animales infectados o sensibilizados con *Mycobacterium paratuberculosis*. (5)

4.17 Salud pública

Las vacunas contra paratuberculosis, administradas accidentalmente en hu-

manos, pueden causar reacciones locales graves como desprendimiento de tejidos, sinovitis crónica y tendinitis, algunos casos podrían requerir cirugía.

Información limitada sugiere que *Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis* podría estar relacionado con la enfermedad de Crohn o enteritis crónica de los humanos, caracterizada por periodos de malestar, dolor abdominal, pérdida de peso y diarrea crónica con remisiones y recaídas. Una de las vías de ingreso importante, sería a través de la ingestión de leche. La supervivencia de *Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis* en leche pasteurizada puede atribuirse a sus características fenotípicas, la resistencia al tratamiento de pasteurización estaría influenciada por su tendencia a agruparse formando verdaderos nidos, que contienen más de 10,000 micobacterias, en donde el centro de este agrupamiento las bacterias estarían protegidas y requerirían otras alternativas para su pasteurización, logrando que una proporción de ellas sobreviva. (1,11)

4.18 Notificación ante las autoridades

A la sospecha de la enfermedad, debe notificarse a la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, por sus siglas en francés). Médicos Veterinarios que detecten la enfermedad deben seguir las pautas nacionales o locales para la notificación y las pruebas de diagnóstico correspondientes. (11)

4.19 Programa de control

El control de *Mycobacterium paratuberculosis* toma tiempo y requiere de cambios en el manejo para minimizar la probabilidad de infección de terneros y detectar los adultos infectados. La vacunación no es recomendable y su uso es restringido en algunos países, algunas evidencias sugieren que en ovinos es

ventajoso, ya que disminuye el riesgo de contraer la enfermedad y también la excreción de micobacterias en materia fecal. (10)

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales

5.1.1 Área de estudio

Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

5.1.2 Recursos humanos

- Estudiante investigadora
- Asesores profesionales de los departamentos de Microbiología y Salud Pública

5.1.3 Recursos biológicos

- Suero de bovino

5.1.4 Recursos de laboratorio

Kit para la detección de Anticuerpos frente a *Mycobacterium avium* spp. *Paratuberculosis* (MAP). Pourquier ELISA Paratuberculosis Screening:

- Microplacas tapizadas con antígeno MAP
- Solución de lavado concentrada
- Solución tampón de dilución 12
- Solución tampón de dilución 1
- Control positivo
- Control negativo
- Conjugado anti-rumiante peroxidasa HRPO concentrado

- Substrato TMB 9
- Solución de frenado 3
- Micropipetas
- Pipetas volumétricas
- Puntas de micropipetas
- Canoas
- Probetas
- Agua destilada
- Lector de microplacas
- Timer
- Papel aluminio
- Papel mayordomo
- Computadora con software
- Cámara fotográfica
- Hojas de papel

5.2 Metodología

5.2.1 Diseño del estudio

Descriptivo de corte transversal.

5.2.2 Muestreo

Muestreo por conveniencia de acuerdo a:

- Bovinos mayores de 3 años.

5.2.3 Tamaño de la muestra

Se procesaron 200 muestras de suero de bovino.

5.2.4. Tipo de muestra

Suero de Bovino.

5.2.5 Obtención de la muestra

Las muestras analizadas fueron obtenidas a partir de sueros de bovinos adultos provenientes de 6 fincas ganaderas de la Costa Sur de Guatemala.

5.2.6 Procedimiento de laboratorio

5.2.6.1 Preparación de los reactivos

5.2.6.1.1 Solución de lavado

La solución de lavado concentrada (20x) se diluyó 1/20 con agua destilada antes de ser usada (por ejemplo 15 mililitros de Solución de Lavado concentrada (20x) en 285 mililitros de agua destilada). Esta solución se conoce como Solución de Lavado.

5.2.6.1.2 Conjugado

-Se diluyó el Conjugado anti-rumiante peroxidasa HRPO concentrado con la Solución Tampón de Dilución 1.

-Se diluyó 1/100 con la solución tampón de dilución 1.

5.2.6.2 Procesamiento de las muestras

1. Controles: Se diluyeron los controles positivo y negativo 1/20 con la solución tampón de dilución 12. (Predilución).
2. Muestras de suero: Se diluyeron las muestras de suero 1/20 con la solución tampón de dilución 12. (Predilución).
3. Se homogenizó el contenido de los pocillos.
4. Fueron incubados entre 15 min y 2 horas a temperatura ambiente (18-26°C).
5. Se dispensaron 100 microlitros de cada pocillo de la microplaca para predilución en los pocillos de la microplaca tapizada.
6. El contenido de los pocillos se homogenizó con el agitador de microplaca.
7. Se cubrió la microplaca (papel aluminio, etc) e incubó 45 min. (más o menos 5 minutos) a temperatura ambiente (18-26 °C).
8. Cada pocillo fue lavado con aproximadamente 300 microlitros de solución de lavado 3 veces. Se aspiraron los contenidos líquidos de todos los pocillos después de cada lavado. Tras la aspiración final, se eliminó el líquido de lavado residual de cada microplaca golpeándola firmemente sobre el material absorbente. (Evitar que las microplacas se sequen entre los lavados y antes de añadir el reactivo siguiente).
9. Se dispensaron 100 microlitros de conjugado anti-rumiante peroxidasa HRPO diluido en cada pocillo.
10. Se cubrió la microplaca (papel de aluminio, etc) e incubó 30 minutos (más o menos 3 minutos) a temperatura ambiente (18 – 26 °C).
11. Se repitió el paso no. 8
12. Se dispensaron 100 microlitros de substrato TMB 9 en cada pocillo.
13. Se incubaron 10 minutos (más o menos 3 minutos) a temperatura ambiente (18-26 °C) protegidos por la luz.
14. Se dispensaron 100 microlitros de solución de frenado 3 por pocillo. Se agitaron suavemente para homogenizar el contenido de los pocillos. Se secó la base de la microplaca.

15. Se calibró el lector en blanco con aire.
16. Se leyeron las densidades ópticas a 450 nm (OD 450).

5.2.7 Interpretación de resultados

5.2.7.1 Suero

- Muestras con porcentaje M/P inferior o igual de 45% se consideraron Negativas a la presencia de anticuerpos frente a MAP.
- Muestras con porcentaje M/P superior al 45% e inferior a 55% se consideraron Sospechosas.
- Muestras con un porcentaje M/P superior o igual al 55% se consideraron Positivas a la presencia de anticuerpos frente a MAP.

5.2.8 Análisis de datos

Se realizó por medio del uso de estadísticas descriptivas mediante la estimación de reactores positivos, sospechosos y negativos a la prueba de ELISA, estimando proporciones.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el cuadro No. 1, se presentan los resultados obtenidos de 200 muestras serológicas de bovinos procedentes de 6 fincas de la Costa Sur de Guatemala. Del total de las muestras, el 3.5% (n=7) de los sueros dieron resultados positivos a anticuerpos de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*, mediante la técnica de ELISA, el 8% (n=16) de los sueros dieron resultados sospechosos a la enfermedad y el 88.5% (n=177) de los sueros dieron resultados negativos.

La Finca No. 3 presentó 3 muestras positivas (8.82%) de un total de 34 muestras analizadas, de igual forma la finca No. 6.

La Finca No. 3 presenta el mayor número de casos sospechosos (n=6), siendo el 17.64% de un total 34 muestras analizadas.

Es importante el hallazgo de anticuerpos contra *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* debido a que representa un gran impacto económico, a los productores de ganado ya que puede reducir la venta y exportación de animales a nivel de la región centroamericana, con lo que podrán así, tomar mejores medidas de prevención y control.

Sin embargo, aunque se tienen resultados positivos y sospechosos a *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* es probable que los animales no manifiesten ningún síntoma debido al largo período de incubación o que solamente sean portadores de ella, por lo que la técnica de ELISA es una herramienta que brindó información sobre los bovinos que presentan anticuerpos contra *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*.

Los resultados encontrados refutan la hipótesis planteada en virtud de que se encontró 3.5% positivos a la enfermedad.

VII. CONCLUSIÓN

Se determinó la presencia de anticuerpos contra *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* mediante la técnica de ELISA en sueros de ganado bovino procedentes de 6 fincas de la Costa Sur.

VIII. RECOMENDACIONES

- El personal que realiza el manejo de los animales positivos deberá tomar medidas preventivas para evitar el contagio de la enfermedad, ya que aún no se ha establecido claramente si la enfermedad está relacionada con la enfermedad de Crohn en los humanos.
- En estudios siguientes se recomienda realizar el aislamiento de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* mediante cultivo bacteriológico, o realizar la técnica de PCR a los animales seropositivos de los hatos para la determinación y evitar la transmisión a los animales jóvenes.
- Realizar estudios mediante la técnica de ELISA en fincas de ganado bovino lechero a los ejemplares que presenten síntomas tales como diarrea para determinar la presencia de anticuerpos contra MAP.

IX. RESUMEN

La enfermedad de Johne, también conocida como MAP afecta a los bovinos, su agente etiológico es *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*, produciendo signos como diarrea, pérdida de peso, disminución de la absorción de nutrientes, edema submandibular y desmejoramiento corporal progresivo que conduce eventualmente a la muerte del animal afectado. Produciendo pérdidas económicas a los productores tales como: disminución de la producción de carne y leche, costos de diagnóstico y tratamiento, eliminación y muerte de animales, menor pago por canal por baja de peso y mala absorción. Se han informado períodos de incubación desde 4 meses a 15 años. Los terneros generalmente se infectan poco después del nacimiento pero rara vez muestran signos clínicos antes de los 2 años de edad.

No existe tratamiento efectivo para la paratuberculosis, quedando como único recurso la confirmación con un diagnóstico rápido y la eliminación del animal. Información limitada sugiere que *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* podría estar relacionado con la enfermedad de Crohn o enteritis crónica de los humanos, caracterizada por periodos de malestar, dolor abdominal, pérdida de peso y diarrea crónica con remisiones y recaídas.

En éste estudio para determinar la presencia de la enfermedad se utilizaron 200 muestras de suero sanguíneo procedentes de 6 fincas de la Costa Sur de Guatemala, mediante la técnica de ELISA, obteniendo 7 (3.5%) resultados positivos, 16 (7%) resultados sospechosos y 177 (88.5%) resultados negativos.

SUMMARY

Johne's disease, also known as MAP affects cattle, the causative agent is *Mycobacterium avium* subespecie paratuberculosis, producing signs such as diarrhea, weight loss, decreased nutrient absorption, submandibular edema and progressive body deterioration that leads eventually to the death of the affected animal. Causing economic losses to producers such as decreased production of meat and milk, costs of diagnosis and treatment, removal and death of animals, lower payment per channel for weight loss and malabsorption. Have been reported incubation periods from 4 months to 15 years. The calves are usually infected shortly after birth but rarely show clinical signs before 2 years of age.

There is no effective treatment for paratuberculosis, leaving as the only resource confirmation prompt diagnosis and removal of the animal. Limited information suggests that *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis might be related to Crohn's disease or chronic enteritis in humans, characterized by periods of malaise, abdominal pain, weight loss and chronic diarrhea with remissions and relapses.

In this study to determine the presence of disease 200 serum samples from six farms in the South Coast of Guatemala, by ELISA, to obtain 7 (3.5%) positive results, 16 (7%) suspicious results were used and 177 (88.5%) negative results.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abalos, P. 2001. Actualidad en paratuberculosis (en línea). Departamento de Medicina Preventiva Animal. Universidad de Chile. Consultado 2 oct. 2012. Disponible en <http://www.ovinos-caprinos.com.ar/SANIDAD/Actualidad%20en%20Paratuberculosis.pdf>
2. Agirregomoscorta, I. 2007. Caracterización molecular, detección y resistencia de *Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis*. Tesis doctoral en Biología. Universidad del país Vasco. Disponible en www.nasdap.ejgv.euskadi.net/r50public2/eu/contenidos/informe_estudio/tesis_doctorales/eu_agripesc/adjunto/tesis_doctoral59.pdf
3. Anaya, J; Cañas, C; Cervera, R; Correa, P. 2005. Autoinmunidad y Enfermedad Autoinmune (en línea). Medellín, Colombia. p 536. Consultado 3 oct. 2012. Disponible en <http://books.google.com.gt/books?id=EIEEeKKXzCC&printsec=frontcover&dq=+Autoinmunidad+y+Enfermedad+Autoimmun&source=bl&ots=5rG90Y2bg&sig=bQZoEIlwkGDW3Ut7iD5uZBqS9c&hl=es&sa=X&ei=Eu10ULDaF5PS9ATv6IGQBg&ved=0CC4Q6AEwAA#v=onepage&q=%20Autoinmunidad%20y%20Enfermedad%20Autoimmune&f=false>
4. Castellanos, E. 2010. Caracterización molecular de aislados de *Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis*. Mapa epidemiológico en España (en línea). Tesis doctoral. Madrid. España. Universidad Complutense de Madrid. 361 p. Consultado 2 oct. 2012. Disponible en <http://eprints.ucm.es/11626/1/T32337.pdf>
5. Forbes, A; Sahm, D; Weissfeld, A. 2009. Bailey & Scott. Diagnóstico Microbiológico (en línea). Trad. Rondinone S. 12 ed. Argentina. Médica

Panamericana. p 154-156. Consultado 3 oct. 2012. Disponible en <http://books.google.com.gt/books?id=239cauKqSt0C&printsec=frontcover&dq=bailey+%26+scott.+diagn%C3%B3stico+microbiol%C3%B3gico+descargar&source=bl&ots=2OfElg5BKg&sig=8EJKOGzG1F3s3mNOAatTZW553Uc&hl=es&sa=X&ei=qex0UNa1PIn89gSv94DwDA&ved=0CDAQ6AEwAQ#v=onepage&q&f=false>

6. Gilardoni. Mundo, SL. 2008. Paratuberculosis Bovina (en línea). Buenos Aires. AR. Universidad de Buenos aires UBACyT. Consultado 2 oct. 2012. Disponible en http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_en_general/88-infovet_102.pdf
7. Magnano, CG. et al. 2009. Investigación de *Mycobacterium subespecie paratuberculosis* en leche pasteurizada para consumo (en línea). Consultado 04 oct. 2012. Disponible en <http://www.scielo.org.ar/pdf/invet/v11n2/v11n2a03.pdf>
8. OIE (Organización Internacional de Espizootias FR). 2008. Paratuberculosis. Manual de la OIE sobre animales terrestres (en línea). 17 p. Consultado 2 oct. 2012. Disponible en http://web.oie.int/esp/normes/mmanua/pdf_es_2008/2.01.11.%20Paratuberculosis.pdf
9. Spickler, A. Roth, J. Galyon, J. Lofstedt, J. Lenardón, M. 2010. Enfermedades Emergentes y Exóticas de los Animales (en línea). Iowa State University. USA. p 234-237. Consultado 2 oct. 2012. Disponible en <http://books.google.com.gt/books?id=s!R6wsyeT4l&pg=PA234&lpg=PA234&dq=mycobacterium=es&sa=X&ei=130kUI26IY7m8gS54YEG&ved=0CC0Q6AEwAA#v=onepage&q=mycobacterium%20avium%20subespecie%20paratuberculosis&f=false>

10. Stanchi, NO; etal. 2007. Microbiología Veterinaria. Buenos Aires, AR. Editorial Inter-Médica S.A.I.C.I. 572 p.

11. The Center for Food Security & Public Health. 2010. Paratuberculosis. Enfermedad de Johne (en línea). Iowa. USA. Consultado 2 oct. 2012. Disponible en [http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/paratuberculosis .pdf](http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/paratuberculosis.pdf)

XI. ANEXOS

CUADRO No. 1

Resultados obtenidos del análisis para la determinación de anticuerpos contra *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* mediante la técnica de ELISA.

NÚMERO DE FINCA	RESULTADOS A LA TÉCNICA DE ELISA			TOTAL MUESTRAS POR FINCA
	Positivos	Sospechosos	Negativos	
1	0	1	32	33
2	0	1	32	33
3	3	6	25	34
4	0	1	32	33
5	1	3	29	33
6	3	4	27	34
TOTAL	7	16	177	200

CUADRO No. 2

Estimación de proporciones

RESULTADOS	PROPORCIONES
Positivos	3.5 %
Sospechosos	8 %
Negativos	88.5 %
Total	100 %

CUADRO No. 3

FICHA DE RESULTADOS DE *Mycobacterium avium* subespecie
paratuberculosis MEDIANTE LA TÉCNICA ELISA DE DOSCIENTOS SUEROS
 DE BOVINO

NÚMERO DE FINCA	RESULTADOS			TOTAL MUESTRAS POR FINCA
	Positivos	Sospechosos	Negativos	
1			X	1
			X	2
			X	3
			X	4
			X	5
			X	6
			X	7
			X	8
			X	9
			X	10
			X	11
			X	12
			X	13
			X	14
			X	15
			X	16
			X	17
			X	18
			X	19
			X	20
		X		21
			X	22
			X	23
			X	24
			X	25
			X	26
			X	27
			X	28
			X	29
			X	30
			X	31

			X	32	
			X	33	
2			X	34	
			X	35	
			X	36	
			X	37	
			X	38	
			X	39	
			X	40	
			X	41	
			X	42	
			X	43	
			X	44	
			X	45	
			X	46	
			X	47	
			X	48	
			X	49	
			X	50	
			X	51	
			X	52	
			X	53	
			X	54	
			X	55	
			X	56	
			X	57	
			X	58	
			X	59	
			X	60	
			X	61	
			X	62	
		X			63
				X	64
				X	65
				X	66
			X	67	
			X	68	
			X	69	
			X	70	
			X	71	
			X	72	
			X	73	
			X	74	

3		X		75
			X	76
			X	77
		X		78
			X	79
		X		80
			X	81
			X	82
	X			83
			X	84
		X		85
			X	86
	X			87
		X		88
			X	89
			X	90
			X	91
			X	92
			X	93
	X		X	94
			X	95
		X		96
			X	97
			X	98
			X	99
			X	100
4			X	101
			X	102
			X	103
			X	104
			X	105
			X	106
			X	107
			X	108
			X	109
			X	110
			X	111
			X	112
		X		113
			X	114
			X	115
			X	116
			X	117

		X	118
		X	119
		X	120
		X	121
		X	122
		X	123
		X	124
		X	125
		X	126
		X	127
		X	128
		X	129
		X	130
		X	131
		X	132
		X	133
		X	134
		X	135
		X	136
		X	137
		X	138
	X		139
		X	140
		X	141
		X	142
		X	143
		X	144
		X	145
		X	146
X		X	147
		X	148
		X	149
		X	150
	X		151
		X	152
		X	153
		X	154
		X	155
		X	156
		X	157
		X	158
		X	159
	X		160

5

			X	161
			X	162
			X	163
			X	164
			X	165
			X	166
	X			167
			X	168
			X	169
			X	170
			X	171
			X	172
		X		173
			X	174
			X	175
			X	176
			X	177
			X	178
		X		179
			X	180
			X	181
			X	182
			X	183
			X	184
			X	184
	X		X	186
		X		187
			X	188
			X	189
			X	190
			X	191
			X	192
			X	193
		X		194
			X	195
			X	196
			X	197
	X			198
			X	199
			X	200

FIGURA No. 1

