



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

**“OBTENCIÓN DE UN ANTÍGENO PROTOPLASMÁTICO DE *Mycobacterium*
avium subespecie *paratuberculosis* PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA
ENFERMEDAD DE JOHNE EN OVINOS”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :

OSCAR ALEJANDRO HERNÁNDEZ CRUZ

ASESOR: M. EN C. MARCO ANTONIO SANTILLÁN FLORES
COASESOR: M EN C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Trabajo parcialmente financiado por CONACYT-SAGARPA 2003-002-140

DEDICATORIA

Este trabajo no sólo es un requisito para obtener un título profesional, es el fin de una etapa en mi vida y el comienzo de una responsabilidad con la sociedad, mi familia, conmigo mismo y en especial a los animales.

Me enseñaste a ser una persona de bien, responsable, dedicada, a esforzarme y nunca rendirme ante las contrariedades que nos da el destino y que a pesar de los sacrificios y grandes esfuerzos que realizaste me diste la oportunidad de terminar mi carrera. Te agradezco por darme la vida, criarme, enseñarme y darme todo cuanto pudiste, este triunfo es tuyo. Te amo Má.

Te agradezco por todos los buenos consejos y el apoyo que me has dado, has sido parte fundamental en mi vida y qua a pesar de la distancia siempre has estado conmigo. Te amo Pá.

Eres lo mejor que me ha pasado en esta vida, gracias por darme lo mejor de ti y por estar juntos en los momentos más importantes y sobre todo porque has sido una gran amiga y compañera. Te amo con toda mi vida mi carita linda.

Nos hicimos compañía cuando más lo necesitamos, compartimos buenos y malos momentos en nuestras vidas y agradezco todo el cariño que me han brindado. Los amo Karla y Pável.

Te doy Gracias por compartir tus conocimientos, por enseñarme el mejor camino que hay que seguir y por confiar en mi cuando más lo necesitaba; Alfredo te agradezco por tu amistad.

A Chucho, Polo, Ángel, Diego por acompañarme en el camino.

A Sandy, Chiquito, Camilito, Wiliberto, Don Gato, Hieni, Raider (donde quiera que estén) y Serenita.

AGRADECIMIENTOS

Gracias Auro por tu amistad, tus conocimientos y la sencillez en tu forma de ser.

Dr. Jesús Guevara sus conocimientos me fueron de mucha utilidad y le agradezco por confiar en mi.

Marco Gracias por tu amistad, tus enseñanzas y por guiarme en este importante paso.

Dr. Cuéllar por su ayuda incondicional y sus conocimientos.

Dionisio por apoyarnos y por tu gran ayuda.

Dr. Víctor Pérez por su confianza, y por enseñarme que tenemos una obligación para con los animales.

Dr. Pablo por su confianza.

A la UNAM la mejor Universidad de Latinoamérica pero para mi la mejor del mundo.

A la FES y a todos sus profesores que dejaron un aprendizaje en mi.

Al INIFAP por darme la posibilidad de elaborar y trabajar en mi tesis.

A todos los Investigadores del instituto que con su colaboración fue posible este trabajo.

Esos pequeños y grandes seres que dan y seguirán sus vidas en pro de la profesión y la formación de profesionistas, sin ustedes no seríamos lo que ahora somos.

ÍNDICE	Página
1. RESUMEN	<i>i</i>
2. INTRODUCCIÓN	1
2.1 Definición y etiología.....	1
2.2 Transmisión.....	2
2.3 Cuadro clínico.....	2
2.4 Patogenia y respuesta inmunológica.....	4
2.5 Lesiones.....	5
2.6 Diagnóstico.....	5
2.7 Tratamiento.....	8
2.8 Prevención y control.....	8
2.9 Importancia económica.....	9
3. HIPÓTESIS	10
4. OBJETIVOS	11
5. JUSTIFICACIÓN	12
6. META	13
7. MATERIAL Y MÉTODOS	14
7.1 Elaboración del antígeno.....	14
7.2 Determinación de sensibilidad y especificidad.....	15
7.3 Prueba de IDGA.....	15
7.4 Aislamiento bacteriano.....	16
7.5 Obtención de las muestras.....	16
7.6 PCR Anidada.....	29
8. RESULTADOS	21
8.1 Elaboración del antígeno.....	21
8.2 Determinación de sensibilidad y especificidad.....	22
8.3 Prueba de IDGA.....	25
8.4 Aislamiento bacteriano.....	26
8.5 PCR.....	28
9. DISCUSIÓN	29

10. CONCLUSIONES	33
11. FIGURAS	
11.1 Figura 1. Perfil de proteínas del antígeno comercial y sonicado.....	21
11.2 Figura 2. Prueba de IDGA.....	22
11.3 Figura 3. Prueba de IDGA.....	24
11.4 Figura 4. Prueba de IDGA con el antígeno obtenido por sonicación.....	25
11.5 Figura 5. Prueba de IDGA. Evaluación de los sueros problema.....	26
12. CUADROS	
12.1 Cuadro 1. Datos generales de los animales analizados.....	16
12.2 Cuadro 2. Resultados de concordancia, especificidad y sensibilidad.....	23
12.3 Cuadro 3. Resultados de los cultivos en medio sólido.....	26
13. APÉNDICE DE REACTIVOS	34
14. BIBLIOGRAFÍA	36

“OBTENCIÓN DE UN ANTÍGENO PROTOPLASMÁTICO DE *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE JOHNE EN OVINOS”

1. RESUMEN.

El presente trabajo consistió en la elaboración de un antígeno protoplasmático a partir de una cepa de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* con la finalidad de ser utilizado en la prueba de inmunodifusión en agar gel (IDGA). La obtención del antígeno se realizó a partir de una cepa de *M. avium* subespecie *paratuberculosis* aislada de un caso clínico de ovino. La cepa se resembró en el medio líquido Proskauer y Beck adicionado con micobactina. Las células se concentraron por centrifugación y se sonicaron 20 veces durante 59 segundos, para posteriormente dializar y liofilizar el sobrenadante. 20, 10, 15 y 5 mg del liofilizado fueron resuspendidos en un mililitro de agua destilada estéril para probarse con controles positivos y negativos a paratuberculosis. Posteriormente se evaluaron 100 sueros (50 positivos y 50 negativos) en la prueba de IDGA. La concentración de proteínas contenidas en el antígeno obtenido se realizó por medio de un kit comercial y para determinar el perfil de proteínas se realizó un gel de poliacrilamida utilizando diferentes concentraciones del antígeno (20, 15, 10 y 5 mg/ml). En la prueba de IDGA se observó la formación de bandas de precipitación bien definidas solo en las concentraciones de 20, 15 y 10 mg/ml con los sueros positivos, mientras que en ninguna de las cuatro concentraciones con los sueros negativos se observó precipitación. Se tomaron muestras de heces de los mismos animales y se les realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada, también se realizaron cultivos bacteriológicos en medio sólido a partir de heces.

En 44 de 50 sueros analizados con el antígeno a 10 mg/ml se observaron bandas de precipitación bien definidas. En el gel de electroforesis se observaron 10 bandas, donde el control presentó dos (82.6 y 48.7 kDa) no observadas en el antígeno obtenido por sonicación. La concentración de proteínas obtenidas fue de 104.7 µg/ml. La sensibilidad y especificidad obtenidas fueron del 85.7% y 72.6% respectivamente. Con estos resultados se puede concluir que con 10 mg/ml de antígeno preparado se forman bandas de precipitación bien definidas, lo que implica que puede ser utilizado para el diagnóstico de paratuberculosis en ovinos por inmunodifusión.

2. INTRODUCCIÓN.

2.1 Definición y etiología.

Desde 1895 cuando la enfermedad de paratuberculosis fue descrita por primera vez como una entidad clínica por Heinrich Albert Johne y Langdon Frithingham, se demostró que era distinta a la tuberculosis y causada por un microorganismo distinto, caracterizándose por una enteritis granulomatosa crónica y una linfadenitis regional (Kreeger, 1991; Carter y Chengappa, 1994; Clark y Little 1996). Esta enfermedad se encuentra distribuida en todo el mundo (Carter y Chengappa, 1994) afectando a bovinos, ovinos, venados, camélidos y rumiantes silvestres. Es causada por un bacilo intracelular gram positivo, anaerobio facultativo y ácido-alcohol resistente, que a diferencia de las demás micobacterias necesita un factor de crecimiento denominado micobactina, la cual es una amina que interviene en la captación de hierro. Su crecimiento es lento y sus colonias se observan entre las 8 y 12 semanas de incubación a 37°C, siendo el medio de yema de huevo de Herrold el de elección (Biberstein, Chung Zee, 1994; Clark y Little, 1996; Yayo y col., 2001). Esta bacteria pertenece a un grupo de micobacterias denominado complejo *avium-intracelulare* subdividido en tres subespecies, *Mycobacterium avium* subespecie *avium*, *M. avium* subespecie *paratuberculosis* y *M. avium* subespecie *silvaticum* (Harris y Barleta, 2001; Yayo y col., 2001). El genotipo de *M. avium* subespecie *paratuberculosis* se distingue de otras micobacterias por la presencia de 14 a 18 copias de un elemento de inserción denominado IS900, y por su dependencia a la micobactina que es un factor de crecimiento (Yayo y col., 2001).

La característica principal de ácido alcohol resistencia se debe a la presencia de abundantes lípidos en su pared, los cuales determinan sus propiedades patogénicas e inmunológicas (Yayo y col., 2001). Estos lípidos son glucolípidos y peptidoglucolípidos que determinan las características de las colonias, la especificidad serológica y además se considera que cooperan en asegurar la supervivencia de las bacterias en el interior de los macrófagos (Biberstein, Chung Zee, 1994).

El aislamiento de *M. avium* subespecie *paratuberculosis* del tejido intestinal de los pacientes de la enfermedad de Crohn ha llevado a la conclusión que pudiera tratarse del mismo patógeno para los humanos (Harris y Barleta, 2001). Este problema todavía es polémico, ya que varios informes documentan la presencia o ausencia de esta bacteria en los pacientes con esta enfermedad (Harris y Barleta, 2001). Dada la dificultad que los

investigadores han tenido en el aislamiento de un agente infeccioso putativo a partir de los tejidos humanos y debido a la falta de modelos animales convenientes, la relación causal entre el *M. avium* subespecie *paratuberculosis* y la enfermedad de Crohn no se ha demostrado hasta el momento (Harris y Barleta, 2001).

2.2 Transmisión.

Los neonatos y los animales jóvenes son los más susceptibles de adquirir la infección (Harris y Barleta, 2001). Los animales jóvenes son los que más se infectan a través de la ruta fecal-oral. Esto ocurre ingiriendo el organismo a través de leche contaminada o bien mediante la ingestión accidental del microorganismo de las superficies contaminadas (Harris y Barleta, 2001).

El principal mecanismo de transmisión se da por la ingestión de alimento y agua contaminados por heces en donde se encuentra la bacteria, sin embargo, la transmisión vertical puede estar implicada pero no se ha demostrado como un mecanismo de transmisión significativo (Kreeger, 1991).

Se han realizado diversos trabajos para estudiar la teoría de la transmisión vertical en el caso de *M. avium* subespecie *paratuberculosis*. El primer reporte de la infección congénita por el *M. avium* subespecie *paratuberculosis* se realizó por Alexejeff-Goleff en 1929 (Yayo y col., 2001). En el caso de la infección fetal, se ha observado una mayor probabilidad de infección en los estadios más avanzados de la gestación, cuando la hembra preñada elimina grandes cantidades de la bacteria (Radostits y col., 2002).

Otro aspecto controversial ha sido el reciente informe en los ensayos de pasteurización de leche, en los cuales, se ha encontrado una cepa de *M. avium* subespecie *paratuberculosis* termalmente más tolerante a dicho proceso que *M. bovis* o *Coxiella burnetii* (Harris y Barleta, 2001). Mientras que otros informes han indicado que la pasteurización de corto tiempo y de alta temperatura no mata al *M. avium* subespecie *paratuberculosis* eficazmente en la leche, el papel de este bacilo en la enfermedad humana y la identificación de fuentes potenciales de la infección es un tema de intenso debate (Harris y Barleta, 2001).

2.3 Cuadro clínico.

Los signos clínicos se observan en animales adultos, generalmente entre 2 y 3 años (raramente ocurre en animales jóvenes), presentando la pérdida de peso progresiva

que va desde semanas hasta años. También se presenta letargia, depresión, pelo hirsuto, ausencia de fiebre, anemia, hipoproteinemia y edema intermandibular (Scanlan, 1991; Matthews y House, 1996).

Los animales con enfermedad de Johne caen dentro de cuatro categorías o etapas de la enfermedad. Estas etapas difieren de acuerdo a la severidad de los signos clínicos, el potencial para difundir el organismo en el medio y la facilidad con la cual la enfermedad puede ser detectada usando métodos de laboratorio actuales (Sweeney, 1996).

Las etapas son:

Etapas IV Animales clínicamente enfermos: Se presentan emaciación, edema submandibular, las heces se hacen pastosas debilidad, son grandes diseminadores, tienen alta tasa de anticuerpos y bajo nivel de inmunidad celular

Etapas III Diseminadores esporádicos: Sin algunos signos excepto por disminución en la producción, hay respuesta inmune humoral y celular intermedia. A medida que avanza la infección, aumenta la excreción, aumenta los anticuerpos y disminuye la inmunidad celular.

Etapas II Animales portadores: Son detectados por pruebas serológicas o cultivo a partir de heces.

Etapas I Animales resistentes no infectados: nunca se infectaron o desarrollaron inmunidad activa protectora que resultó en la eliminación completa de la bacteria (Abalos, 2006).

En ovejas y cabras la diarrea no es marcada y puede estar ausente, aunque las heces pueden ser tan blandas que pierden su forma típica. En algunos casos se manifiesta la emaciación y la pérdida de peso por meses, hasta mostrar una anorexia sin que las heces pierdan su consistencia normal, pero durante algunos estadios terminales de la enfermedad, las heces pueden observarse blandas y pastosas. En los cuadros severos, puede haber pérdida de lana en las ovejas (Quinn y Markey, 2002; Radostits y col., 2002).

La resistencia natural del animal determina en gran medida el resultado de la infección. La mayoría se recuperan espontáneamente, algunos llegan a ser portadores crónicos y unos pocos desarrollan eventualmente la enfermedad clínica (Quinn y Markey, 1991).

2.4 Patogenia y respuesta inmunológica.

La incidencia de enfermedad clínica en un rebaño infectado es muy baja, ya que raras veces excede el 5% de los animales adultos. La morbilidad es inferior al 1% anual y por cada caso clínico de la enfermedad se estima que hay de 15 a 25 animales más infectados en varios estadios de la enfermedad clínica, subclínica o como portadores, y de 10 a 14 con infección latente en animales lactantes, jóvenes o adultos (Radostits y col., 2001).

Después de la ingestión de la bacteria el *M. avium* subespecie *paratuberculosis*, ésta se localiza en la mucosa del intestino delgado en la porción asociada a tejido linfoide y en menor extensión en las tonsilas y linfonodos faríngeos. Su principal sitio de multiplicación es la parte final de intestino delgado, colon y recto, aunque en la mayoría de los animales la multiplicación del microorganismo se mantiene restringida mediante la activación de los macrófagos locales por parte de las linfocinas (Yayo y col., 2001; Quinn y Markey, 2002). Cuando la enfermedad progresa, la respuesta inmunomediada desarrolla reacciones granulomatosas, con marcada acumulación de linfocitos y macrófagos en la lámina propia y submucosa intestinal, el resultado es una enteropatía con pérdida de proteínas y mala absorción de nutrientes y agua. Los macrófagos en la pared intestinal y en los linfonodos regionales contienen grandes cantidades de micobacterias (Quinn y Markey, 2002).

La respuesta inmunológica tras la infección es variable y depende del estadio de ésta y de la aparición o no de la enfermedad clínica (Radostits y col., 2001). El estado nutricional y hormonal de un animal puede influenciar su susceptibilidad a infectarse con *M. avium* subespecie *paratuberculosis* (Harris y Barleta, 2001).

Los animales infectados inicialmente desarrollan una respuesta mediada por células, seguida de una respuesta humoral iniciada por la liberación de bacterias de los macrófagos destruidos según avanza la enfermedad. En los estadios tardíos de la enfermedad se produce una anergia y no es detectable ningún tipo de inmunidad (celular o humoral) (Radostits y col., 2001).

El *M. avium* subespecie *paratuberculosis* también favorece la producción de citocinas en los animales infectados. Los niveles de Interferón gamma (IFN- γ) y la expresión génica de IFN- γ en el tejido ileal y linfonodos cecales son más elevados en animales con infección subclínica en comparación con animales con signos clínicos de paratuberculosis (Harris y Barleta 2001). Los macrófagos pueden inducir la liberación

de interleucina 1 y 6, y el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α) bajo estimulación *M. avium* subespecie *paratuberculosis* (Harris y Barleta, 2001).

La resistencia de la infección por *M. avium* subespecie *paratuberculosis* y los signos clínicos dependen de los niveles de la inmunidad mediada por células. La inmunidad está correlacionada con la producción de IFN- γ , siendo la respuesta inmune del tipo Th-1, por lo contrario la respuesta humoral (Th-2) no asegura la protección a la infección. Se han registrado elevados porcentajes de infección en animales con eliminación masiva del *M. avium* subespecie *paratuberculosis*, mientras que en algunos de los animales con niveles bajos de inmunidad, los signos clínicos son aparentes (Toman y col., 2003).

2.5 Lesiones.

La bacteria es fagocitada por los macrófagos los cuales proliferan y se infiltran en la submucosa, principalmente en las placas de Peyer, lo que resulta en una disminución de la absorción y en una diarrea crónica. Los macrófagos en la pared intestinal y los linfonodos regionales contienen gran número de micobacterias (Yayo y col., 2001; Quinn y Markel, 2002). El intestino afectado se caracteriza por una inflamación catarral crónica. En casos avanzados, el intestino afectado esta muy engrosado y tiene aspecto arrugado. Las petequias en las crestas de los bordes le dan un aspecto hemorrágico (Scanlan, 1991).

En la mucosa intestinal se observa una apariencia granular y en el 90% de los casos se muestra una pigmentación que varia de un amarillo tenue a naranja intenso (Clarke y Little, 1996). La serosa de ileon está edematosa con una ligera apariencia granular y la serosa de los conductos linfáticos es prominente (83% de los casos) (Clarke y Little, 1996). El mesenterio y los linfonodos ileocecales están agrandados en 80% de los casos, usualmente edematosos, y ocasionalmente muestran la corteza pigmentación amarillo- anaranjada (Clarke y Little, 1996).

2.6 Diagnóstico.

Los métodos de diagnóstico más comunes para esta enfermedad son las muestras a la necropsia de los linfonodos mesentéricos o ileocecales y de heces para realizar frotis y cultivo bacteriano, la inmunodifusión en gel de agar (IDGA), la prueba inmunoenzimática (ELISA) y más recientemente, se han implementado técnicas

moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Scanlan, 1991; Matthews y House, 1999).

La evaluación microscópica de heces y mucosa rectal tiene la ventaja de ser una técnica fácil de realizar; sin embargo, los resultados generalmente no son adecuados. La biopsia de la mucosa del recto ha sido usada con facilidad clínicamente y los resultados varían de 100% a un 20% (Kreeger, 1991).

Las improntas de linfonodos, y los frotis de raspados rectales o intestinales se tiñen por el método de Zielh-Neelsen (Biberstein, Chung Zee, 1994), las técnicas anatomopatológicas, generalmente *posmortem*, ofrecen una sensibilidad y especificidad altamente confiables (Vélez, 1998). La johnina, un antígeno extraído de *M. paratuberculosis*, se ha utilizado para estimular respuestas alérgicas en animales infectados (Scanlan, 1991). La especificidad de la prueba se ha incrementado con la utilización de un derivado de proteína purificada de johnina (PPD), que se prepara de una forma análoga a la tuberculina PPD (Scanlan, 1991), la cual tiene una sensibilidad y especificidad bajas (Kreeger, 1991). Los anticuerpos de *M. avium* subespecie *paratuberculosis* pueden ser detectados en el suero de animales infectados a través de varias técnicas como son la fijación de complemento (FC), IDGA y ELISA (Sweeney, 1996).

La prueba de ELISA utilizada en vacas también se utiliza para el diagnóstico en ovejas y las cabras. Su sensibilidad y especificidad son similares a las observadas en los bovinos, pero se presentan reacciones cruzadas debido a *Coreynebacterium pseudotuberculosis*, y los sueros absorbidos con gérmenes tratados con calor mejoran los resultados (Radostits y col., 2002). Las pruebas de IDGA y ELISA han sido evaluadas y comparadas en ovejas adultas seleccionadas de rebaños con antecedentes de pérdida importante y crónica de peso. En dicho trabajo a las ovejas se les practicó la necropsia, y se evaluó la sensibilidad y la especificidad tomando como referencia los hallazgos histopatológicos. La sensibilidad y especificidad de la IDGA fueron del 37% y el 100% respectivamente. La sensibilidad de la ELISA fue del 48%, pero su especificidad fue tan solo del 89% (Radostits y col., 2002). La técnica de IDGA es comercialmente viable y es una prueba que requiere de un procedimiento simple, generalmente es más fácil de interpretar que otras pruebas serológicas, pero su sensibilidad es relativamente baja en casos preclínicos (Kreeger, 1991).

La técnica de IDGA, ha sido modificada varias veces desde su descripción original por Ouchternoly en 1948 (Myers, 1995). La IDGA se define como una reacción

de precipitación en un medio semisólido, la cual se basa en la difusión de un antígeno y su anticuerpo homólogo, dando como resultado la formación de líneas o bandas de precipitación visibles (Morilla, 1986).

Según Morilla (1986) la velocidad de difusión para un antígeno, o para una población de anticuerpos dependerá de:

- La concentración de moléculas. En la difusión doble, cuando las concentraciones de los reactantes son equivalentes y sus pesos moleculares son similares, las bandas de precipitación son rectas y se encuentran equidistantes de los pozos, por lo que la velocidad de difusión es proporcional a la concentración.
- La temperatura elevada acelera la difusión.
- Las moléculas más pequeñas difunden más rápidamente.
- Las moléculas con forma redonda se mueven más rápido
- La velocidad de difusión de las moléculas decrece al aumentar la viscosidad del medio.

El método de diagnóstico definitivo y confirmatorio es el cultivo bacteriano *in vitro* a partir de las heces (Biberstein, Chung Zee 1994), sin embargo, al comparar estos resultados con los de la prueba de IDGA, se ha observado que ambos métodos son similares en cuanto su sensibilidad y especificidad (Sherman y Gezon, 1980). En general, la IDGA ofrece algunas ventajas prácticas en comparación de la prueba de cultivo, entre las cuales se encuentran la rapidez para obtener los resultados, el bajo costo por prueba, menos equipo especializado y menos tiempo y espacio de operación (Sherman y Gezon, 1980). Además el cultivo fecal requiere entre 8 y 12 semanas y no se observa crecimiento si no hay 1,400 organismos por gramo de heces lo que ocasiona que no se detecten algunos portadores (Matthews y House, 1999). Para la realización de la IDGA se utiliza un antígeno protoplasmático, el cual es extraído de la cepa de laboratorio 18 *M. avium* subespecie *paratuberculosis* (Sherman y Gezon, 1980).

Recientemente se ha utilizado pruebas de ADN, las cuales prometen tener diagnósticos rápidamente. Se han definido varias secuencias de ADN y subsecuentemente, pruebas de hibridación las cuales son específicas para *M. avium* subespecie *paratuberculosis*. Las pruebas de hibridación para el fragmento *IS900*, una secuencia de inserción, parece tener una excelente especificidad para *M. avium* subespecie *paratuberculosis*. Acoplado las técnicas de ADN con la PCR proporcionan una sensibilidad extremadamente alta (Kreeger, 1991).

2.7 Tratamiento

Ya que la paratuberculosis es invariablemente fatal, muchos de los antimicobacterianos han sido evaluados como potenciales agentes terapéuticos (Sweeney, 1996). Actualmente, ningún fármaco es aprobado para el tratamiento de la enfermedad de Johne en el ganado, y cuando la terapia antimicrobiana ha sido intentada es limitado su uso para cualquier agente antimicrobiano normal (Harris y Berleta, 2001). Debido a esta falta de eficacia, y al fracaso de todos los antimicrobianos para proporcionar una curación bacteriológica, no se recomienda ningún tratamiento (Radostits, 2001).

2.8 Control y prevención.

La enfermedad se combate eliminando del rebaño a los animales infectados y evitando su posible difusión dentro del rebaño. El manejo del estiércol para controlar la transmisión fecal-oral, especialmente para los animales jóvenes y susceptibles. El riesgo también está presente en los animales infectados durante la gestación o mediante la ingestión de calostro o leche contaminados por lo que existe el riesgo de infectar al ganado de reemplazo y por lo tanto aumentan los costos para realizar los reemplazos (Sweeney, 1996).

Debido a la cronicidad y resistencia de esta enfermedad se han dado grandes esfuerzos sobre las medidas terapéuticas, mecanismos de transmisión, factores determinantes en la susceptibilidad, la identificación serológica en animales que no presentan signos clínicos y otros métodos para un diagnóstico temprano. Sin embargo, solo en los últimos años, los mecanismos de patogenicidad de la enfermedad han sido estudiados (Kreeger, 1991).

El control lleva tiempo (se estima que entre 3 y 7 años) para reducir la prevalencia 0%, de 7 a 15; y para reducir y eliminar la enfermedad clínica, de 2 a 5 años.

La eficacia de los programas de control de la enfermedad depende si se dirigen a las fuentes potenciales de infección y rutas de transmisión. Los estudios han demostrado que *M. avium* subespecie *paratuberculosis* es viable durante 250 días en el agua y excremento. Por consiguiente, la contaminación del ambiente de un animal por estiércol de los animales infectados es el modo más común de la transmisión (Harris y Barleta, 2001).

Durante los últimos 60 años se han elaborado varias vacunas vivas y atenuadas en muchos países para reducir las pérdidas económicas debido a la paratuberculosis (Körmeny, 1994). La vacunación ha demostrado que disminuye la incidencia de la enfermedad clínica en bovinos, ovejas y cabras, y reduce o elimina la excreción de altas concentraciones de bacterias (Yayo y col., 2001). Generalmente la importancia de la vacunación está en las ovejas y cabras. Por ejemplo, en España, Nueva Zelanda y en una región endémica de Australia, la vacuna inactivada se emplea en rebaños infectados que sufren de alta mortalidad. En Noruega la vacunación de corderos de 2 a 4 semanas con vacuna atenuada ha mejorado el control de la paratuberculosis en las cabras, el cual ha fallado tras varios años de esfuerzos infructuosos en el manejo y el aislamiento y eliminación de animales clínicamente afectados (Yayo y col., 2001). El uso de la vacuna puede influir en el resultado de pruebas serológicas o intradérmicas (Matthews, 1999; Yayo y col., 2001; Radostits y col., 2001). En México se han realizado ensayos con bacterinas aplicadas vía subcutánea y oral en rebaños ovinos infectados naturalmente y en ambos casos no fue posible determinar si dichas bacterinas confieren protección adecuada contra una posible infección (Hernández, 1991; Oviedo, 1991).

2.9 Importancia económica

La paratuberculosis causa pérdidas económicas directas a través de la muerte del ganado infectado, bajas en la producción de crías y por el incremento en los honorarios veterinarios y costos relacionados con el diagnóstico y los medicamentos utilizados. Como esta enfermedad afecta la absorción de nutrientes, el consumo de alimentos que permanece normal está subutilizado porque la condición corporal de los animales infectados se deteriora a medida que la enfermedad progresa. Otra pérdida económica está referida a la pérdida de valor y prestigio de los reproductores. Las causas indirectas se relacionan a la pérdida de mercados, la venta prematura de los animales enfermos o infectados, reducción en el valor de venta e incremento de la tasa de desecho, disminución de la expectativa de vida productiva, reducción del lote de reposición limitando la diversidad genética, incremento de los costos de reposición, pérdida de inversión en el ganado de reposición que ha sido infectado o expuesto desde el nacimiento, etcétera (Jorge y col., 2005).

3. HIPÓTESIS.

Mediante la elaboración de un antígeno protoplasmático a partir de la cepa *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* con la técnica de sonicación, se podrán realizar pruebas de IDGA para contar con una herramienta de diagnóstico eficaz de la enfermedad de Johne en ovinos.

4. OBJETIVOS.

4.1 Desarrollar un antígeno protoplasmático de una cepa de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* adecuado para ser usado en la prueba de inmunodifusión en agar gel (IDGA) en el diagnóstico de paratuberculosis ovina.

4.2 Determinar la cantidad, concentración y caracterización de proteínas del antígeno.

4.3 Realizar PCR anidada y cultivos bacteriológicos a partir de heces.

4.4 Establecer la sensibilidad y especificidad del antígeno en la prueba de IDGA con sueros de ovinos positivos y negativos a paratuberculosis.

5. JUSTIFICACIÓN.

En México, el diagnóstico de la paratuberculosis en ovinos mediante el uso de la prueba de inmunodifusión en agar gel no se realiza en muchas ocasiones, debido a la problemática que implica la importación del antígeno protoplasmático. El presente trabajo consistió en obtener un antígeno protoplasmático a partir de una cepa de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*, el cual servirá para implementar esa técnica y establecer un diagnóstico confiable para la enfermedad.

6. META.

Obtener un antígeno a partir de una cepa de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* para realizar la prueba de inmunodifusión en gel de agar.

7. MATERIAL Y MÉTODOS.

7.1. Elaboración del antígeno.

La obtención del antígeno se realizó a partir de una cepa de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* aislada a partir de heces de un ovino sospechoso procedente de una explotación del estado de México de las explotaciones donde se realizaron los muestreos, al cual se le realizó un cultivo en medio sólido de Herrold/yema de huevo adicionado con micobactina (*Allied Monitor*). La cepa aislada se sembró en medio líquido Proskauer y Beck adicionado con micobactina y se incubó a 37°C durante cuatro semanas. Las bacterias se concentraron por centrifugación y se lavaron tres veces con PBS y fueron sonicadas (*Ultrasonic Processor*) 20 veces durante 59 segundos (Herboe y col., 1998). El material obtenido se centrifugó a 10,000 rpm durante una hora y el sobrenadante fue dializado a 4°C en una membrana de diálisis (*Sigma no*) por 24 horas, posteriormente se mantuvo en congelación a -80°C por una hora y se procedió a liofilizar (*Freezen Dry Sistem, Labconco*) durante toda la noche a -133×10^{-3} mBar de vacío y a una temperatura de -40°C (Herboe y col., 1998). Con el antígeno obtenido, se llevó a cabo su titulación realizando diluciones 5, 10, 15 y 20 mg/ml en la prueba de inmunodifusión en agar gel (IDGA), utilizando sueros de ovino controles positivos y negativos.

La cantidad de proteína se determinó mediante el uso de un kit comercial (*Micro BCA Protein Assay Reagent Kit*) en el cual se utilizan el ácido bicinconínico (BCA) y albúmina sérica bovina como estándar (Smith y col., 1985), Se realizaron nueve diluciones de la albúmina más las muestras del antígeno comercial y de los antígenos obtenidos en el laboratorio. El procedimiento para la microplaca es el siguiente:

Se colocaron 150 µl de cada muestra problema y de albúmina por duplicado en los pozos.

Se adicionaron 150 µl del reactivo a cada pozo y se mezclaron por 30 segundos, posteriormente se cubrió la caja y se incubó a 37° C por dos horas, dejándolo enfriar a temperatura ambiente para posteriormente medir la absorbancia a 562 nm en un lector de placa. Una vez hecha la lectura, se realizó la curva estándar de acuerdo a las lecturas obtenidas de la albúmina sérica bovina para determinar la cantidad de proteína del antígeno.

Una vez cuantificadas, las proteínas fueron caracterizadas por medio de un gel de poliacrilamida (SDS), el cual fue preparado con las siguientes soluciones: gel

separador, amortiguador 1 ml, acrilamida-bis (*Biorad*) 1.32 ml, agua destilada 1.69 ml, Temed 20 μ l (*Gibco, Lab.*) y persulfato 40 μ l (*Biorad*) para una concertación final del 10%, gel concentrador, amortiguador 0.33 ml, archilamida (*Biorad.*) 0.5 ml, agua destilada 1.16 ml, Temed 13.5 μ l y persulfato 27 μ l. Una vez polimerizado, se colocaron 10 μ l del marcador de peso molecular (*Gibco Lab.*), 25 μ l del antígeno comercial (como control) y del antígeno obtenido (5, 10, 15 y 20 mg/ml). Se realizó la electroforesis a 80 voltios durante 10 minutos, hasta aumentar a 100 voltios durante una hora. Posteriormente, el gel fue teñido con azul de Coomassie (*Gibco, Lab.*) durante 24 horas y desteñido con ácido acético hasta observar las bandas de proteínas. El cálculo de los pesos moleculares se realizó por medio del método estadístico de regresión lineal.

7.2. Determinación de sensibilidad y especificidad.

Se calculó la sensibilidad y especificidad al comparar los resultados obtenidos de los mismos 100 sueros previamente probados con el antígeno comercial y la prueba de Cohens Kappa para medir la asociación con los resultados obtenidos en la PCR anidada a partir de las heces de los mismos animales.

Se realizó la prueba de IDGA probando el antígeno obtenido contra algunos sueros de animales positivos a brucelosis a los que se les inoculó una cepa de *M. vaccae* y *M. bovis* para descartar reacciones cruzadas.

7.3. Prueba de inmunodifusión en agar gel.

Para la preparación del gel se pesaron 0.5 g de agar noble (*Difco laboratories*), los cuales se disolvieron por calentamiento en 50 ml de buffer salino de fosfatos (PBS 1X) para obtener una concentración final de 0.75% de agar. Una vez disuelta, se añadió 1 ml de azida de sodio al 0.2% y posteriormente se colocaron 15 ml del agar en una caja de petri para formar el gel. Una vez polimerizado, se realizaron las perforaciones para formar las rosetas. En el pozo del centro se colocó el antígeno y en los pozos periféricos los sueros problema en cantidades iguales (30 μ l). La caja se mantuvo en una cámara húmeda y se incubaron a 37° C entre 24 y 48 horas para realizar la lectura. Si se presentaba una banda de precipitación definida antes de 48 horas se consideraba como positivo, mientras que en la ausencia de dicha banda se daba un resultado negativo (Sherman, 1984). Para determinar la positividad y negatividad de los sueros, se realizó la prueba de IDGA con el antígeno protoplasmático comercial (*Allied Montor Inc.*), con la finalidad de seleccionar a los 50 sueros negativos y los 50 positivos.

7.4. Aislamiento bacteriano.

Las heces fueron colectadas en bolsas de plástico y mantenidas a 4°C hasta su utilización. Se pesaron dos gramos de heces y se colocaron en 40 ml de agua destilada manteniéndolas en agitación por una hora. Posteriormente se tomaron 5 ml del sobrenadante y se adicionaron a 40 ml de solución de cloruro de benzalconio (*Zefhiran, Winthrop Laboratories*) al 0.3% para su descontaminación. Dicha mezcla se mantuvo en reposo durante 18 horas con la finalidad de tomar el sobrenadante con una pipeta Pasteur y distribuirlo de esa manera sobre la superficie de los tubos con el medio Herrold yema de huevo adicionado con micobactina y anfotericina B. Los tubos se incubaron 37°C durante tres meses, monitoreando frecuentemente el crecimiento bacteriano (Merkal, 1973).

7.5. Obtención de las muestras.

Las muestras se tomaron de explotaciones de ovinos de los estados de México, Jalisco, Michoacán y Guanajuato donde había antecedentes de la enfermedad (Cuadro 1). Se tomaron muestras de sangre y heces de ovinos en su mayoría de raza Pelibuey, los cuales fueron seleccionados de acuerdo a su edad (a partir de dos años), a la presencia o ausencia de signos clínicos, y por su etapa fisiológica, siendo el 96% hembras en distintas etapas reproductivas (lactancia, destete y vacías), y el 4% machos y algunos animales menores de dos años. En general, fue procesado el 7% de los animales que presentaron signos clínicos destinados a la producción de pie de cría. Las muestras de sangre fueron tomadas de la vena yugular en tubos con vacío (*Vacutainer*) y centrifugada a 2.500 rpm durante 5 minutos para obtener el suero. Las heces fueron tomadas directamente del recto y colectadas en bolsas de plástico para ser mantenidas a 4°C hasta su proceso.

Cuadro 1. Datos generales de los ovinos analizados.

Número	Origen	Edad	Raza	Sexo
11266	Edo. de México	3 años	Pelibuey	Hembra
11250	Edo. de México	4 años	Pelibuey	Hembra
11236	Edo. de México	2 años	Pelibuey	Hembra
11297	Edo. de México	2 años	Pelibuey	Hembra
201	Edo. de México	2 años	Pelibuey	Hembra
208	Edo. de México	2 años	Pelibuey	Hembra
294	Edo. de México	4 años	Pelibuey	Hembra

18	Edo. de México	2 años	Pelibuey	Hembra
4055	Edo. de México	5 años	Pelibuey	Hembra
4035	Edo. de México	5 años	Pelibuey	Hembra
5076	Edo. de México	4 años	Pelibuey	Hembra
2026	Edo. de México	3 años	Pelibuey	Hembra
4039	Edo. de México	4 años	Pelibuey	Hembra
191	Edo. de México	4 años	Pelibuey	Hembra
174	Edo. de México	4 años	Pelibuey	Hembra
06AVQ	Guanajuato	2 años	Pelibuey	Hembra
SK macho AR	Guanajuato	2 años	Pelibuey	Macho
580FML	Guanajuato	2 años	Pelibuey	Hembra
613FML	Guanajuato	2 años	Pelibuey	Hembra
16 OAR	Guanajuato	2 años	Pelibuey	Hembra
8CMS	Guanajuato	2 años	Katahdin	Hembra
33CMS	Guanajuato	1 año	Pelibuey/Friesian	Hembra
120JR	Guanajuato	4 años	Dorper	Hembra
1114MSL	Guanajuato	2 años	Pelibuey/Friesian	Hembra
A733MSL	Guanajuato	2 años	Pelibuey/Friesian	Hembra
763MSL	Guanajuato	2 años	Pelibuey/Friesian	Hembra
586RLC	Guanajuato	3 años	Katahdin/Pelibuey	Hembra
45RLC	Guanajuato	4 años	Katahdin/Pelibuey	Hembra
77JR	Jalisco	4 años	Dorper	Hembra
26JR	Jalisco	3 años	Dorper	Hembra
96JR	Jalisco	4 años	Dorper	Hembra
130JR	Jalisco	3 años	Dorper	Hembra
18JR	Jalisco	4 años	Pelibuey	Hembra
13JR	Jalisco	4 años	Blackbelly	Hembra
92JR	Jalisco	3 años	Dorper	Hembra
102AAG	Guanajuato	3 años	Pelibuey	Hembra
11AAG	Guanajuato	4 años	Pelibuey	Hembra
420AAG	Guanajuato	10 meses	Pelibuey	Hembra
208AAG	Guanajuato	2 años	Pelibuey	Hembra
160	Edo. de México	3 años	Blackbelly	Hembra
140	Edo. de México	2 años	Blackbelly	Hembra
91JR	Jalisco	3 años	Dorper	Hembra
53CNZ	Guanajuato	2 años	Pelibuey	Hembra
15JR	Jalisco	4 años	Pelibuey	Hembra
3JR	Jalisco	4 años	Pelibuey	Hembra
107JR	Jalisco	3 años	Dorper	Hembra
102JR	Jalisco	4 años	Dorper	Hembra
53JR	Jalisco	4 años	Dorper	Hembra
101JR	Jalisco	4 años	Dorper	Hembra
2601CNZ	Guanajuato	3 años	Ramboulliet	Hembra
0017 AG	Guanajuato	4 años	Pelibuey	Hembra
0018 AG	Guanajuato	3 años	Pelibuey	Hembra
0020 AG	Guanajuato	5 años	Pelibuey	Hembra
005 AG	Guanajuato	4 años	Pelibuey	Hembra

10595 AG	Guanajuato	3 años	Pelibuey	Hembra
106621 AG	Guanajuato	3 años	Pelibuey	Hembra
206607 AG	Guanajuato	6 años	Pelibuey	Hembra
206614 AG	Guanajuato	5 años	Pelibuey	Hembra
206617 AG	Guanajuato	5 años	Pelibuey	Hembra
206620 AG	Guanajuato	2 años	Pelibuey	Hembra
206623 AG	Guanajuato	5 años	Pelibuey	Hembra
206625 AG	Guanajuato	5 años	Pelibuey	Hembra
6625 AG	Guanajuato	3 años	Pelibuey	Hembra
206627 AG	Guanajuato	5 años	Pelibuey	Hembra
474 AG	Guanajuato	5 años	Pelibuey	Hembra
553 AG	Guanajuato	5 años	Pelibuey	Hembra
55509 AG	Guanajuato	2 años	Pelibuey	Hembra
56553 AG	Guanajuato	3 años	Pelibuey	Hembra
56565 AG	Guanajuato	5 años	Pelibuey	Hembra
56569 AG	Guanajuato	5 años	Pelibuey	Hembra
56579 AG	Guanajuato	5 años	Pelibuey	Hembra
56600 AG	Guanajuato	4 años	Pelibuey	Hembra
600601 AG	Guanajuato	4 años	Pelibuey	Hembra
6622 AG	Guanajuato	1 año	Pelibuey	Hembra
6625 AG	Guanajuato	3 años	Pelibuey	Hembra
67909 AG	Guanajuato	5 años	Pelibuey	Hembra
67917 AG	Guanajuato	5 años	Pelibuey	Hembra
67954 AG	Guanajuato	4 años	Pelibuey	Hembra
905 AG	Guanajuato	5 años	Pelibuey	Hembra
996 AG	Guanajuato	4 años	Pelibuey	Hembra
MACHO C GRM	Guanajuato	1 año	Pelibuey	Macho
JEFE GRM	Guanajuato	1 año	Pelibuey	Macho
014Y GRM	Guanajuato	3 años	Pelibuey	Hembra
47Y GRM	Guanajuato	4 años	Pelibuey	Hembra
46-2 GRM	Guanajuato	2 años	Pelibuey	Hembra
11- A GRM	Guanajuato	2 años	Pelibuey	Hembra
02Z GRM	Guanajuato	4 años	Pelibuey	Hembra
A- 8 GRM	Guanajuato	2 años	Pelibuey	Hembra
34-A GRM	Guanajuato	2 años	Pelibuey	Hembra
Z-03 GRM	Guanajuato	3 años	Katahdin	Hembra
245 GRM	Guanajuato	3 años	Pelibuey	Hembra
C/3 A GRM	Guanajuato	1 año	Pelibuey	Hembra
MACHO E GRM	Guanajuato	1 año	Pelibuey	Macho
A 38 GRM	Guanajuato	2 años	Pelibuey	Hembra
Z- 24 GRM	Guanajuato	2 años	Pelibuey	Hembra
03 Y GRM	Guanajuato	2 años	Pelibuey	Hembra
44- A GRM	Guanajuato	2 años	Pelibuey	Hembra
40-A GRM	Guanajuato	2 años	Pelibuey	Hembra
11-Y GRM	Guanajuato	3 años	Pelibuey	Hembra
859 JAC	Guanajuato	3 años	Pelibuey	Hembra

7.6. Reacción en cadena de la polimerasa anidada.

A las muestras de heces se les realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada; la cual consiste en realizar dos reacciones de PCR, donde el producto de la primera amplificación se utiliza como template para realizar una segunda amplificación de una región más pequeña y específica que la primera. Se utilizaron iniciadores específicos para el elemento de inserción *IS900* el cual es único para *M. avium* subespecie *paratuberculosis*, presenta de 14 a 18 copias dentro de su genoma y codifica para 399 aminoácidos de la bacteria. Se utilizaron los iniciadores PARA1 (5' TGA TCT GGA CAA TGA CGG TTA CGG A 3') y PARA4 (5'CGC GGC ACG GCT CTT GTT 3') para la primera reacción de PCR (Erume y col., 2001), obteniendo un primer producto de 563 pares de bases (pb), para la segunda amplificación 3 µl de la primera reacción con los oligonucleótidos PARA2 (5' GCC GCG CTG CTG GAG TTA A 3') y PARA3 (5' AGC GTC TTT GGC GTC GGT CTT G 3') obteniendo un producto final de 210 pb (Jaimes y col., 2005). Para la primera reacción se utilizaron 3 µl de ADN proveniente de heces de ovinos, las condiciones para 50 µl de reacción fueron: Amortiguador de reacción 67 Mm (*Biogenica*), MgCl₂ 2 mM (30 mM, *Biogenica*), dNTP's 200 mM c/u, (*Biogenica*), 25 pMol de los iniciadores PARA 1 y PARA 4 (*Invitrogen*), 1 U de ADN polimerasa termoestable (5 U/µl, *Biogenica*), y 34.75 µl de agua. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (*Termo electrón corporation*) con el siguiente programa:

Una desnaturalización inicial de un ciclo a 95 °C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos a 95 °C por 1 minuto para la desnaturalización, 65 °C por 1 minuto para la alineación, 72 °C por 1 minuto para la amplificación y una extensión final a 72 °C por 5 minutos.

Las condiciones de la PCR anidada para 50 µl de reacción son las siguientes:

3 µl como plantilla de la primera reacción de PCR, amortiguador de reacción 67 Mm (*Biogenica*), MgCl₂ 2mM (30 mM, *Biogenica*), dNTP's 200 mM c/u, (*Biogenica*), 25 pMol de los iniciadores PARA 1 y PARA 4 (*Invitrogen*), 1 U de ADN Polimerasa Termoestable (5 U/µl, *Biogenica*), y 34.75 µl de agua con las siguientes condiciones:

Una desnaturalización inicial de un ciclo a 95 °C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos a 95 °C por 1 minuto para la desnaturalización, 65 °C por 1 minuto para la alineación, 72 °C por 1 minuto para la amplificación y una extensión final a 72 °C por 5 minutos.

Los productos finales de la amplificación fueron visualizados en un gel de agarosa al 2% utilizando una cámara de electroforesis (*Gibco BRL electrophoresis supply, model 250*) a 75 voltios por 30 minutos (Jaimes y col., 2005).

8. RESULTADOS.

8.1. Elaboración del antígeno.

Una vez resuspendido el antígeno se determinó su concentración de proteínas utilizando el kit comercial *Micro BCA Protein Assay Reagent Kit*, se hizo la lectura a una absorbancia de 460 nm obteniendo un promedio de 104.7 $\mu\text{g/ml}$, mientras que el antígeno comercial tuvo una concentración de proteínas promedio de 224.2 $\mu\text{g/ml}$. En el gel de poliacrilamida se visualizaron 10 bandas en el antígeno comercial, de las cuales dos bandas no se observaron en el antígeno obtenido por sonicación, las cuales correspondieron a 82.6 y 48.7 kDa (Figura 1); sin embargo, el perfil de proteínas es muy similar en ambos antígenos ya que coinciden ocho bandas, que presenta el antígeno obtenido, por diez bandas que expresa el antígeno comercial en el gel de poliacrilamida.

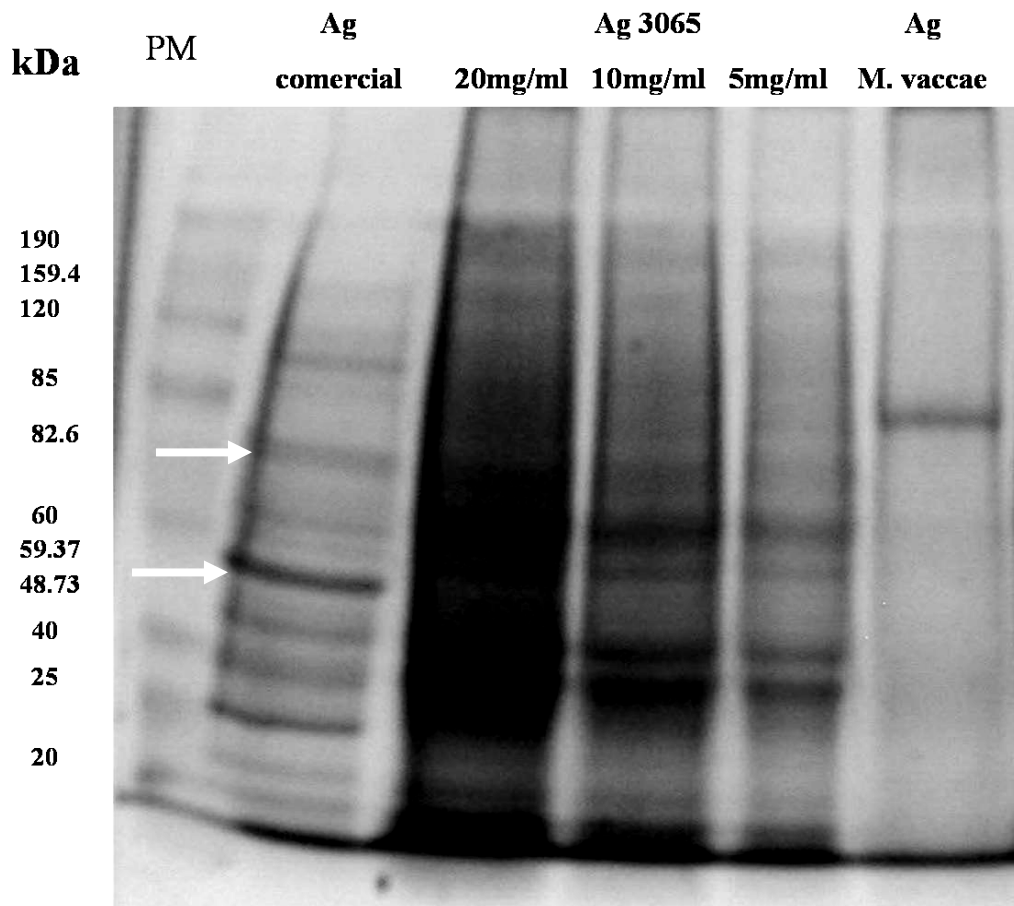


Figura 1. Perfil de proteínas de los antígenos comercial y sonicado. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Antígeno comercial. Carril 3: Antígeno obtenido por sonicación en dilución 20 mg/ml. Carril 4: Antígeno obtenido por sonicación en dilución 10 mg/ml. Carril 5: Antígeno obtenido por sonicación en dilución 5 mg/ml. Carril 6: Antígeno obtenido por sonicación en dilución 5 mg/ml gel de poliacrilamida al 10%.

Al realizar la evaluación de las diferentes concentraciones del antígeno en la prueba de IDGA con los sueros negativos, se observó que las diluciones más eficaces fueron a 10, 15 y 20 mg/ml, ya que en éstas se pudo observar la formación de bandas de precipitación. Las bandas de 15 y 20 mg se observaron muy gruesas, mientras que la de 10 mg se observó clara y con una mejor definición entre el pozo del antígeno y el suero, por lo que se optó por utilizar la concentración de 10 mg/ml para la realización de todas las pruebas de IDGA posteriores (Figuras 2, 3 y 4).

En cuanto a los sueros negativos, no se observó la formación de bandas de precipitación.

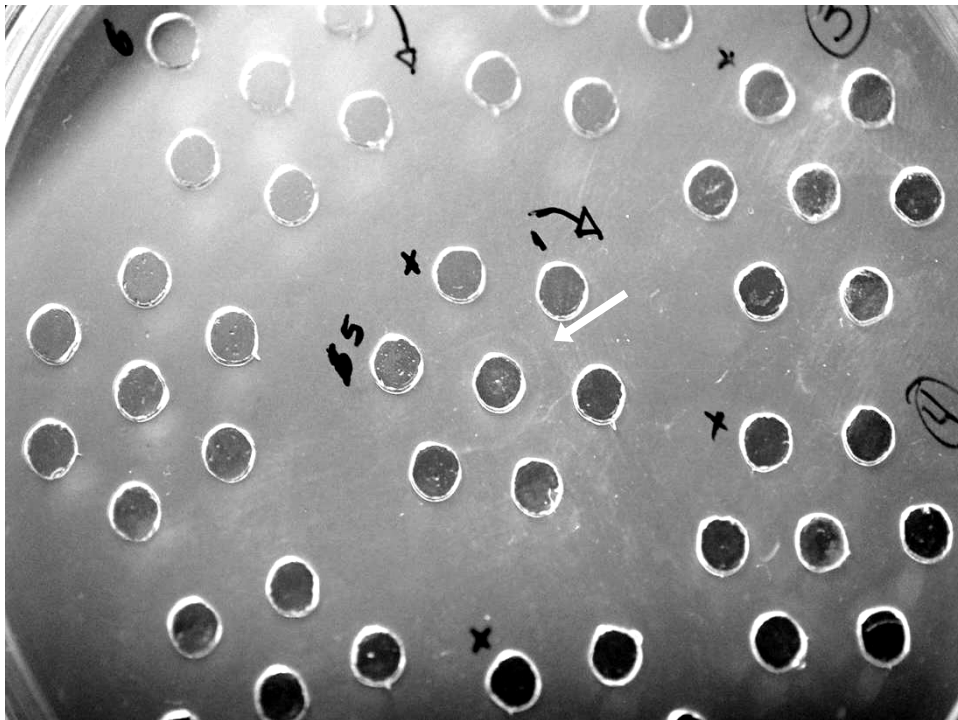


Figura 2. Prueba de inmunodifusión en agar gel. Banda de precipitación de los sueros controles positivos (flecha) en la roseta número 5 que corresponde a la dilución de 10 mg/ml (del antígeno sonicado).

8.2. Determinación de sensibilidad y especificidad.

Comparando la PCR anidada con la prueba de IDGA, se obtuvo una sensibilidad y especificidad del 85.7% y 73.6%, mientras que para el antígeno comercial fue del 88% y 100%, respectivamente. Por otro lado, se determinó la concordancia entre las dos pruebas (Kappa) obteniendo un resultado de $k=0.41$, el cual es considerado como bueno (Cuadro 2). Por otro lado, la prueba que se realizó con sueros de animales inoculados con *M. vaccae* y *M. bovis* para descartar reacciones cruzadas y los positivos a brucelosis no se observaron bandas de precipitación.

Cuadro 2. Resultados de concordancia, especificidad y sensibilidad entre la las pruebas de inmunodifusión en agar gel y la reacción en cadena de la polimerasa anidada en muestras de heces de los ovinos.

		PCR ^a		Total
		+	-	
IDGA ^b	+	24	19	43
	-	4	53	57
Total		28	72	100

Kappa = 0.41

Se^c = 85.7%

Es^d = 73.6%

^a Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés *Polimerase Chain Reaction*).

^b Inmunodifusión en gel de agar.

^c Sensibilidad.

^d Especificidad.

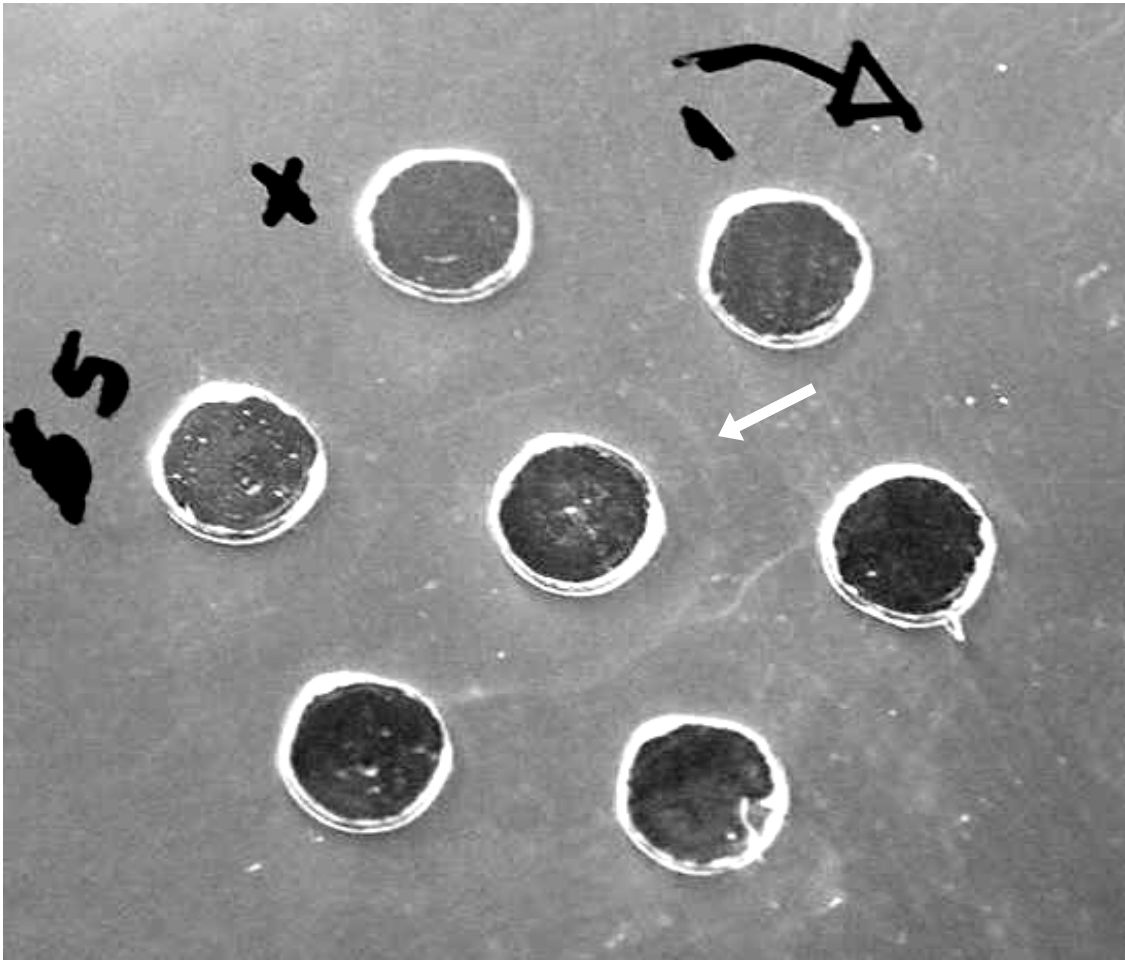


Figura 3. Prueba de inmunodifusión en agar gel: (Aumento de la imagen anterior)
Roseta número 5: Se observa mejor definida la banda de precipitación continua.

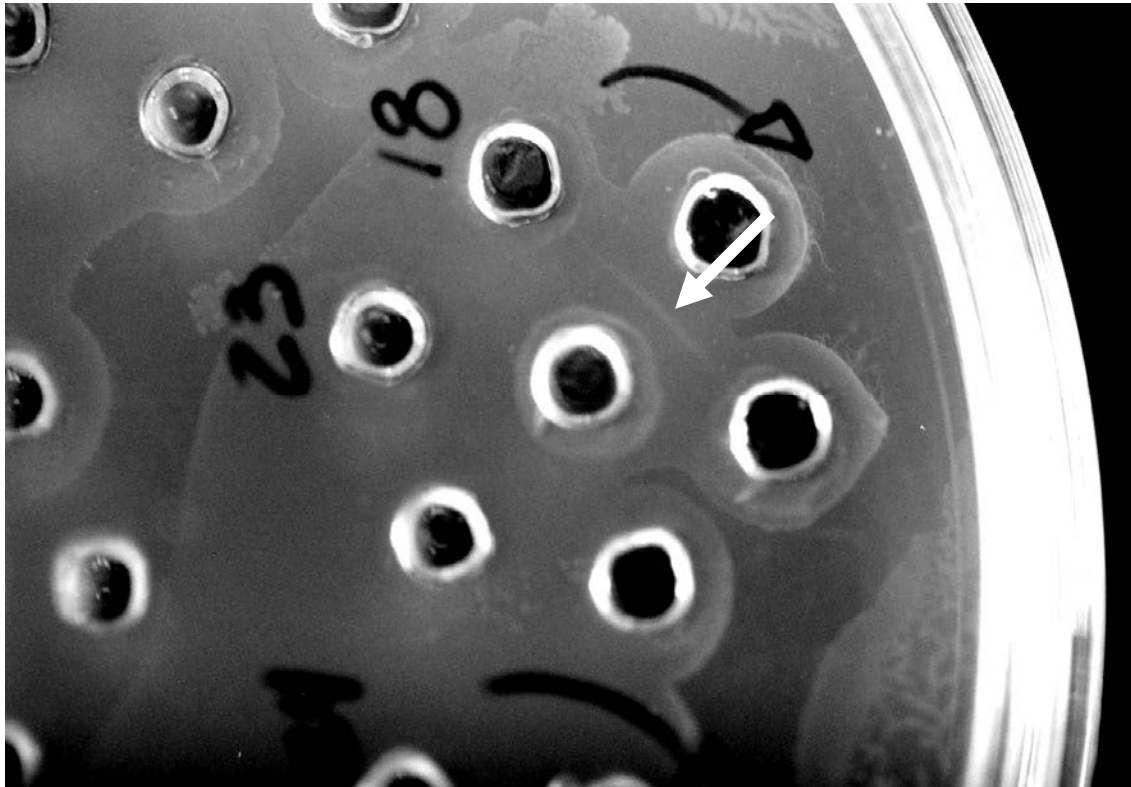


Figura 4. Prueba de inmunodifusión en agar gel con el antígeno obtenido por sonicación con la dilución de 10 mg/ml. Se observa solo una banda de precipitación (flecha).

8.3. Prueba de inmunodifusión en agar gel (IDGA).

Se realizó la prueba de IDGA con el antígeno comercial a todos los sueros de los muestreos hasta obtener un total de 100 sueros, los cuales fueron seleccionados para obtener 50 positivos y 50 negativos. Posteriormente fueron sometidos a la IDGA con el antígeno obtenido, y de los 50 positivos, 44 sueros (lo que representa un 80%) presentaron las bandas de precipitación a las 24 horas posteriores a la incubación (Figura 5), mientras que ninguno de los 50 sueros negativos se observaron bandas. Fue utilizado un control positivo en todas y cada una de las pruebas, con la finalidad de corroborar y reafirmar los resultados obtenidos.

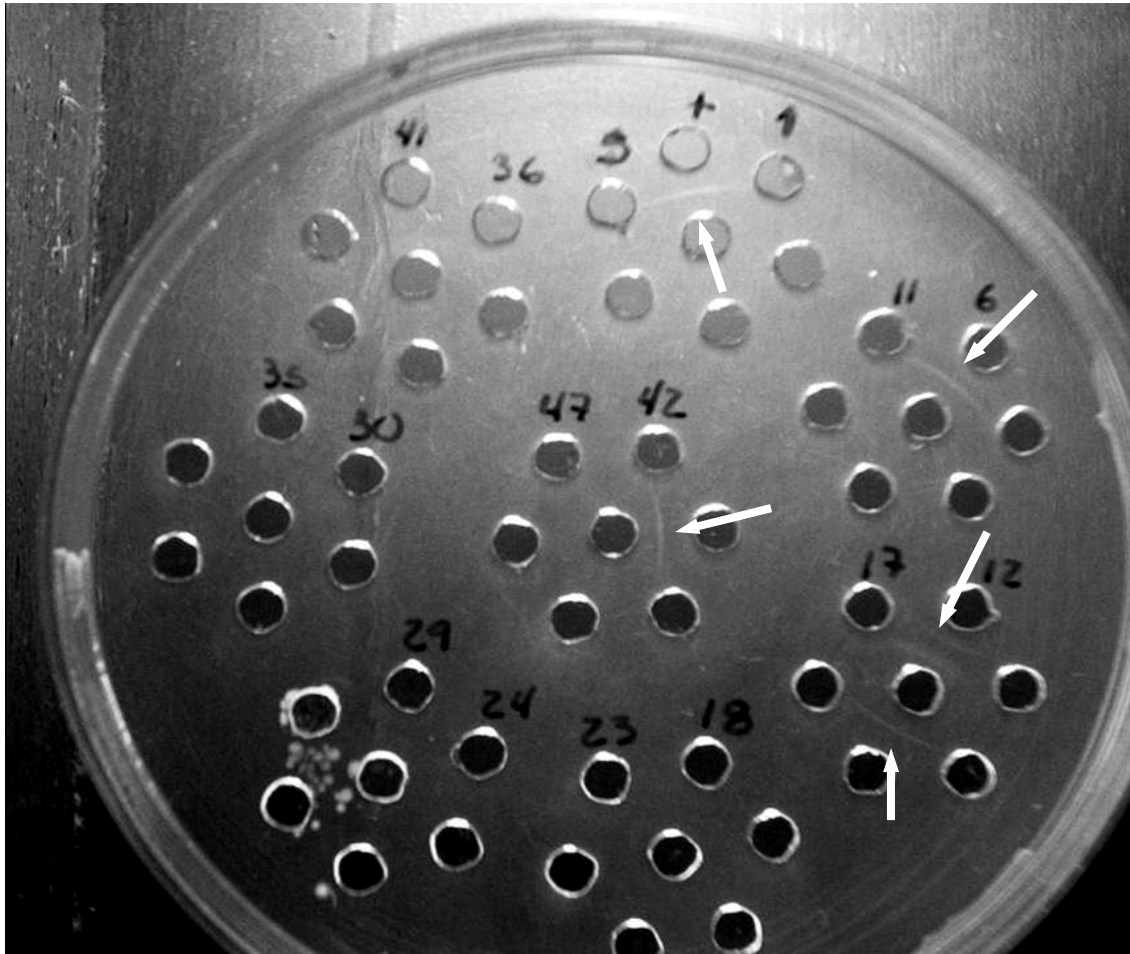


Figura 5. Prueba de inmunodifusión en agar gel. Evaluación de los sueros problema con una dilución de 10mg/ml del antígeno sonicado. Las flechas señalan las líneas de precipitación de los sueros que reaccionaron con el antígeno.

8.4. Aislamiento bacteriano.

Se realizó el cultivo bacteriológico de las 100 muestras de heces de los sueros analizados, de los cuales sólo se obtuvieron 15 aislamientos positivos, siendo todos positivos a la tinción de Ziehl-Neelsen (ZN) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Resultados de los cultivos en medio sólido Herrold yema de huevo adicionado con micobactina a partir de heces de los ovinos analizados.

ID ^a	Resultado	ID ^a	Resultado
11266	+	0017 AG	-
11250	+	0018 AG	-
11236	+	0020 AG	-
11297	+	005 AG	-

201	-	10595 AG	-
208	-	106621 AG	-
294	-	206607 AG	-
18	-	206614 AG	-
4055	+	206617 AG	-
4035	-	206620 AG	-
5076	-	206623 AG	-
2026	-	206625 AG	-
4039	-	6625 AG	-
191	+	206627 AG	-
174	+	474 AG	-
06AVQ	-	553 AG	-
SK macho AR	-	55509 AG	-
580FML	-	56553 AG	-
613FML	-	56565 AG	-
16 OAR	-	56569 AG	-
8CMS	-	56579 AG	-
33CMS	-	56600 AG	-
120JR	-	600601 AG	-
1114MSL	+	6622 AG	-
A733MSL	-	6625 AG	-
763MSL	-	67909 AG	-
586RLC	-	67917 AG	-
45RLC	-	67954 AG	-
77JR	+	905 AG	-
26JR	-	996 AG	-
96JR	+	MACHO C GRM	-
130JR	+	JEFE GRM	-
18JR	+	014Y GRM	-
13JR	-	47Y GRM	-
92JR	-	46-2 GRM	-
102AAG	+	11- A GRM	-
11AAG	+	02Z GRM	-
420AAG	-	A- 8 GRM	-
208AAG	-	34-A GRM	-
160	-	Z-03 GRM	-
140	+	245 GRM	-
91JR	-	C/3 A GRM	-
53CNZ	-	MACHO E GRM	-
15JR	+	A 38 GRM	-
3JR	-	Z- 24 GRM	-
107JR	+	03 Y GRM	-
102JR	-	44- A GRM	-
53JR	-	40-A GRM	-
101JR	+	11-Y GRM	-
2601CNZ	+	859 JAC	-

Total +	19		0
Total -	31		50

^a Número de identificación de cada animal.

8.5. Reacción en cadena de la polimerasa.

De las 100 muestras de heces probadas con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) estandarizada, en total amplificaron 29 obteniendo un producto final de 210 pb., las cuales correspondieron a los animales positivos a IDGA.

9. DISCUSIÓN.

La paratuberculosis es una enfermedad infectocontagiosa que ocasiona grandes pérdidas económicas en México y en todo el mundo (Myers, 1995; Harris, 2001; Jorge, 2005). Para lograr su control y erradicación debe contarse con pruebas de diagnóstico sensibles y específicas que sirvan como herramientas para detectar y eliminar fuentes infecciosas en las explotaciones, así como también evitar la movilización de animales enfermos que sirvan como diseminación de la misma.

Por tal motivo, el principal objetivo de este trabajo fue la elaboración y evaluación de un antígeno obtenido por medio de sonicación a partir de la cepa de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* para ser probado en la prueba de inmunodifusión en agar gel (IDGA), la cual demostró ser adecuada en comparación a los resultados obtenidos a partir de los sueros evaluados por IDGA con un antígeno comercial.

En el perfil electroforético se visualizaron 10 bandas en el antígeno comercial, de las cuales dos no se observaron en el antígeno obtenido por sonicación y corresponden a 82.6 y 48.7 kDa. Esto pudo deberse a que la cepa 18 que es la utilizada para la elaboración del antígeno comercial es obtenida a partir de un aislado de bovino (Sherman, 1984), en comparación a la cepa utilizada para este trabajo, la cual fue obtenida de un caso clínico de ovino.

Por otra parte, la concentración de proteínas en el antígeno obtenido por sonicación fue menor a la del antígeno comercial. Esta diferencia podría deberse al método de obtención, ya que para el antígeno comercial se utiliza una prensa hidráulica (*Prensa de French*) (Sherman y Gezon, 1984, Manual OIE, 2000), en donde las células son sometidas a una gran presión mientras pasan por un pequeño orificio hacia una cámara con baja presión, ocasionando su ruptura por descompresión y pulverizándola por completo. Este método permite obtener no solo proteínas del protoplasma, sino que también de la pared celular, mientras que la obtención del antígeno por la técnica de sonicación sólo ocasiona la ruptura de la pared y la membrana celular y posteriormente por centrifugación se eliminan los detritos celulares.

De los 50 sueros probados con el antígeno obtenido por sonicación, sólo 44 sueros (88%) reaccionaron formando las bandas de precipitación. La falta de detección de los 6 (12%) sueros restantes se puede deber a que esta prueba tiene una sensibilidad inmunológica baja, ya que se requiere al menos 0.03mg/ ml de anticuerpos para

reaccionar con el antígeno (Morilla y González-Vega, 1984), por otro lado Myers (1995) indica que un exceso de anticuerpos en la reacción ocasiona una inhibición de la precipitación debido a que todos los epítopes del antígeno son cubiertos por los anticuerpos, otra razón podría ser un exceso de antígeno en la reacción provocando de igual manera la inhibición de la precipitación, tomando estos razonamiento se puede decir que por la menor cantidad de proteínas del antígeno obtenido por sonicación en relación con el antígeno comercial, es probable que la cantidad del antígeno no permita la formación de precipitados en los sueros que no reaccionaron.

La sensibilidad obtenida en el antígeno elaborado fue del 85.7% comparado con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada. Diversos trabajos han demostrado una sensibilidad de la prueba IDGA comparando con diagnóstico histológico del 66% (Gwòdz y col., 1997), mientras que otros la describen entre el desde el 38 al 57% (Hope y col., 2001; Ferreira y col., 2002). En este caso, la comparación de esta técnica frente a una prueba altamente específica y sensible como es la PCR anidada, valida su uso como una herramienta útil en el diagnóstico de la paratuberculosis, ya que la sensibilidad obtenida se considera relativamente alta en comparación con otros autores. La sensibilidad de la prueba puede ser elevada en animales con lesiones lepromatosas, aquellos que presenten signos clínicos, con enfermedad crónica o aquellos que estén eliminando grandes cantidades de bacterias. Por consecuencia, la principal limitación de estas pruebas es la incapacidad de detectar animales en etapas tempranas de la enfermedad (Harris y Barleta, 2001).

Por otro lado, la especificidad de la IDGA con el antígeno obtenido por sonicación fue del 72.6%. Se han reportado resultados que varían entre el 99 al 100% comparados por diagnósticos histológicos (Gwozdz y col., 1997; Hope y col., 2001; Ferreira y col., 2002), en donde se ha observado que las pruebas serológicas son altamente específicas con una baja frecuencia de falsos positivos (Harris y Barleta, 2001). Se debe considerar la posibilidad de que se presenten falsos negativos en la prueba de IDGA debido a que se pueden encontrar animales en estadios terminales de la enfermedad y por lo tanto no hay producción de anticuerpo (Radostits y col., 2002), sin embargo, la sensibilidad es buena. Al evaluar el antígeno con sueros que eran positivos a otras enfermedades como brucelosis, inoculados con *M. vaccae* mostró que la especificidad fue buena, ya que en ningún caso se observaron bandas de precipitación con estos sueros y así evitar reacciones cruzadas.

Yokomizo (1983) reporta que para eliminar las reacciones cruzadas en el diagnóstico de paratuberculosis utilizando la técnica de ELISA, se utiliza *Mycobacterium phlei* como agente de captación de anticuerpos no específicos. Este paso pudiera ser una alternativa para usarse en la prueba de IDGA y mejorar la sensibilidad y especificidad de la prueba.

En general, se considera que el método por el cual se elaboró el antígeno es fácil de realizar, ya que es rápido y requiere de material que normalmente se tiene en un laboratorio de diagnóstico, por lo que el costo de producción y mano de obra se ve reducido. Del mismo modo, el único requerimiento indispensable es el conocimiento para operar el sonicador, mientras que las limitantes más importantes son la adaptación de la cepa de *M. avium* subs. *paratuberculosis* al medio líquido enriquecido y el tiempo de incubación, el cual es como mínimo cuatro semanas para obtener gran cantidad de bacterias y al mismo tiempo, un antígeno de buena calidad con una concentración de proteínas óptima. Por tal motivo, se tienen que desarrollar nuevas líneas de investigación que permitan obtener un antígeno con una cantidad y calidad adecuadas.

A pesar de que los medios de cultivo se dejaron bajo condiciones de 37°C durante más de un año, sólo 15 cultivos de los 100 resultaron positivos. El aislamiento bacteriano en medio sólido es considerado como “la prueba de oro” para el diagnóstico de la paratuberculosis, pero este requiere de mucho tiempo para observar el desarrollo de las colonias, está sujeto al error humano, se requiere la elaboración de los medios, presenta riesgos de contaminación y se requiere almacenar las muestras de heces para su procesamiento (Kim y col., 1989). Este método tiene una baja sensibilidad, la cual es reportada del 50%, pero con una especificidad que puede llegar a ser del 100% (Yayo y col., 2001). Por esto no se descarta que la falla en el aislamiento bacteriano o la baja frecuencia de detección en este trabajo se haya debido a la baja sensibilidad que presenta la prueba y a las diversas dificultades que representa su elaboración. Sin embargo, se debe señalar que los cultivos positivos a *M. avium* subs. *paratuberculosis* se obtuvieron de las explotaciones ovinas donde se presentaron por lo menos un caso positivo a la prueba de IDGA, por lo que se puede indicar que la enfermedad está presente en el rebaño.

La técnica de PCR es un método específico y rápido en la detección del *M. avium* subs. *paratuberculosis*, sin embargo, los niveles de sensibilidad se reducen en las muestras de heces, ya que son más difíciles de trabajar y la presencia de sustancias inhibitoras las cuales pueden ser polisacáridos y células epiteliales de descamación

como consecuencia de la mucosa engrosada asociada a los estados avanzados de la enfermedad, pudieran interferir en la técnica (Gwózdź y col., 1997; Erume y col., 2001; Stabel y Benentine, 2005), esto en adición a que la eliminación del microorganismo es de manera intermitente y en estados avanzados de la enfermedad (Paolicchi y col., 2003). Por este motivo se puede decir que sólo 28 muestras de heces de un total de 100 (28%) amplificaron en la PCR anidada.

Al no disponer de un antígeno nacional para la realización de diagnósticos serológicos de paratuberculosis, este trabajo fue realizado con la finalidad de evaluar un método de obtención de un antígeno de manera sencilla y económica en el laboratorio. Al final, fue posible cumplir con la hipótesis planteada y obtener un antígeno por sonicación con resultados satisfactorios en comparación con un antígeno comercial y con técnicas moleculares, ya que el antígeno reaccionó con sueros positivos obtenidos de animales clínicamente afectados de paratuberculosis de forma evidente. Las líneas de precipitación formadas y el tiempo en el cual aparecen, indican que es una importante línea a seguir para la obtención de un antígeno eficiente que detecte sueros que reaccionen a paratuberculosis.

10. CONCLUSIONES.

- El antígeno de *Mycobacterium avium* subs. *paratuberculosis* obtenido mediante sonicación permitió dar un resultado acertado por lo que puede ser utilizado en la prueba de inmunodifusión en agar gel (IDGA).
- La cantidad y concentración de proteínas del antígeno permite la formación de bandas de precipitación (antígeno-anticuerpo) visibles y bien definidas.
- La sensibilidad y especificidad del antígeno en la prueba de IDGA son satisfactorias debido a que son similares al antígeno comercial, por lo que este antígeno puede ser utilizado para el diagnóstico de la paratuberculosis ovina.
- Dado que en México el diagnóstico de la paratuberculosis por IDGA se lleva a cabo con un antígeno protoplasmático de importación, se incrementan los costos de producción de la prueba, por lo que la elaboración de este antígeno protoplasmático a nivel laboratorio será de utilidad para establecer el diagnóstico de la enfermedad, y al mismo tiempo se tendrá la posibilidad de que la técnica sea transferida a laboratorios de sanidad animal y de esta forma se disminuirán los costos que representa la importación del antígeno.

13. APÉNDICE DE REACTIVOS UTILIZADOS.

Cloruro de benzalconio (Zephiran).

Zephiran 17% (<i>Winthrop Laboratories</i>)	1.8 ml
Agua destilada	98.2 ml

PBS

NaCl (Cloruro de sodio)	8.5 g
Na ₂ HPO ₄ (Fosfato de sodio bibásico)	1.1 g
NaH ₂ PO ₄ (Fosfato de sodios monobásico)	0.32 g
Agua destilada	1000 ml

Gel de agarosa.

PBS	50 ml
Agar noble	0.5 g
Azida de sodio 0.2%	1 ml

Medio de yema de huevo de Herrold con micobactina.

Peptona	9 g
Cloruro de sodio	4.5 g
Agar noble	15.3 g
Extracto de carne (<i>Difco</i>)	1.7 g
Glicerina	27 ml
Agua destilada	870 ml
Hidróxido de sodio (NaOH) 4%	4.1 ml (aprox.)
Micobactina	4 ml
Yema de huevo	6
Verde de malaquita 2%	5.1 ml
Amfotericina B	50 mg

Medio de Proskauer y Beck modificado con 5% de suero equino.

L-Aspargina	5 g
Fosfato de potasio monobásico	5 g
Sulfato de potasio	5 g

Glicerina	20 ml
Agua destilada	930 ml
Citrato de magnesio	1.5 g
Suero equino (estéril)	50 ml

Fushina fenicada.

Fushina Básica saturada	10 ml
Fenol 5%	90 ml

Alcohol ácido.

Ácido clorhídrico (concentrado)	3.2 ml
Alcohol etílico	97 ml

Verde brillante.

Verde brillante	1 g
Hidróxido de sodio 0.01%	100 ml

14. BIBLIOGRAFÍA.

1. Abalos P., 2006 Actualidad en paratuberculosis. Facultad de ciencias veterinarias y pecuarias, Universidad de Chile
2. Carter GR, Chengappa MM., 1994. Bacteriología y micología veterinaria... Manual moderno, México D.F. 103-105.
3. Chung Zee Y, Biberstein E., 1994. Tratado de microbiología veterinaria. Acribia, España. 229-230
4. Clark CJ, Little D., 1996. The pathology of ovine paratuberculosis: Gross and histological changes in the intestine and others tissues. J. Comp. Pathol.; 114:419-427.
5. Erume J, Spergser J, Rosengarten R., 2001. Rapid detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from cattle and zoo animals by Nested PCR. African Health Sciences. 1 (2): 83- 89.
6. Ferreira R, Fonseca LS, Lilembaum W., 2002. Agar gel immunodifusion test (AGID) evaluation for detection of bovine paratuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. Lett Appl Microbiol. 35 (3):173-175.
7. Gwózdź JM, Reichel MP, Murray A, Manktelow W, West D. M., 1997. Thompson KG. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in ovine tissues and blood by the polymerase chain reaction. Vet Microbiol. 57 (2-3): 233-244.
8. Harris NB, Barleta RG, 2001. *Mycobacterium avium* subs. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. Clinical Microbiology Reviews. 489-512.
9. Hernández, VVC 1991 Ensayo de una bacterina subcutánea de *Mycobacterium paratuberculosis* en un rebaño ovino infectado naturalmente. Tesis de Maestría en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán- UNAM.
10. Herboe M, Harald GW, Ulvund G, Lund-Pedersen B., 1998, Andersen ÅB, Hewinson RG, Nadai S. MPB70 and MPB83 as indicators of protein localization in mycobacterial cells. Infection and Immunity. 66:289-296.
11. Hope AF, Kluver PF, Jones SL, Condrón RJ, 2000. Sensitivity and specificity of two serological tests for the detection of ovine paratuberculosis. Aust. Vet. J. 78 (12): 850-856.

12. Jaimes-Mejía N., O. Hernández C., D. Córdova, C. Guzmán, B. Arellano, E. Díaz, V. Tenorio, J. Cuéllar, A. Romero, M. Santillán. 2005. Aplicación de la PCR-Anidada para el diagnóstico de Paratuberculosis a partir de heces de ovino. Memorias XII Congreso de Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. Morelos, México. P. 67.
13. Jorge MC, Traversa MJ, Schettino DM, Fresneda K, Mendivil Iparraguirre M, 2005. Epidemiología e importancia económica de la paratuberculosis bovina. <http://www.portalveterinaria.com/modules.php?name=Articles&file=article&sid=438>.
14. Kim YG, Bech-Nielsen S, Gordon JC, Slemons RD, Spangler E., 1989. Comparison of two methods for isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples. Am. J Vet Res. 7 (50): 1110-1113.
15. Körmendy B, 1994. The effect of vaccination on the prevalence of paratuberculosis in large dairy herd. Veterinary microbiology. 41:117-125.
16. Kreeger JM, 1991. Ruminant paratuberculosis- a century of progress and frustration. J. Vet. Diagn. Invest. 3:373-383.
17. Manual of standards OIE. 2000. Diagnostic Tests and Vaccines, part 2.*
18. Matthews JG, House, C. 1999. Diseases of the goat. 2nd ed. Reino Unido: Blackwell science. 111-114.
19. Mayers RL. 1995. Immunology: A laboratory manual 2nd Edition. E.U.A. Brown publisher, pp 29-38,49-52.
20. Merkal RS. 1973. Aislamiento bacteriano. JVMA. 163 (9): 1100-1102.
21. Morilla GA, González-Vega D, 1984. Introducción al diagnóstico inmunológico de las enfermedades de los animales domésticos. INIFAP, Biotecnología industrial, SAGARPA. 11, 27-35.
22. Morilla AG, Bautista CR, 1986. Manual de inmunología. Editorial Diana técnico, México. Primera edición. 51-62.
23. Oviedo, FG. 1991. Ensayo de una bacteria oral de *Mycobacterium paratuberculosis* en un rebaño ovino infectado naturalmente. Tesis de Maestría en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-UNAM.
24. Paolicchii FA, Zumarraga MJ, Gioffre M, Zamorano P, Morsella C, Verna A, Cataldi A, Alito A, Romano A, 2003. Application of different Methods

for the diagnosis of paratuberculosis in a dairy cattle herd in Argentina. J vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 50 (1): 20- 26.

25. Payeur JB, Jarnagin JL, Marquardt JG, Schaper LA, Martin BM, 1992. Métodos de laboratorio en micobacteriología veterinaria para el aislamiento e identificación de micobacterias. Laboratorios nacionales de servicio veterinario, Departamento de agricultura de los Estados Unidos, pp 42-48.
26. Quinn PJ, Markey BK, 2002. Veterinary microbiology and microbial disease. Blackwell science. 103-105.
27. Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hincholiff KW, 2002. Medicina veterinaria. Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. Vol. 1. 9ª ed. México: McGraw-Hill. 1098-1099.
28. Toman M, Faldyna M, Pavlik, 2003. Immunological characteristics of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. República Checa: Vet. Med. 147-154.
29. Scanlan Ch. 1991 Introducción a la bacteriología veterinaria. Ed. Acribia, España. 340-353.
30. Sherman DM, Gezon HM, 1980. Comparison of Agar Gel Immunodiffusion and fecal culture for identification of goats with paratuberculosis. Journal of the American Veterinary Medical Association. 177:1208-1211.
31. Sherman DM, Bray B, Gay JM, Bates F, 1989. Evaluation of the agar gel immunodiffusion test for diagnosis of subclinical paratuberculosis in cattle. Journal Veterinary Research. 50 (4): 525-530.
32. Sherman DM, 1984. Prueba de inmunodifusión en agar. JVMA. 179-182.
33. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC, 1985. Measurement of protein using biciconinic acid. Anal Biochemical. 150: 76-85.
34. Stabel J R, Benentine J P. 2004 Development of a Nested PCR meted targeting e unique multicopy element, ISMao02, for detection *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fecal samples. J. Vet. Diagn. Invest. 1622-30.
35. Sweeny RW, 1996. The veterinary clinics of North America, food animal practice. Paratuberculosis (Johne's disease). Vol. 12, No. 2 W.B. Saunders company. Estados Unidos.

36. Vélez MH, 1995. Comparación de diferentes técnicas de diagnóstico en paratuberculosis caprina. (Tesis de maestría). México D.F. Facultad de medicina veterinaria.
37. Yayo W, Pavlik I, Machackova M, 2001. The transmission and impact of paratuberculosis infection in domestic and wild ruminants. *Vet. Med.* 46:205-224.
38. Yokomizo YY, Merkal RS, 1983. A method for avoiding false-positive reactions in enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for diagnosis of bovine paratuberculosis. *Pro int coll res PTB. Ames Iowa.* 16-18:94.