

Artículo de investigación

ELISA indirecto para el diagnóstico de paratuberculosis en bovinos de tambo utilizando pooles de muestras de leche

Indirect ELISA for the diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle using pools of milk samples

Pedro Sebastián Sosa^{1,2*}; María Fiorella Alvarado Pinedo²; Gabriel Eduardo Travería²¹Doctorando, Universidad Nacional de La Plata (UNLP), Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV).²Centro de Diagnóstico e Investigaciones Veterinarias (CEDIVE, Chascomús), FCV, UNLP. Calle Alvear N°803 esquina Salta. Chascomús (7130). Buenos Aires, Argentina.

e-mail: pedrososa041@gmail.com

(Recibido: 17 de marzo 2021; aceptado: 22 de julio 2021)

RESUMEN

Se procesaron pooles de leche mediante un ELISA indirecto para el diagnóstico de paratuberculosis bovina. Los objetivos fueron establecer las características operativas de un ELISA indirecto en leche, determinar el tamaño de pool a utilizar, calcular la prevalencia aparente mediante pooles y evaluar los costos operativos de su aplicación. Se procesaron 167 muestras de leche en forma individual y posteriormente en 42 pooles totales (41 pooles de 4 y 1 pool de 3 muestras), 11 de los cuales resultaron positivos al ELISA. El punto de corte estimado maximizando sensibilidad y especificidad fue del 60% de positividad para el ELISA en pooles y del 70% para el ELISA individual. Siendo para un mismo punto de corte del 70% la sensibilidad 76,92% y 45,45%, la especificidad 92,21% y 93,55% en el ELISA individual y en pooles respectivamente. La prevalencia aparente obtenida por aislamiento en materia fecal fue de 7,80%, la calculada a partir de la implementación de pooles de leche fue de 7,31%. El uso de los pooles permitió reducir en un 75% el número de pruebas; las determinaciones realizadas fueron un 52,7% respecto al total (88, pooles + repeticiones) lo cual nos permitiría ahorrar 47,3% del costo operativo. Esta alternativa de procesamiento reduciría el número de determinaciones, costos y sería útil en el saneamiento o conocimiento del estatus epidemiológico del establecimiento lechero bajo estudio.

Palabras clave: ELISAI en leche; Paratuberculosis; pool de muestras de leche

ABSTRACT

Milk pools were processed using an indirect ELISA for the diagnosis of bovine paratuberculosis. The objectives were to establish the operational characteristics of an indirect ELISA in milk, determine the pool size to be used, calculate the apparent prevalence using pools and evaluate the operational costs of its application. A total of 167 milk samples were processed individually and subsequently in 42 total pools (41 pools of 4 and 1 pool of 3 samples), 11 of which were positive by ELISA. The estimated cut-off point maximizing sensitivity and specificity was 60% positivity for the ELISA in pools and 70% for the individual ELISA. For the same cut-off point of 70%, the sensitivity was 76.92% and 45.45%, and the specificity 92.21% and 93.55% for the individual and pool ELISA, respectively. The apparent prevalence obtained from isolation in fecal material was 7.80%, the one calculated from the implementation of pools was 7.31%. The use of milk pools allowed a 75% reduction in the number of tests, the determinations performed were 52.7% of the total (88, pools + repetitions), which would allow us to save 47.3% of the operating cost. This processing alternative would reduce the number of determinations, costs and would be useful in the sanitation or knowledge of the epidemiological status of the dairy under study.

Keywords: ELISAI in milk; Paratuberculosis; milk sample pooling

INTRODUCCIÓN

La paratuberculosis (PTBC) es una enfermedad entérica infecciosa crónica, su agente etiológico es *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*). Afecta a rumiantes y cérvidos. En bovinos produce una ileocolitis granulomatosa difusa, los signos clínicos incluyen diarreas, edemas en zonas declives, caquexia y muerte, a nivel productivo pérdida de peso y disminución

en la producción láctea^{1,2}. Con un período de incubación de dos a ocho años, la categoría más susceptible a la infección con *Map* son los terneros menores de un año de edad. Su principal vía de transmisión es fecal-oral, aunque también está descripta la vía vertical y la diseminación a través del calostro y leche^{3,4}.

En Argentina la PTBC se encuentra ampliamente distribuida. En rodeos lecheros de la cuenca del Salado, provincia de Buenos Aires, se estimó una seroprevalencia

predial del 81% e individual entre 5 y 15,7%⁵. El grupo del CEDIVE-Chascomús estimó en rodeos lecheros una seroprevalencia predial de 78,8% e individual de 13%⁶.

Por su fácil obtención y características diagnósticas, las muestras de leche son cada vez más utilizadas para detectar la presencia de anticuerpos (Ac) contra *Map*. Si bien la concentración de los Ac presenta modificaciones a lo largo de la lactancia^{7,8}, se ha demostrado en estudios previos una correlación positiva entre el ELISA indirecto (ELISAI) en suero sanguíneo (ELISAI-S) y el ELISA indirecto en leche (ELISAI-L) para el diagnóstico de PTBC⁹ con un índice kappa de 0,695 ($p = 0,017$)^{7,9,10}. Como antecedentes en el uso de pooles en serologías podemos mencionar su aplicación en patologías como SIDA¹¹, *Chlamydia trachomatis*, hepatitis B, y virus de papiloma, en humanos¹². Pooles de leche y suero sanguíneo se han aplicado en el diagnóstico de diversas enfermedades en bovinos como lo son leucosis enzoótica bovina¹³, diarrea viral bovina¹⁴ y *Salmonella dublin*¹⁵. Originalmente para el diagnóstico de PTBC el uso de pooles fue aplicado al cultivo de materia fecal¹⁶, también se ha empleado en ELISAI-L^{17,15}, ELISAI-S¹⁸, ELISA en leche de tanque¹⁹⁻²¹ y en pruebas moleculares (PCR y qPCR)^{18,20,21}. Si bien existen publicaciones en las que mediante ELISAI en pooles de suero sanguíneo se han obtenido altas tasas de resultados falsos positivos¹⁸, la implementación de pooles tiene como finalidad disminuir el número de determinaciones y costos^{22,23}, manteniendo las características operativas de la prueba dentro de rangos aceptables, siendo útil tanto para el establecimiento de estatus epidemiológico de la enfermedad en el tambo, como para su saneamiento.

Los objetivos de este trabajo fueron establecer las características operativas de un ELISA indirecto, "in house" para el diagnóstico de *Map* en pooles de leche (ELISAip-L), determinar el número adecuado de muestras de leche individuales por pool, calcular la prevalencia aparente mediante pooles, evaluar los costos operativos y su potencial reducción.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó con un total de 167 muestras de materia fecal y leche individuales de hembras bovinas de raza Holando Argentino en lactancia, pertenecientes a un tambo que presenta la enfermedad de forma endémica, con estimaciones previas de prevalencia aparente del 6% y real del 7%²⁸, ubicado en el partido de Chascomús provincia de Buenos Aires, Argentina (35°45'27" Sur/ 58°03'20" Oeste). Los procedimientos realizados en estos animales fueron aprobados por CICUAL, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, protocolo: 83-4-18T.

Muestras de materia fecal, análisis microbiológico y molecular.

Las muestras de materia fecal se tomaron con bolsas de polietileno en forma individual desde el recto. Se descontaminaron 2 gramos de materia fecal por el método de la doble incubación, con cloruro de hexadecyl pyridinium (Sigma Aldrich®, Darmstadt, Alemania) al 0,75% y una mezcla de antibióticos compuesta por vancomicina, ácido nalidíxico y nistatina²⁴ y luego se inoculó en medio líquido M7H9 (BD®, Sparks, USA) suplementado con yema de huevo y micobactina J^{25,26} (Allied Monitor®, Fayette, USA). Estos cultivos se observaron semanalmente mediante tinción de Ziehl Neelsen, durante un período no menor a 2 meses, se consideraron positivos aquellos cultivos en los

que se encontraron bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) en forma de ovillos o nidos. Para darle identidad a los aislamientos se repicaron en medio de Herrold suplementado con micobactina J (Allied Monitor®, Fayette, USA) a fin de evitar la yema de huevo como inhibidor de la PCR, se realizó extracción por ebullición/ congelación y PCR punto final, tomando como diana el segmento de inserción *IS900*. Los primers utilizados fueron: (F) 5'-GATCGGAACGTCGGCTGGTCAGG-3'; (R) 5'-GATCGCCTTGCTCATCGCTGCCG-3'²⁷; la DNA Polimerasa BIOLINE® (Londres, Reino Unido) y el termociclador Evo MPI M02® (La Plata, Argentina).

Muestras y serología

Las muestras de leche fueron obtenidas de los cuatro cuartos mamarios en un volumen final de 50 mL por vaca. Se centrifugaron a 2500 rpm 30 minutos, para usar la fase acuosa. Se establecieron los parámetros de esta prueba, utilizando como referencia el ELISA Guidebook, de acuerdo con el método de "tablero de ajedrez"²⁹. Se fijaron las siguientes diluciones de 1:10 para las muestras, 1:960 para el Ag y 1:5000 para el conjugado. Se ejecutó el protocolo de ELISA utilizado por Alvarado Pinedo y col.⁶, pero con las diluciones de trabajo previamente mencionadas; primero en forma individual (ELISAI-L) y luego en pooles, de esta manera se conocía de antemano que pool contenía un individuo ELISAI-L positivo. Como control positivo (C+) se utilizó leche proveniente de un individuo con resultado positivo al test de ELISA en suero y aislamiento fecal de *Map*. Para el cálculo del porcentaje de positividad (p%) a partir de la densidad óptica (D.O) se utilizó la siguiente fórmula: $[(D.O \text{ de la muestra} - D.O \text{ del control negativo}) / (D.O \text{ del control positivo} - D.O \text{ del control negativo})] * 100$. Se consideraron positivas las muestras con un porcentaje de positividad superior al 70%.

Análisis estadístico

Luego de la obtención de los p% mediante ELISAI-L y ELISAip-L, se calcularon las características operativas de ambos ELISAs, utilizando software R Core Team versión 4.0.2 (2020-06-22)³⁰, paquete pROC³¹. Se tomaron como casos (1) los cultivos positivos y como controles (0) los cultivos negativos; para la alternativa en pooles se tomó como caso el pool que contenía como mínimo un individuo con cultivo positivo. El punto de corte del ELISAI-L y del ELISAip-L se calculó mediante la función "coords" la cual tiene como argumento el índice de Youden³². El número de muestras por pool se determinó utilizando la siguiente fórmula extraída de Williams¹²: $P_1 = 1 - (1 - P_0)^{1/S_1}$, siendo P_1 la probabilidad de pooles que teóricamente resultarían positivos (pool prevalencia), P_0 la prevalencia en muestras individuales (0,078) y S_1 número de muestras por pool. Se realizaron los cálculos para 2, 3, 4, y 5 muestras por pool (S_1) y se seleccionó aquel tamaño de pool que permitiría procesar la menor cantidad de muestras. Determinado el tamaño del pool, se calculó la cantidad de pooles dividiendo el total de muestras por S_1 . Se conformaron pooles de manera aleatoria, utilizando Microsoft Excel (Microsoft office® profesional plus 2019), mediante las funciones "aleatorio", "jerarquía" y "buscar". Para la conformación de los pooles se utilizó 100 µL de cada muestra individual. La prevalencia aparente a través de los pooles (P), se estimó con la fórmula: $P = 1 - (1 - X/M)^{1/S_1}$, donde X es el número de pooles positivos, M pooles testeados y S_1 es el número de muestras por pool³³.

RESULTADOS

De 167 muestras de materia fecal analizadas mediante cultivo, 13 resultaron BAAR positivas y 154 sin desarrollo, las cuales fueron consideradas como negativas o no detectables mediante el cultivo, al menos durante este muestreo, teniendo en cuenta que la eliminación de *Map* podría ser intermitente en individuos subclínicos. Todos los aislamientos fueron confirmados mediante PCR *IS900*.

En las 167 muestras de leche procesadas mediante ELISAI-L individual resultaron 25 positivas y 142 negativas; para el ELISAip-L de 42 pooles (**M**), 11 dieron positivos (**X**) y 31 negativos. El análisis ROC arrojó un AUC de 89% con un IC 95% (78,51%-99,96%) y una potencia de 0,99 para el ELISAI-L individual, y un AUC de 83% con un IC 95% (65,75%-100%) y una potencia de 0,95 para el ELISAip-L. Mediante el estadístico DeLong test no se observaron diferencias significativas entre ambas AUC ($p=0,53$).

Para un mismo punto de corte de 70% en el ELISAI-L individual la sensibilidad (Se) fue de 76,92% con IC 95%

(54-100%) y la especificidad (Sp) 92,21% con IC 95% (88-97%) y en el ELISAip-L la Se fue de 45,45% con IC 95% (18-73%) y la Sp 93,55% con un IC 95% (84-100%). Para el ELISAip-L maximizando Se y Sp el punto de corte obtenido fue del 60%, siendo para el mismo la Se 81,81% con IC 95% (54-100%) y Sp 87,10% con IC 95% (74-96%).

Se seleccionó el tamaño de pool de 4 muestras individuales que permitiría procesar el menor número de determinaciones (Tabla 1). La prevalencia aparente calculada a través de aislamientos de *Map* fue de 7,8%; la obtenida a partir de la implementación de pooles de 4 muestras mediante la fórmula: $P = 1 - (1 - X/M)^{1/S}$ fue de 7,31%. Con el uso de ELISAip-L inicialmente se permite reducir el número de pruebas en un 75%, es decir de 167 muestras individuales totales se procesan solo 42 pooles. En total las determinaciones serían 88 entre pooles y repeticiones individuales de los pooles positivos, lo que equivale al 52,69% de 167 muestras. Teniendo en cuenta que el ELISAI tiene un costo de aproximado de 2.45 USD (Cotización obtenida a partir del valor del dólar estadounidense, en el Banco Central de la República Argentina (BCRA) y el precio de lista unitario del ELISA

Tabla 1. Cálculo para conocer el total de muestras a procesar (pool + repeticiones) en base a la prevalencia (P_0) y número de muestras por pool (S_1) y la pool prevalencia (P_1).

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

PTBC en el laboratorio CEDIVE-FCV-UNLP, equivalente a \$224 argentinos a la fecha: 25/02/2021) procesar el 52,69% de las muestras, nos permitiría ahorrar 47,3% del costo (193.57 USD) (Tabla 2).

DISCUSIÓN

Los niveles de AUC obtenidos para ambos ELISAs están por encima del 80%, siendo clasificados como test con buena capacidad diagnóstica³⁴, si bien la propuesta de este trabajo sería realizar en primer término el ELISAip-L y posteriormente ELISAI-L, ambas curvas ROC no difieren significativamente entre sí ($p=0,53$) evidenciando que el ELISAI-L y ELISAip-L tienen potencial para el diagnóstico de PTBC.

La Sp calculada para el ELISAI-L es similar a las descriptas en Tiwari y col.³⁵ y en la revisión realizada Slana y col.³⁶, nuestro trabajo no incluyó un establecimiento seronegativo a PTBC, por lo cual probablemente la especificidad se encuentre sesgada.

Mathevon y col.¹⁸ desestimaron el uso del ELISA PTBC en pooles de suero, debido a la obtención de una alta tasa de falsos positivos; la leche como matriz diagnóstica tiene como ventaja sobre el suero poder agruparse

con menor probabilidad de obtener resultados falsos positivos, su concentración de anticuerpos es entre 50 a 100 veces menor que la del mismo³⁷, lo que se traduce en una amplitud de D.O mayor entre resultados ELISAs positivos y negativos.

La prevalencia individual influye en la sensibilidad del ELISA en leche para *Map*¹⁷, Lavers y col. evidenciaron al utilizar pooles de leche que la sensibilidad disminuye cuando también lo hace la prevalencia, por el contrario, y en coincidencia con nuestro estudio la especificidad se mantuvo alta en general. Para el punto de corte de 70% la Se estimada utilizando ELISAip-L fue menor que en el ELISAI-L individual, en cuanto a los valores de Sp fueron similares para ambas alternativas.

Se calculó el número de muestras por pool en base a la prevalencia (P_0), al número de individuos y se seleccionó el tamaño de 4 muestras, el cual permitiría el mayor ahorro y la menor cantidad de determinaciones totales, en futuros trabajos se podrían incluir en el cálculo puntos de corte alternativos que maximicen la Se y Sp con el fin de ajustar en base a estos parámetros el tamaño de pool, disminuyendo la probabilidad de resultados falsos negativos, tal como fue realizado por Mathevon y col.¹⁸ y Lavers y col.¹⁷

Tabla 2. Variación en el costo y en el ahorro aproximado en la implementación de ELISAip-L según el número de muestras a procesar, la prevalencia obtenida en función de la sisa del pool y de la prevalencia individual. (Ejemplo hipotético de 100 muestras individuales. Costo unitario 2,45 dólares*).

S_1	P_0	Muestras Totales	N	P	Costo pool (USD)	Ahorro	Ahorro (USD)
2	5%	60	100	4,9%	147,0	40%	98,0
	8%	65	100	7,7%	159,3	35%	85,8
	15%	78	100	13,9%	190,5	22,25%	54,5
	20%	86	100	18,0%	210,7	14%	34,3
	30%	101	100	25,5%	247,5	-1%	-2,5
3	5%	48	100	4,7%	116,6	52,41%	128,4
	8%	55	100	7,4%	135,9	44,54%	109,1
	15%	72	100	12,9%	176,2	28,08%	68,8
	20%	82	100	16,3%	201,2	17,87%	43,8
	30%	99	100	21,9%	242,6	1%	2,4
4	5%	44	100	4,6%	106,7	56,45%	138,3
	8%	53	100	7,1%	130,7	46,64%	114,3
	15%	73	100	12,0%	178,3	27,21%	66,7
	20%	84	100	14,8%	205,9	15,96%	39,1
	30%	101	100	19,0%	247,4	0,99%	-2,4
5	5%	43	100	4,5%	104,4	57,38%	140,6
	8%	54	100	6,8%	132,5	45,91%	112,5
	15%	76	100	11,4%	185,3	24,38%	59,7
	20%	87	100	13,4%	213,7	12,77%	31,3
	30%	103	100	16,6%	252,8	0%	-7,8

S_1 = muestras por pool, P_0 = prevalencia, muestras totales= pooles + repeticiones, N= muestras individuales, P= prevalencia aparente estimada a través de pooles, (USD)= dólares, Ahorro= expresado en porcentaje (%).

* Cotización obtenida a partir del valor del dólar estadounidense, en el Banco Central de la República Argentina (BCRA) y el precio de lista unitario del ELISA PTBC en el laboratorio CEDIVE-FCV-UNLP, equivalente a \$224 argentinos a la fecha: 25/02/2021)

Como se puede apreciar en la Tabla 2, pudimos evidenciar que a medida que aumenta el número de muestras por pool, y la prevalencia (P_0), disminuye el ahorro económico, la diferencia entre P_0 y P es mayor, lo cual podría interpretarse como una disminución de la sensibilidad analítica al aumentar el número de muestras por pool, en concordancia con lo descripto por Græsbøll y col.¹⁵.

Para implementar el uso de pooles se debería tener en cuenta la prevalencia crítica a partir de la cual deja de ser un método ventajoso como describe Williams¹², ya que si en lugar de una prevalencia de 7,8% tuviéramos una entre el 20-30% al no generarse ningún tipo de ahorro y perder capacidad diagnóstica la alternativa individual volvería a ser la elección (Tabla 2).

Evaluar el desempeño del ELISAip-L en la determinación

del estatus epidemiológico del rodeo, implicaría trabajar con un mayor número de establecimientos, tanto los antecedentes previos del cálculo de la prevalencia en el establecimiento lechero bajo estudio²⁸ y los realizados mediante pooles en este trabajo no difirieron significativamente, siendo este hallazgo alentador para futuros trabajos.

Si bien los actuales métodos diagnósticos de PTBC no son de ninguna manera reemplazables unos por otros, sino complementarios, la alternativa en pooles de leche y posterior análisis individual de los pooles positivos nos permitió una reducción significativa de la cantidad de determinaciones y costos de procesamiento, mostrando un desempeño aceptable como herramienta diagnóstica.

REFERENCIAS

- Chiodini RJ, Van Kruiningen HJ, Merkal RS, Walter R, Thayer JR, Coutu JA. Characteristics of an Unclassified Mycobacterium Species Isolated from Patients with Crohn's Disease. *J Clin Microbiol* 1984; 20(5): 966-971.
- Clarke C. Host responses to Mycobacterium paratuberculosis/ M. avium infection. *Proceedings of the Fourth International Colloquium on Paratuberculosis UK*. 1994; 17: 345-365.
- Körmendy B. Diagnostic value of mammalian, avian and johnin PPD tuberculin in cattle herds infected by Mycobacterium paratuberculosis. *Acta Vet Hung* 1988; 36(3-4): 177-183.
- Vasini Rosell B, Lagleyze B, Morsella C, Méndez L, Gioffre A, Paolicchi F. Evidence of in utero infection by Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis using Multiple-Locus Variable-number tandem-repeat Analysis: first report in Argentina. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 2020; 57(1): e161653 <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2020.161653>
- Moreno F, Frade V, Morsella C, Méndez A, Paolicchi F, Späth EJA. Análisis retrospectivo de paratuberculosis en establecimientos bovinos diagnosticados en INTA EEA Balcarce, Argentina, durante el periodo 1991-2015. En: Libro de Resúmenes del Tercer Congreso de la Sociedad Iberoamericana de Epidemiología Veterinaria y Medicina Preventiva. 2017; Valdivia, Chile, p 35. (consultado 10 de diciembre 2020) Disponible en: http://www.sag.cl/sites/default/files/resumenes_sievmv_valdivia-2017.pdf.
- AlvaradoPinedo MF, DiPaolo LA, Sosa PS, Romero MA, Peralta LM, Costa EF y col. Seroprevalencia de paratuberculosis bovina mediante la prueba de ELISA urea en rodeos de cría y de leche con sospecha de la enfermedad, localizados en la provincia de Buenos Aires, Argentina. *Analecta Vet* 2019; Enero-Junio; 39(1):29. doi.org/10.24215/15142590e032
- Eisenberg SW, Veldman E, Rutten VPMG, Koets AP. A longitudinal study of factors influencing the result of a Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis antibody ELISA in milk of dairy cows. *J Dairy Sci* 2015; 98:2345-2355. [doi:10.3168/jds.2014-8380](https://doi.org/10.3168/jds.2014-8380)
- Nielsen SS, Toft N. Effect of days in milk and milk yield on testing positive in milk antibody ELISA to Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in dairy cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 2012; 149: 6-10. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.05.013>.
- Lombard JE, Byrem TM, Wagner BA, McCluskey. Comparison of milk and serum enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection in dairy cattle. *J Vet Diagn*. 2006; 18(5): 448-458. <https://doi.org/10.1177/104063870601800504>
- Sosa PS, Alvarado Pinedo MF, Di Paolo LA, Peralta LM, Romero MA, Travería GE. Comparación entre un ELISA indirecto en suero y un ELISA en leche para el diagnóstico de paratuberculosis en vacas de tambo: resultados preliminares. *Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico (AAVLD)*. 2018; Rio Cuarto, Córdoba.
- Kline Richard L, Brothers Thola A, Brookmeyer R, Zeger S, Quinn TC. Evaluation of Human Immunodeficiency Virus Seroprevalence in Population Surveys Using Pooled Sera. *J Clin Microbiol* 1989; 1449-1452.
- Williams BG. Optimal pooling strategies for laboratory testing. *South African Centre for Epidemiological Modelling and Analysis (SACEMA, www.sacema.org)*, Stellenbosch, South Africa. 2010; arXiv: 1007.4903 [q-bio.QM]. (consultado 10 de diciembre 2020) Disponible en: <https://arxiv.org/abs/1007.4903>
- Hoof-Jørgensen R. Diagnosis of enzootic bovine leucosis in single and pooled samples. *Rev Sci Tech* 1990; 9(4): 1169-1173. (consultado 10 de diciembre 2020) Disponible en: [Diagnosis of enzootic bovine leucosis in single and pooled samples - PubMed \(nih.gov\)](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11691173/)
- Muñoz-Zanzi CA, Johnson WO, Thurmond MC, Hietala SK. Pooled-sample testing as a herd-screening tool for detection of bovine viral diarrhoea virus persistently infected cattle. *J Vet Diagn Invest* 2000; 12:195-203.
- Græsbøll K, Andresen LO, Halasa T, Toft N. Opportunities and challenges when pooling milk samples using ELISA. *Prev Vet Med* 2017; 138(B), 93-98. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.08.001>
- Whittington RJ, Fell S, Walker D, McAllister S, Marsh I, Sergeant E, y col. Use of Pooled Fecal Culture for Sensitive and Economic Detection of Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis Infection in Flocks of Sheep. *J Clin Microbiol* 2000; 38, 2550-2556. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.7.2550-2556.2000>
- Lavers CJ, Barkema HW, Dohoo IR, McKenna SLB, Keefe GP. Evaluation of milk ELISA for detection of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in dairy herds and association with within-herd prevalence. *J Dairy Sci* 2014; 97, 299-309. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-7101>
- Mathevon Y, Foucras G, Corbière F. Flock sensitivity and specificity of pooled fecal qPCR and pooled serum ELISA for screening ovine paratuberculosis. *PLoS ONE* 2019; vol 14(12), e0226246. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226246>
- Nielsen SS, Thamsborg SM, Houe H, Bitsch V. Bulk-tank milk ELISA antibodies for estimating the prevalence of

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado en el marco de la tesis doctoral en curso, "Desarrollo y aplicación de métodos diagnósticos de paratuberculosis bovina a partir de muestras de leche, calostro, suero sanguíneo y materia fecal", llevada a cabo por el Médico Veterinario Pedro Sebastián Sosa. Financiada mediante beca tipo "A" otorgada por la UNLP.

Se agradece al tambo de la estación experimental INTA "Manantiales" ubicada en Chascomús, por la colaboración en los muestreos.

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

- paratuberculosis in Danish dairy herds. *Prev Vet Med* 2000; 44, 1–7. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(00\)00098-2](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(00)00098-2)
20. Bauman CA, Jones-Bitton A, Jansen J, Kelton D, Menzies P. Evaluation of bulk tank milk PCR and bulk tank milk modified ELISA tests for the detection of paratuberculosis at the herd level in goat and sheep dairies in Ontario, Canada. *J. Dairy Sci* 2019; 102, 511-520. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15020>
 21. Delafosse A, Meens E, Rambaud T, Hanoy F, Achour A. Sensitivities of a bulk-tank milk ELISA and composite fecal qPCR to detect various seroprevalence levels of paratuberculosis in cattle herds in Normandy, France. *Can Vet J.* 2019; 60(3), 275–281.
 22. Kalis CHJ, Hesselink JW, Barkema HW, Collins MT. Culture of strategically pooled bovine fecal samples as a method to screen herds for paratuberculosis. *J Vet Diagn Invest* 2000; 12, 547–551. <https://doi.org/10.1177/104063870001200609>
 23. Weber MF, Groenendaal H, van Roermund HJ, Nielen M. Simulation of alternatives for the Dutch Johne's disease certification-and-monitoring program. *Prev Vet Med* 2004; 62, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2003.11.006>
 24. Whitlock RH. Protocol for culture of Mycobacterium paratuberculosis from feces milk, and tissue. 2001; Johne's Laboratory Updated. 382 West Street Road Kennett Square, PA 19348.
 25. Whittington RJ, Whittington AM, Waldron A, Begg DJ, de Silva K, Purdie AC y col. Development and validation of a liquid medium (M7H9C) for routine culture of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis to replace modified Bactec 12B medium. *J Clin Microbiol* 2013; 51(12):3993-4000. doi: 10.1128/JCM.01373-13.
 26. Romero MA, Alvarado Pinedo MF, Moyano RD, Peralta L, Sosa P, Santangelo M, Travería G. Medio de cultivo líquido para el diagnóstico de paratuberculosis bovina. Aplicación y análisis comparativo con el medio de Herrold: resultados preliminares. *Analecta Vet* 2018; 38(1), 50-55. doi: [10.24215/15142590e025](https://doi.org/10.24215/15142590e025)
 27. Collins DM, Stephens DM, De Lisle GW. Comparison of polymerase chain reaction tests and faecal culture for detecting Mycobacterium paratuberculosis in bovine faeces. *Vet. Microbiol* 1993; 36(34), 288-299.
 28. Alvarado Pinedo MF. Posibilidades diagnósticas de la PPD Aviar en la Paratuberculosis Bovina en animales jóvenes. Trabajo de tesis doctoral. Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Veterinarias. 2015. (consultado 10 de junio 2021) Disponible en: Documento_completo_..pdf (unlp.edu.ar)
 29. Crowther JR. The ELISA Guidebook. 2002; Vienna, Austria. The International Atomic Energy Agency. Methods in molecular biology TM. DOI:10.1385/1592590497. (consultado 9 de diciembre 2020) Disponible en: The Elisa guidebook (studfile.net)
 30. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, 2020; Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
 31. Robin X, Turck N, Hainard A, Tiberti N, Lisacek F, Sanchez JC y col. pROC: an opensource package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinformatics*, 2011; 12, p. 77. doi: 10.1186/147121051277
 32. Youden WJ. Index for rating diagnostic tests. *Cancer* 1950; 3: 32-35. doi:10.1002/1097-0142(1950)3:1<32::aid-cncr2820030106>3.0.co;2-3.
 33. Cowling DW, Gardner IA, Johnson WO. Comparison of methods for estimation of individual level prevalence based on pooled samples. *Prev Vet Med* 1999; 39: 211-225.
 34. Swets J. Measuring the accuracy of diagnostic systems. *Science* 1988; 240(4857), 1285–1293. doi:10.1126/science.3287615
 35. Tiwari A, Van Leeuwen JA, McKenna SLB, Keefe GP, Barkema HW. Johne's disease in Canada: Part I: Clinical symptoms, pathophysiology, diagnosis, and prevalence in dairy herds. *Can Vet J* 2006; 47(9), 874–882.
 36. Slana I, Paolicchi F, Janstova B, Navratilova P, Pavlik I. Detection methods for Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in milk and milk products: a review. *Veterinarni Medicina* 2008; 53(6), 283–306.
 37. Butler JE. Bovine immunoglobulins: An augmented review. *Vet Immunol Immunopathol* 1983; 4(1-2), 43–152. doi:10.1016/0165-2427(83)90056-9



Este artículo está bajo una Licencia Creative Commons. Atribución-No Comercial-Sin Derivadas 4.0 Internacional <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>