



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

DESARROLLO DE UNA ELISA PARA EL DIAGNOSTICO DE  
PARATUBERCULOSIS EN BOVINOS

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

P R E S E N T A :

**ADRIANA GUADALUPE MARTÍNEZ COVARRUBIAS**

Asesores:

M.C. Miguel Ángel Blanco Ochoa

M.C. Marco Antonio Santillán Flores



MÉXICO, D.F.

2009



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.

## DEDICATORIA.

“En el amor desinteresado de un animal, en el sacrificio de sí mismo, hay algo que llega directamente al corazón del que con frecuencia ha tenido ocasión de comprobar la amistad mezquina y la frágil fidelidad del hombre natural”

Edgar Allan Poe.

A mi madre. Porque sin tu apoyo este sueño no se podría haber realizado, por estar siempre a mi lado, por tu apoyo y por darme siempre lo mejor que tienes. Este logro también es tuyo. Te amo mamá.

A mi padre. Por darme la mejor lección de vida que eh tenido. Por demostrarme que sin importar lo difícil que parezca, siempre se puede lograr. Te amo papá.

A Enia. Por ser mi hermana y mi mejor amiga y por hacer de mi vida, con tu compañía, una vida más feliz. Te amo hermanita.

A Aldo. Porque en todo este tiempo me has apoyado, me has sostenido en esos momentos difíciles y simplemente por estar a mi lado. Te amo :)

A mis mejores amigas y amigos, A Claudia, Fabiola, Berenice, Raúl y Charly, porque aunque lejos, siempre me han mostrado su cariño y apoyo.

A todos mis amigos: Maritere, Socorro, Caro, Jonathan, Armando, Aboites, Alejandra, Fabiola y Stivalis.

Y a toda mi familia, a mis abuelos, a mis primos y tios. Gracias por ser parte de mí.

## **AGRADECIMIENTOS.**

A mis asesores por creer en mí.

Al doctor Marco, por toda su paciencia, por sus enseñanzas y por guiarme en esta importante etapa de mi vida.

Al doctor Miguel Ángel, por todo su apoyo en la realización de esta tesis.

A Sonia, porque siempre me ayudaste en todo lo que necesitaba y por mostrarme una sonrisa durante cada día de todo este tiempo. Gracias Soni.

Al doctor Efrén, Dionicio, Lucy, Claudia, Victor Tenorio, Laura Hernández y Francisco Aguilar, por sus enseñanzas y ayuda durante estos tres años.

A la UNAM, por darme todos los conocimientos que tengo sobre esta maravillosa carrera.

Al INIFAP, por darme la oportunidad de realizar mi trabajo.

A todos mis maestros, por todas sus enseñanzas.

Trabajo parcialmente financiado por CONACYT-SAGARPA 48176

Convocatoria 2006

Alumno Becario.

## CONTENIDO

	Página.
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
MATERIAL Y MÉTODOS.....	20
RESULTADOS.....	27
DISCUSIÓN.....	37
CONCLUSIONES.....	42
GLOSARIO.....	43
APÉNDICE.....	44
REFERENCIAS.....	48

**RESUMEN.**

**Martínez Covarrubias Adriana Guadalupe. DESARROLLO DE UNA ELISA PARA EL DIAGNOSTICO DE PARATUBERCULOSIS EN BOVINOS. (Bajo la dirección de MC Miguel Ángel Blanco Ochoa y MC Marco Antonio Santillán Flores)**

El objetivo fue estandarizar un ELISA con antígeno protoplasmático de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Maptb*) cepa 3065 para el diagnóstico de paratuberculosis en bovinos. Se trabajó con una concentración de suero, antígeno y conjugado de 1:160, 1.25 µg/100 µl y 1:2000, respectivamente. El punto de corte se estableció con un intervalo de confianza del 95% y dos desviaciones estándar. Para determinar la sensibilidad y especificidad de la prueba se trabajó con 491 sueros de bovinos los cuales se compararon con un ELISA comercial, con el aislamiento bacteriológico, y con la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) anidada utilizando las heces de los mismos animales, las pruebas fueron evaluadas mediante la prueba de kappa (k). El promedio de la lectura de los sueros controles positivos fue de 0.445 OD y en el caso de los sueros negativos fue de 0.150 OD, el punto de corte fue de 0.196 OD; la sensibilidad, especificidad e índice de concordancia al compararla con el ELISA comercial fue de 71%, 97% y 0.73 y al compararla con el aislamiento y la PCR fue de 86%, 90% y 0.47 y de 71%, 93% y 0.61, respectivamente. Los resultados obtenidos muestran que el ELISA propuesto detectó a los animales positivos a paratuberculosis, por lo que puede ser considerada como una alternativa para el diagnóstico de la enfermedad de Johne en bovinos.

## INTRODUCCIÓN.

### DEFINICIÓN Y ETIOLOGIA.

La paratuberculosis es una enteritis granulomatosa de curso crónico que afecta en especial a rumiantes, como bovinos, ovinos, caprinos, antílopes, camellos, llamas, entre otros, en la mayoría de los países del mundo, donde su prevalencia varía de 5% a 25% (1). El *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (*Maptb*) también se multiplica en caballos y mulas, los cuales son excretores asintomáticos (2). Se caracteriza por diarreas crónicas persistentes o recurrentes que no responden a ningún tratamiento (3,4). La enfermedad esta categorizada por la Oficina Internacional de Epizootias (OIE) como una enfermedad de la lista B, “enfermedades transmisibles consideradas de importancia socioeconómica y/o para la salud pública en ciertos países y que son significativas en el mercado internacional de animales y sus productos” (OIE, 2004) (7). En el caso de nuestro país, de acuerdo con la SAGARPA, la paratuberculosis se encuentra dentro del grupo 3, el cual está constituido por aquellas enfermedades que se encuentran presentes en territorio nacional, consideradas como enzoóticas pero que representan un menor riesgo desde el punto epidemiológico, económico, de salud pública y de comercio nacional e internacional, son de notificación mensual obligatoria a las autoridades competentes de sanidad animal del país (8).

Fue descrita por primera vez en 1895 por H.A. Johne y L. Frothingham, quienes demostraron la relación entre la enteritis en bovinos con la presencia de un bacilo en secciones de la mucosa del intestino (2). En México se diagnóstico por primera vez en ganado bovino, en 1936 mediante pruebas de



intradermorreacción realizadas por Unzueta y aislada por primera vez en ganado lechero en 1979 por Ramírez y col. (9).

El agente causal de esta enfermedad es el *Maptb*. Es un bacilo ácido-alcohol resistente cuya característica la confiere su compleja pared celular, la cual es relativamente resistente al agua y rica en ácidos micólicos, péptidoglicano y arabinogalactano (lípidos) (4). Es anaerobio facultativo, intracelular (1) con un prolongado periodo de incubación, pudiendo tardar su crecimiento de cuatro a dieciséis semanas, mide de 1.5 a 2  $\mu\text{m}$  de largo por 0.5  $\mu\text{m}$  de ancho, no móvil, tiende a agruparse, produce colonias redondas de 1 a 5 mm de diámetro que pueden ser firmes y suaves, lisas o rugosas con una variación en su color que va del amarillo al naranja (9). El medio de elección para su crecimiento es el de Herrold adicionado con yema de huevo y micobactina (5).

El bacilo está clasificado dentro del complejo ***Mycobacterium avium-intracellulare***, en el cual se encuentran: ***M. avium*** subsp. ***avium***, ***M. avium*** subsp. ***paratuberculosis***, ***M. avium*** subsp. ***silvaticum*** y ***M. intracellulare*** y se diferencia de las otras subespecies del complejo por su dependencia de micobactina para su crecimiento *in vitro* y la estimulación de su crecimiento con piruvato (5, 10, 11). Es una bacteria resistente a condiciones ambientales y a desinfectantes suaves, puede permanecer viable 270 días en charcos, 11 meses en suelos fertilizados y 47 meses en materia orgánica desecada (4).

El bacilo es eliminado por heces de forma intermitente. Existen factores de riesgo para que se presente la enfermedad, como lo son: la producción intensiva, los suelos ácidos, una mala nutrición, estrés, lactancia prolongada (4), regiones con bajo pH del suelo y alto contenido de hierro (5), así como grado de parasitosis, la elevada producción láctea y el posparto (9).

## **TRANSMISIÓN.**

Los animales más susceptibles a infectarse son los menores de seis meses de edad, la paratuberculosis tiene un periodo de incubación largo, por lo que, los signos clínicos se observan, la mayoría de las veces, en animales mayores de dos años de edad, aunque ocasionalmente también en animales jóvenes de 4 meses de edad (12).

La principal fuente de infección entre los animales es por la vía oral, la cual puede ser a través de pastos, agua y alimento contaminados ya que los animales clínicamente enfermos excretan en forma masiva al agente con las heces (la concentración bacteriana en heces de animales infectados puede exceder  $10^8$  bacilos/ gramo (2) y la dosis infectante necesaria para becerros es de 50 a 1000 unidades formadoras de colonias (UFC) (13) o bien durante la lactancia, a causa de la contaminación de la ubre con heces y por la eliminación del microorganismo a través de la leche y calostro (9).

No puede excluirse una transmisión por semen o embriones infectados, pero tendría un papel secundario, se cuentan también con indicios de infección intrauterina, en especial cuando el animal preñado se encuentra clínicamente enfermo, ya que el bacilo puede aislarse a partir de tejidos fetales y cotiledones de vacas (5,9), la prevalencia de la infección intrauterina varia del 4.4% al 57.3% en fetos de vacas clínicamente enfermas y del 1.2% al 44.4% en animales con enfermedad subclínica (13).

Se estima que por cada caso clínico hay 25 casos subclínicos, de aquí la importancia de contar con pruebas de diagnóstico que puedan detectar a los animales infectados (4).

No se puede contestar en forma definitiva si *Maptb* puede ser considerado como una fuente de infección para el hombre, ya que suele resistir los procesos de pasteurización, es decir que tiene una mayor termorresistencia que *Mycobacterium bovis* (5), Se ha informado del posible papel etiológico del bacilo en la enfermedad de Crohn en humanos, una enfermedad inflamatoria intestinal. Esta posible relación, es basada en esporádicos aislamientos del organismo en tejidos (intestino y linfonodos) de pacientes con la enfermedad de Crohn y con pruebas de hibridación *in situ* con lo que se ha detectado la secuencia de inserción IS 900 en esos tejidos (14), esto es importante ya que podría tratarse de un problema de salud pública.

## **SIGNOS CLÍNICOS.**

Aunque la infección usualmente ocurre en los primeros cinco meses de vida, los signos clínicos solo se desarrollan después de un largo periodo de incubación y generalmente aparecen entre los dos y cinco años de edad, sin embargo, los signos han sido observados en animales menores a 18 meses y mayores a diez años de edad. A este largo periodo de incubación se le atribuye el difícil control de la enfermedad ya que los animales con infección subclínica comienzan a transmitir la enfermedad y a excretar la micobacteria en las heces antes de progresar al estado terminal de la enfermedad. (11,15).

Los signos que se observan son diarrea, al principio intermitente, más tarde permanente, pérdida de la condición corporal con apetito que se mantiene, una drástica disminución de la producción de leche y edema ventral causado por hipoproteinemia (1). En vacas altas productoras se puede observar una aparente indigestión e inapetencia en la etapa temprana de la enfermedad

debido a una hipoproteinemia y una relativa deficiencia de calcio disponible. Una complicación que se puede presentar es el desplazamiento del abomaso, en la etapa moderada a severa de la enfermedad, pero la causa exacta de este desplazamiento es desconocida, pero la atonía gastrointestinal provocada por la hipocalcemia y la reducción en la ingestión de materia seca, pueden contribuir a esta condición (11). A medida que progresa la enfermedad, la pérdida de peso alcanza la emaciación, la masa muscular disminuye y el pelaje se torna seco. La producción láctea desaparece por completo y el animal muestra inapetencia y deshidratación (1). La temperatura corporal y signos vitales, se mantienen normales (5,11). La única anomalía detectada en el suero es la hipoalbuminemia. (11)

La paratuberculosis tiene cuatro fases durante el desarrollo de la enfermedad (16)

- Etapa I: animales resistentes no infectados: nunca se infectaron o desarrollaron inmunidad activa protectora que resultó en la eliminación completa de la enfermedad.
- Etapa II: animales portadores: son aquellos que son detectados por pruebas serológicas o cultivo a partir de heces. Desarrollan Inmunidad celular y principios de inmunidad humoral.
- Etapa 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, aumentan los anticuerpos y disminuye la inmunidad celular.

- Etapa IV: animales clínicamente enfermos: se presenta emaciación, edema submandibular, diarrea, son grandes diseminadores, tienen alta tasa de anticuerpos y baja inmunidad celular.

## **PATOGENIA.**

La respuesta a la infección por *Maptb* tiene una fuerte respuesta inmune mediada por células durante la etapa temprana y subclínica y una fuerte respuesta humoral durante las etapas finales de la enfermedad (13).

Después de la ingestión, la micobacteria penetra por endocitosis a las células M de las placas de Peyer en el íleon y son transportados en vacuolas dentro de los macrófagos, los ácidos micólicos, el péptidoglicano y el arabinogalactano, juegan un papel importante ya que resisten la degradación intracelular multiplicándose dentro del macrófago (4). Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> reconocen los péptidos que derivan de antígenos proteicos y son presentados por células presentadoras de antígenos. (17). La característica común y principal de todas las reacciones de inmunidad celular mediadas por linfocitos T, que en esencia provee inmunidad protectora y previenen el progreso de la enfermedad, es la presencia de linfocitos y macrófagos activados en la zona de depósito del antígeno (13).

Los subconjuntos mejor definidos de linfocitos T efectoras de la estirpe cooperadora CD4<sup>+</sup> son los linfocitos Th1 y Th2; el interferon gamma (IFN-gamma) es la citocina que caracteriza a los Th1, mientras que la interleucina (IL)4 e IL-5 son las que definen a los Th2. El IFN- gamma secretado por los linfocitos Th1 estimula una mayor diferenciación Th1 e inhibe la proliferación Th2. Por otro lado, la IL-4 producida por los linfocitos Th2 estimula la

diferenciación Th2 e IL-10, también sintetizada por las células Th2 inhibe la activación de los linfocitos Th1. El IFN-gamma producido por los linfocitos Th1 estimula la actividad microbicida de los fagocitos, lo que favorece la destrucción intracelular de los microorganismos fagocitados, por otro lado algunas citocinas sintetizadas por las células Th2, en especial IL-4, IL-3 e IL-10, antagonizan las acciones del IFN-gamma e inhibe la activación de los macrófagos, esta es la razón de que el desarrollo de una respuesta Th2, se asocia a una inmunidad celular deficiente frente a las infecciones por microorganismos intracelulares(17).

El reclutamiento de células en el sitio de infección es modulado por un complejo conjunto de citocinas y quimiosinas producidas por múltiples tipos de células, incluyendo macrófagos y células dendríticas. El factor de necrosis tumoral alfa (FNT alfa) es una citosina que parece ser crítica en el mantenimiento de la estructura del granuloma, los macrófagos y células dendríticas con una importante fuente de FNT alfa el cual actúa como una señal de retroalimentación positiva para que macrófagos y células dendríticas infectadas secreten más FNT alfa y citocinas, incluyendo IL-1 e IL-18. Estos mediadores proinflamatorios provocan un reclutamiento de linfocitos TCD4 y CD8, monocitos, neutrófilos y células natural killer (NK). El reclutamiento de estas células promueve la activación y producción de las citocinas y quimiosinas para amplificar la cascada de infiltración celular del sitio de infección y provoca la formación del granuloma. El FNT alfa coordina la cascada de infiltración celular (18).

Los animales con infección de tipo subclínica eliminan de forma intermitente a la bacteria en las heces. Después de varios años el animal desarrolla la fase

clínica de la enfermedad, la cual se caracteriza por la presentación de diarrea, pérdida de peso y elimina grandes cantidades del microorganismo por las heces. Este proceso está asociado con una reactividad de células T tipo I y tipo II, pero las causas aun no están bien conocidas. El grado en el cual la respuesta inmune determina la duración del período subclínico no esta muy claro aunque parece que la presencia de anticuerpos en el estado avanzado de enfermedad no es protectora. (13)

## **LESIONES.**

Las lesiones macroscópicas que la paratuberculosis ocasiona, se presentan sobre todo en el intestino delgado, principalmente en el íleon, y se caracterizan por un engrosamiento en la mucosa, con apariencia granular (4,9). Los linfonodos correspondientes se encuentran aumentados de tamaño debido a una reacción granulomatosa y edema (5,9).

Lesiones secundarias incluyen granulomas hepáticos y en el endocardio y mineralización de la aorta (12).

Las lesiones histológicas se localizan principalmente en el intestino delgado a nivel del íleon y yeyuno (9), microscópicamente estas lesiones son inflamación granulomatosa (5) que se caracterizan por la presencia de una gran cantidad de histiocitos, macrófagos y células epitelioides con ausencia de necrosis y fibrosis. (9,12).

Las lesiones granulomatosas se dividen en dos tipos: a) multibacilar (lepromatoso), que se caracteriza por carencia de organización, con una gran cantidad de macrófagos con abundantes bacilos e infiltración desorganizada de linfocitos, y b) el paucibacilar (tuberculoide), que se caracteriza por lesiones

nodulares, con células gigantes multinucleadas, macrófagos y linfocitos en su interior y escasez de micobacterias, rodeadas por tejido conectivo fibroso. Los granulomas de tipo multibacilar con características de lesiones entéricas que se desarrollan durante una infección con *Maptb*, estos granulomas pueden expandir la pared intestinal, provocando la pérdida eventual de la función de la mucosa intestinal. (9,19).

## **DIAGNÓSTICO.**

El diagnóstico se realiza por varios métodos, el cultivo bacteriológico es la prueba más utilizada y es confirmatoria, puede realizarse a partir de heces para identificar a los animales excretores y que son fuente potencial de infección para el resto de los animales, se sabe que posee una especificidad del 100% porque no produce resultados falsos positivos (9) y una sensibilidad estimada, de solo 38%, aproximadamente (20), la descontaminación de las muestras, la cual se requiere para remover la mayoría de los organismos de la flora intestinal, puede afectar la viabilidad de la micobacteria (2). El aislamiento puede tardar de cuatro a dieciséis semanas, además de que el medio de cultivo debe ser enriquecido con huevo, extracto de carne y micobactina (10).

La evaluación microscópica (frotis y tinción de Ziehl-Nielsen) de heces y de la mucosa rectal, tiene la ventaja de ser una técnica fácil de realizar, sin embargo, los resultados generalmente no son exactos (12) y el éxito de la prueba depende de la cantidad de micobacterias presentes en las heces (2).

La biopsia de la mucosa rectal se utiliza en casos clínicos avanzados, con un éxito que varía del 20% al 100%, pero tiene la desventaja de que es una técnica difícil de realizar y que requiere mucho tiempo, lo que significa un



problema cuando se tienen una gran cantidad de animales para diagnosticar(12).

Otra prueba que se utiliza para el diagnóstico es la prueba de Jonhina con Derivado Proteico Purificado (PPD) de *Maptb*, o también se puede emplear la prueba de tuberculina doble comparativa utilizando el PPD bovino y PPD aviar, ambas pruebas poseen una especificidad de 54% y una sensibilidad de 79 % (9). Una de las limitantes de esta prueba son las reacciones cruzadas que se puedan presentar debido a la presencia de micobacterias saprófitas.

La primer respuesta a la infección por *Maptb* es mediada por células, las cuales pueden ser detectadas con citocinas en muestras de sangre, la presencia de IFN- $\gamma$  puede ser medida con una ELISA, y la respuesta humoral puede ser detectada por pruebas serológicas como Fijación del Complemento o ELISA, que detectan anticuerpos circulantes (21).

Las pruebas basadas en la respuesta inmune humoral no resultan factibles durante etapas tempranas de la infección por que no se producen anticuerpos contra *Maptb* (20), pero su sensibilidad y especificidad son relativamente altas en animales clínicamente afectados (21).

Otra prueba diagnóstica es el análisis inmunoenzimático (AIE), ELISA por sus siglas en ingles (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), que permite determinar la concentración de un antígeno o anticuerpo mediante el uso de uno de ellos en solución y el otro en la fase sólida (18), está dividido en a) heterogéneo, donde el antígeno o anticuerpo conjugado con la enzima es separado del complejo enzima-antígeno-conjugado, antes de medir la actividad enzimática y b) homogéneo, en el cual la actividad enzimática del antígeno marcado es medida en presencia del complejo antígeno-anticuerpo. Las

técnicas de ELISA pueden ser clasificadas en competitivas y no competitivas, dependiendo de que el antígeno libre y el antígeno ligado a una enzima o fijado a una fase sólida compita por un número limitado de sitios activos de anticuerpos (22).

El diagnóstico mediante ELISA se ha utilizado para la detección de animales con paratuberculosis, principalmente en bovinos, siendo una buena opción ya que en el caso del paquete comercial (IDEXX), cuenta con una sensibilidad del 83% y una especificidad del 89% (12), además de que es una prueba fácil de establecer en el laboratorio. Existen trabajos donde se considera que la sensibilidad del ELISA comercial es de 8.9 a 32.1% en animales que eliminan una pequeña cantidad de bacilos en las heces y de 47.1 a 62.9 en animales que eliminan mayor cantidad (23). Se sabe que *Maptb* comparte un amplio rango de componentes antigénicos con otras especies de Micobacterias y con otros microorganismos relacionados como ***Corynebacterium***, ***Nocardia*** y ***Rhodococcus***, dando resultados falsos positivos; para evitar esto los sueros se diluyen en una solución que contiene ***Mycobacterium phlei*** (24).

Actualmente se han implementado pruebas moleculares para el diagnóstico de la enfermedad, como es el caso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), los iniciadores que más se han estudiado son los diseñados a partir de la secuencia de inserción 900 ( IS900), la cual es específica de ***M. avium*** subsp. ***paratuberculosis*** (26), esta prueba tiene la ventaja de que los resultados se obtienen en menos de una semana.

## **TRATAMIENTO.**

Con fines prácticos los animales que desarrollan la fase clínica de la enfermedad deben ser enviados a sacrificio y en el hato se deben implementar medidas de manejo para su control.

El tratamiento contra paratuberculosis es raramente indicado, sin embargo, puede ser considerado para animales con un alto valor genético (2).

La isoniazida (20 mg/kg vía oral) ha sido utilizada sola o en conjunto con rifampicina (20 mg/kg vía oral), y/o amikacina (18 mg/kg vía intramuscular). Isoniazida es la opción más económica pero requiere una terapia conjunta con rifampicina o aminoglucósidos, y no debe ser utilizada como único tratamiento por que puede desarrollar resistencia (11). Estos antibióticos son utilizados para el tratamiento de tuberculosis en humanos por lo que no es recomendable utilizarlos en animales. Entre las drogas que se han probado se encuentran la Claritromicina, Estreptomicina, Amikacina, Gentamicina, Kanamicina y Neomicina, entre otras. (1,2).

El tratamiento contra paratuberculosis requiere de medicación diaria por largos periodos de tiempo y resultan en la paliación de la enfermedad, en vez de una cura definitiva. La Clofazimina es el antibiótico más utilizado en el tratamiento de ganado, sin embargo esta droga no detiene la eliminación de la micobacteria por las heces ni cura la infección. (1, 2,11).

## **PREVENCIÓN Y CONTROL.**

Los becerros deben nacer en áreas de maternidad limpias y desinfectadas, ser alejados de la madre inmediatamente o en un periodo de 6 a 12 horas y alojados en corrales de crianza limpios, teniendo alojamientos separados para

animales jóvenes y adultos. La alimentación de los becerros se llevará a cabo con calostro proveniente de vacas negativas a Maptb, cuando se recolecte el calostro se debe limpiar y desinfectar bien la ubre para evitar la contaminación con heces (1, 9,11), y evitar en extremo la contaminación del alimento con excretas utilizando comederos tipo canoa y evitar utilizar el mismo equipo para manejar el alimento en la remoción de las excretas (1).

La OIE recomienda a los servicios veterinarios de los países importadores, solicitar un certificado internacional de sanidad animal en los rumiantes domésticos, donde conste que: 1) el día de la exportación no presentaba signos clínicos de paratuberculosis; 2) que provienen de establecimientos en los que en los últimos cinco años antes de la exportación no se han comprobado oficialmente casos de paratuberculosis y 3) en las pruebas realizadas 30 días antes a la exportación el resultado fue negativo (5).

Existe una bacterina, la cual no sustituye a las medidas sanitarias antes mencionadas ni a las pruebas diagnósticas. Se aplica en los músculos del pecho entre el primer y el día 35 de edad del ternero, se utiliza en países de Europa y América del norte (1), En forma experimental ha mostrado tener más del 90% de efectividad para prevenir la enfermedad clínica (13), pero genera una respuesta inmunitaria humoral y celular por la que los animales dan resultados positivos en pruebas de diagnóstico. Puesto que la vacuna se basa en la estimulación de linfocitos T para controlar la infección, puede continuar produciendo respuesta celular y es posible que los animales respondan a las pruebas de interferón gamma, intradermoreacción (9) o comprometa la especificidad de la prueba de tuberculina (27). Además la aplicación de la vacuna ocasiona la formación de un nódulo en el sitio de aplicación, que puede

variar en tamaño (2 a 10 cm), debridarse y eliminar exudado caseoso (9). Se debe tener en cuenta que mediante la vacunación no se puede eliminar la infección en el establecimiento, pero se reduce notablemente el número de casos clínicos (5).

La base del control de esta enfermedad es la identificación y eliminación de los animales infectados, sin embargo, el carácter subclínico de la enfermedad y la baja sensibilidad de los métodos de laboratorio dificultan el diagnóstico, no existiendo hasta el momento, ningún método 100% seguro para detectar a todos los animales infectados, especialmente a los jóvenes (28).

## **IMPORTANCIA ECONOMICA.**

En todo el mundo, la enfermedad de Johne, causada por *Maptb*, es una de las enfermedades más frecuentes y económicamente más importantes del ganado y de otros rumiantes (23) ya que impacta de manera importante la producción animal al generar disminución en la producción de leche, desechos precoces de animales y al relacionarse con problemas de baja fertilidad y predisposición a mastitis (9), menor valor comercial de canales y elevados costos de los programas de control (28).

Recientes estudios han mostrado que más del 20% de los rebaños lecheros y el 8% de los establos de engorda en Estados Unidos están infectados con *Maptb*, provocando pérdidas económicas anuales estimadas en más de 200 millones de dólares (20,23). En nuestro país, se evaluó recientemente el impacto económico de esta enfermedad en el Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca, Hidalgo (CAIT) y se concluyó que representa pérdidas anuales de

\$10,174 por animal infectado, debiéndose principalmente a la disminución de la producción láctea atribuible a la paratuberculosis (Miranda, 2005) (29).

## **JUSTIFICACIÓN.**

La paratuberculosis se considera, como un serio problema que ocasiona pérdidas económicas a la industria pecuaria, por lo que es indispensable el contar con pruebas diagnósticas para detectar a los animales infectados y poder establecer las medidas de control necesarias; si bien ya existen los paquetes de ELISA comerciales para el diagnóstico de la enfermedad, siguen existiendo las limitantes por el alto costo y del tiempo que requiere su importación, lo que lo hace inaccesibles para los laboratorios de diagnóstico en gran parte del país. Por esto es necesario el establecer la técnica de ELISA para el diagnóstico de paratuberculosis empleando un antígeno nacional. En la presente tesis se propone el uso de un antígeno de *Maptb* cepa 3065.

**HIPOTESIS.**

El empleo del antígeno protoplasmático de *Maptb* cepa 3065, en una ELISA, permitirá detectar a bovinos infectados con paratuberculosis en la fase clínica de la enfermedad.



**OBJETIVO.**

- Desarrollar y evaluar un ELISA, utilizando un antígeno protoplasmático de *Maptb* cepa 3065, para el diagnóstico de Paratuberculosis en bovinos.
- Determinar el punto de corte del ELISA, para diferenciar los sueros positivos de los negativos.
- Determinar la sensibilidad, especificidad e índice de concordancia (K) del ELISA con antígeno protoplasmático de *Maptb* cepa 3065 comparándola con el aislamiento bacteriológico, con la PCR y con un ELISA comercial.

## **MATERIAL Y METODOS:**

### **OBTENCION DE LAS MUESTRAS.**

Las muestras se obtuvieron de hatos de bovinos lecheros de los estados de México, Hidalgo y Aguascalientes. Se tomaron simultáneamente 491 muestras de suero y heces de bovinos mayores a dos años de edad, en su mayoría de raza Holstein. La sangre fue tomada de la vena caudal en tubos *Vacutainer* y centrifugada a 180 xg durante diez minutos para la obtención del suero; las muestras de heces fueron tomadas directamente del recto en guantes de palpación y mantenidas a 4°C hasta su utilización.

### **ELABORACIÓN DEL ANTÍGENO.**

El antígeno protoplasmático se obtuvo de una cepa de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, aislada a partir de heces de un caso clínico de ovino. La cepa se sembró en medio líquido de Proskawer y Beck adicionado con micobactina y se mantuvo durante cuatro semanas en incubación a 37°C. Las bacterias se concentraron y se les realizaron tres lavados con solución amortiguadora de fosfatos (PBS), centrifugando a 900 xg durante 10 minutos, las bacterias fueron sonicadas durante 20 ciclos de 59 segundos cada uno, el material obtenido fue centrifugado a 900 xg durante 90 minutos y el sobrenadante se dializó a 4°C en una membrana de celulosa (SIGMA-ALDRICH) durante 18 horas, el dializado fue congelado a -80°C durante dos horas, para finalmente liofilizarlo durante 24 horas (30). La concentración de proteína se determinó utilizando el paquete comercial *Micro BCA Protein Assay Reagent Kit* y se comparó con la del antígeno PPA-3 (*Paratuberculosis Protoplasmic Antigen*) de *Maptb*.

## ESTANDARIZACIÓN DE LA ELISA.

El antígeno se probó a diferentes concentraciones de 10 µg/100 µl, 5 µg/100 µl, 2.5 µg/100 µl y 1.25 µg/100 µl, y se fijó a microplacas de ELISA con solución amortiguadora de carbonatos pH 9.6, 0.06 M.

Se colocaron 100 µl de antígeno por pozo en la placa, se mantuvieron en incubación a 37 °C, durante 24 horas (31), se lavaron cuatro veces con 300 µl de solución de lavado PBS-Tween 20 pH 7.4 y se colocaron 100 µl de solución de bloqueo (Albúmina 1%, Fluka Biochemika), la placa se incubó a 37°C durante una hora y pasado ese tiempo se le realizaron cuatro lavados con PBS-Tween 20. Las placas se mantuvieron a 4°C cubiertas en plástico y papel aluminio, hasta su utilización.

Se trabajó con un suero control positivo (ALLIED MONITOR, INC.) y con un suero control negativo, diluidos en una solución al 0.02% de *M. phlei* en una solución amortiguadora de fosfatos que contiene 0.1% de gelatina y 0.05% de tween 80 (32) (ALLIED MONITOR, INC.) a concentraciones de 1:20, 1:40, 1:80 y 1:160, esto para evitar reacciones cruzadas.

Se utilizó un conjugado de anti IgG bovino HRP (SIGMA) a diluciones de 1:750, 1:1500 y 1:2000.

En cada pozo se colocaron 100 µl de los sueros controles negativos y positivos, se incubaron a temperatura ambiente por 30 min, se lavaron con 300 µl de PBS-Tween 20 cuatro veces, se aplicaron 100 µl de conjugado anti IgG bovino (HRP) en cada pozo, se incubó a temperatura ambiente por 30 min, se eliminó el contenido de la placa y se lavó con PBS-Tween 20 cuatro veces, se agregaron 100 µl de solución de sustrato 2-2' azino-di-(3-etil-benzothiazol-sulfona-6) – (diamonio) (ABTS) (AMPRESKO) a cada pozo, se incubó durante

60 minutos a temperatura ambiente y se realizó la lectura a 650 nm en un espectrofotómetro (BioTek) a los 15, 30, 45 y 60 minutos.

### **DETERMINACION DEL PUNTO DE CORTE.**

Se trabajaron con 50 sueros de bovino positivos a aislamiento de *Maptb* y con 50 sueros negativos provenientes de hatos libres.

El punto de corte se estableció por Intervalos de Confianza al 95% y dos desviaciones estándar.

### **DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA PRUEBA.**

Se calculó la sensibilidad y especificidad de la prueba utilizando los resultados de 491 sueros previamente evaluados con una ELISA comercial y la ELISA con antígeno de *Maptb* cepa 3065 utilizando la dilución de suero, antígeno y conjugado en la que se obtuvieron mejores resultados de la estandarización. El desarrollo del ELISA se realizó bajo las mismas condiciones descritas en la estandarización. Los resultados se evaluaron por una prueba de kappa o índice de concordancia, para medir la asociación con los resultados obtenidos en la PCR anidada y aislamiento bacteriológico a partir de las heces de los mismos animales. Se determinó si había o no diferencia estadística entre ambas ELISAs mediante la prueba de  $X^2$  de Pearson.

## INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.

El cálculo de los valores positivos y negativos, se realizó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Control negativo (CNX)} = \frac{\text{CN1 OD (650 nm)} + \text{CN2 OD (650nm)}}{2}$$

$$\text{Control positivo (CPX)} = \frac{\text{CP1 OD (650nm)} + \text{CP2 OD (650nm)}}{2}$$

$$\text{Sueros problema (SP)} = \frac{\text{SP X OD (650nm)} - \text{CNX}}{\text{CPX} - \text{CNX}}$$

Donde:

OD=densidad óptica

CNX= promedio control negativo

CN1=valor control negativo 1

CN2=valor control negativo 2

CPX =promedio control positivo

CP1= valor control positivo 1

CP2= valor control positivo 2

## **AISLAMIENTO BACTERIOLOGICO.**

Se tomaron 2 gramos de heces y se colocaron en 50 ml de Cloruro de Hexadecilpiridinio (HCP) al 7.6 %, se mantuvieron en agitación durante 60 minutos, para posteriormente dejarlos en reposo por 18 horas.

Se tomaron 5 ml del sobrenadante y de la fase intermedia, se centrifugó a 180 xg durante 10 minutos, se decantó el sobrenadante y a la pastilla obtenida se lo colocó 3 ml de cloruro de benzalconio (Zephiran) al 3%, dejándolo en reposo por 30 minutos, posteriormente se centrifugó a 180 xg durante diez minutos. Se decantó el sobrenadante conservando aproximadamente un ml, en el cual se homogenizó la pastilla y con esta solución se realizó la siembra por duplicado en medio de Herrold adicionado con yema de huevo con y sin micobactina, dejando incubar las muestras a 37°C durante ocho a dieciséis semanas (30,33).

## **EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE HECES.**

Se tomaron 2 gramos de heces y se colocaron en 50 ml de HCP al 7.6 %, se mantuvieron en agitación durante 60 minutos, para posteriormente dejarlos en reposo por 18 horas.

Se tomaron 20 ml del sobrenadante y se centrifugó a 180 xg por diez minutos. A la pastilla obtenida se le realizaron 3 lavados con 5 ml de PBS, centrifugando entre cada uno.

Se resuspendió la pastilla en 1.5 ml de PBS y se transfirió a tubos Eppendorf de 2 ml, para centrifugarlo a 1260 xg durante cinco minutos, se eliminó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 500 µl de Te-Triton X100 y transferido a criotubos de 1.5 ml.

Las muestras se colocaron en nitrógeno líquido (-80°C) a intervalos de cinco minutos y en seguida en calor seco a 100°C también por cinco minutos, para la lisis celular.

A cada muestra se le colocó 450 µl de Isotiocionato de Guanidina 5M y 250 µl de Acetato de amonio 7.5 M 6.3 pH y se mantuvieron en hielo por 15 minutos.

Las muestras se transfirieron a tubos de dos ml donde se le colocaron 500 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (1:24), se mezcló durante diez segundos y se llevó a centrifugar a 1260 xg 15 minutos. La fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo de dos ml y se repitió esta operación.

A la fase acuosa obtenida se le agregaron 450 µl de isopropanol, para precipitar los ácidos nucleicos, y se colocó a -20°C durante toda la noche.

Las muestras se centrifugaron a 1260 xg durante 15 minutos y posteriormente se eliminó el sobrenadante. Se realizaron dos lavados a la pastilla con un ml de etanol al 70%, centrifugando entre cada lavado.

Se eliminó el sobrenadante y la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente, para posteriormente resuspenderlo en 100 µl de agua bidestilada.

Las muestras de ADN se mantuvieron a -20°C hasta su utilización en la PCR anidada. (26)

### **PCR anidada.**

A las muestras de ADN obtenidas a partir de heces, se les realizó la prueba de reacción en cadena de la polimerasa anidada (PCR), La cual consiste en dos reacciones, en donde el material obtenido de la primera reacción, se utiliza como base para realizar una segunda reacción. Se utilizaron iniciadores específicos para el elemento de inserción IS900 que es específico para *Maptb*.

Se utilizaron los iniciadores descritos por Erume *et al.*, Paratb1 (5' TGA TCT GGA CAA TGA CGG TTA CGG A 3') y Paratb 4 (5' CGC GGC ACG GCT CTT GTT 3') para la primer reacción de PCR, obteniendo un producto de 563 pares de bases y para la segunda reacción Paratb 2 (5' GCC GCG CTG CTG GAG TTA A 3') Y Paratb 3 (5' AGC GTC TTT GGC GTC GGT CTT G 3') obteniendo un producto final de 210 pares de bases. (25,26).

Para la primer reacción se utilizaron 2 µl de ADN proveniente de heces de bovino, las condiciones para 48 µl de premezcla fueron 5 µl de Amortiguador de Reacción 10X (67 mM/µl) (Biogénica), 4 µl de Mg Cl 2 30 mM 20 X (Biogenica), 1 µl DNTP (200mM), 1 µl Paratb 1 (25pMol) (Invitrogen), 1 µl Paratb 4 (25 pMol) (Invitrogen), 0.25 µl de Polimerasa 500 U (Amplificasa, Biogénica) y 35.75 µl de agua bidestilada. La amplificación se realizó en un termociclador (Thermo ELECTRON CORPORATION) utilizando el siguiente programa: un ciclo a 95°C por cinco minutos, 35 ciclos a 95°C por un minuto, 65 °C por un minuto, 72 °C por un minuto, un ciclo más por un minuto a 72°C y un ciclo a 4°C por cinco minutos. Para la segunda reacción, se tomaron 3 µl de la primera reacción y fueron transferidos a microtubos de PCR, que contenían la misma cantidad y concentración de reactivos descritos anteriormente, excepto que los iniciadores Paratb 1 y Paratb 4, fueron sustituidos por los iniciadores Paratb2 y Paratb3. Se utilizó el mismo programa del termociclador. Las muestras se corrieron en una cámara de electroforesis (GIBCO BRL Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus) a 100 volts por una hora y los productos de la amplificación fueron visualizados en un gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio (34).



## RESULTADOS.

Una vez resuspendido el antígeno protoplasmático se determinó su concentración de proteínas utilizando el paquete comercial *Micro BCA Protein Assay Reagent Kit*, se hizo la lectura a una absorbancia de 563 nm, obteniendo un promedio de 0.178  $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ , mientras que el antígeno comercial PPA-3 de *Maptb* tuvo una concentración de proteínas en promedio de 0.174  $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ .

El antígeno protoplasmático de *Maptb* cepa 3065 se probó a diferentes concentraciones de 10  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ , 5  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$  y 2.5  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ , en ninguna de las diluciones, utilizando los controles positivos y negativos del suero, se observaron diferencias entre ellos. Con la concentración de antígeno 1.25  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$  y con la dilución del anticuerpo secundario (conjugado) de 1:2000, se obtuvieron los siguientes resultados: con la dilución de suero de 1:20 el valor del control positivo fue de 0.955 OD y el del control negativo 0.47 OD, con la concentración de 1:40 los valores del control positivo y negativo son de 0.688 y de 0.324 respectivamente, en estas dos concentraciones se observó que el valor del control positivo es dos veces mayor con respecto al control negativo, en ambas diluciones el valor del control negativo es elevado, con las diluciones de 1:80 y 1:160 los valores de los controles positivos y negativos fueron de 0.602 y 0.212, de 0.532 y 0.143 respectivamente. En estas dos últimas concentraciones se observa una diferencia mayor de tres veces el valor positivo con respecto al valor negativo. Para la ELISA con antígeno protoplasmático 3065 de este trabajo se eligió la concentración de suero de 1:160 por que el valor del control negativo se encontraba por debajo de 0.15 OD, y mostró una diferencia amplia con respecto al valor positivo.

Cuadro 1. Se muestran los valores de los sueros controles positivos y negativos, utilizando diferentes concentraciones de suero, las concentraciones de antígeno y conjugado, en todos los casos, fue de 1.25 µg/100 µl y 1:2000, respectivamente.

DILUCIÓN DEL SUERO	VALOR DEL CONTROL POSITIVO (OD)	VALOR DEL CONTROL NEGATIVO (OD)
1:20	0.955	0.470
1:40	0.688	0.324
1:80	0.602	0.212
1:160	0.532	0.143

### DETERMINACIÓN DEL PUNTO DE CORTE.

Para establecer el punto de corte se utilizaron 50 sueros positivos y 50 sueros negativos. Se determinó con un intervalo de confianza 0.95 y dos desviaciones estándar, utilizando la siguiente fórmula:

**$M = x \pm Z (0.5 - \alpha/2)(\delta/\sqrt{n})$** , donde:

n (población)= 100

M (Media)= 0.3251068

$\delta$  (Desviación estándar)= 0.32841903

$M = 0.3251068 \pm 1.96 (0.65683806 / \sqrt{n})$

$M = 0.3251068 \pm 1.96 (0.065683806)$

$M = 0.3251068 \pm 0.128740259$

$M = 0.453847059$

$M = 0.196427741$

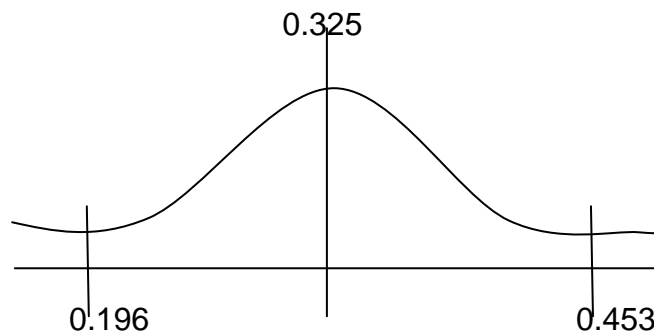


Figura 1. Valor mínimo y máximo de desviación estándar utilizando dos desviaciones estándar y un intervalo de confianza del 95%. Los animales con valores iguales o mayores a 0.196 OD fueron considerados como positivos y los menores fueron considerados como negativos.

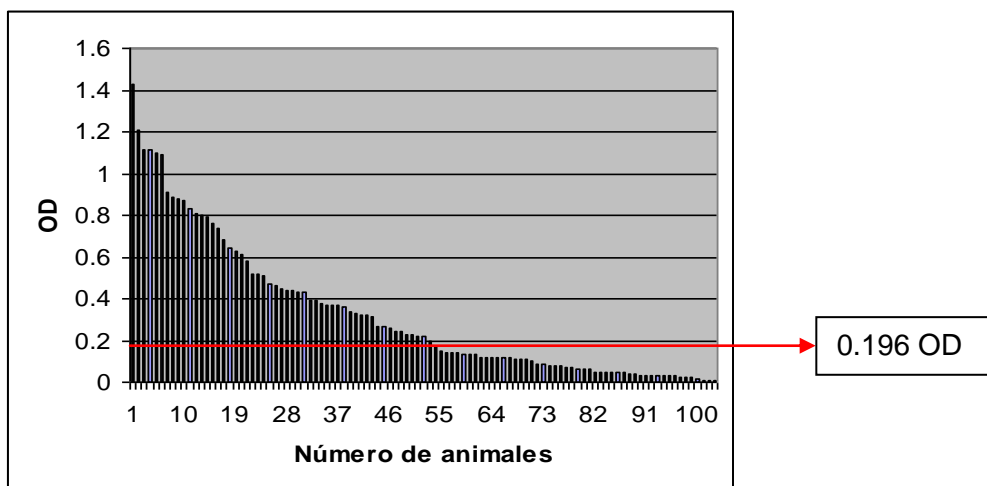


Figura 2. Valores de los cien animales que se utilizaron para establecer el punto de corte, utilizando dos desviaciones estándar y un intervalo de confianza del 95%, donde el valor más alto fue de 1.43 OD y el más bajo de 0.01 OD

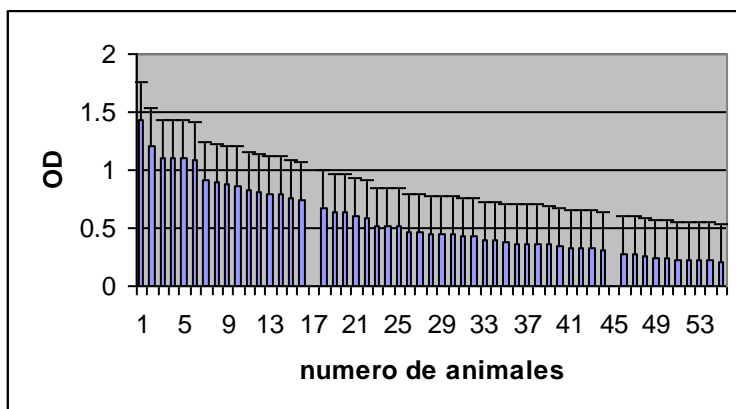


Figura 3. Valores de los cincuenta animales positivos, divididos en fuertemente positivos que corresponden de 1.43 OD a 0.70 OD, positivos 0.69 OD a 0.30 OD y débilmente positivos de 0.29 OD a 0.19 OD

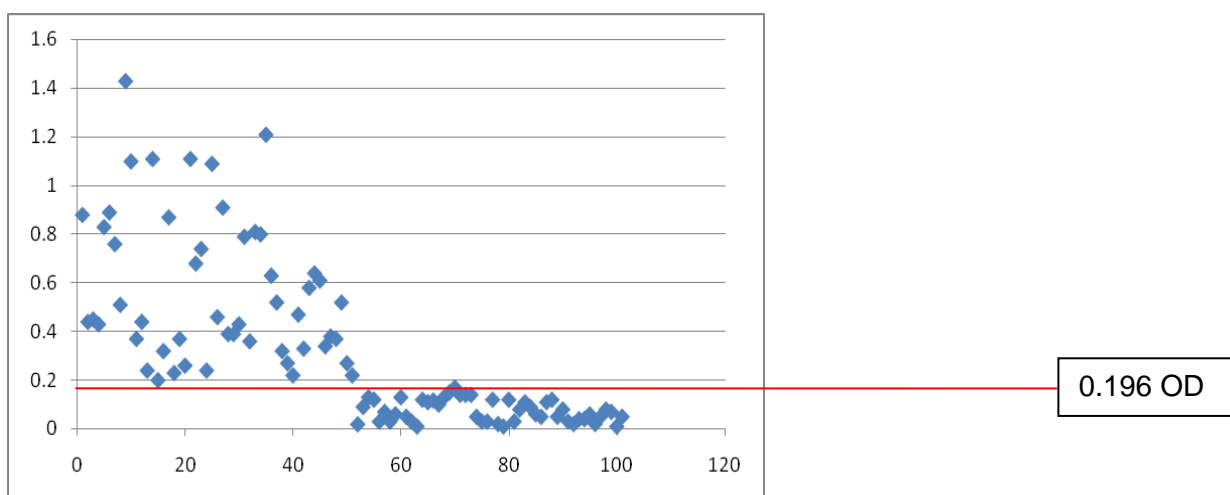


Fig 4. Gráfica que muestra el punto de corte de 0.196 OD, utilizando dos desviaciones estándar y un intervalo de confianza del 95%, que divide a los valores positivos de los negativos.

**DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD,  
INDICE DE CONCORDANCIA (KAPPA) Y CUADRADO DE  
PEARSON (PRUEBA DE  $X^2$ ).**

Se calculó la sensibilidad y especificidad de la prueba utilizando los resultados de 491 sueros previamente evaluados con un ELISA comercial y el ELISA con antígeno de *Maptb* cepa 3065. Los resultados se evaluaron por una prueba de kappa o índice de concordancia, para medir la asociación con los resultados obtenidos en la PCR anidada y aislamiento bacteriológico a partir de las heces de los mismos animales (34, 35), así como también con la prueba de  $X^2$  de Pearson para determinar si existía diferencia estadística entre estos métodos diagnósticos, en donde si el valor de  $X^2$  es menor a 0.05, quiere decir que existe diferencia estadística y si el valor es mayor a 0.05 quiere decir que no hay diferencia estadística.

Estos análisis estadísticos se obtuvieron con el programa Software Intercooled Stata 7.0. (INIFAP, Dr. Dionicio Córdova López)

K= kappa

VP+ = valor predictivo positivo

Se= sensibilidad

VP- = valor predictivo negativo.

Esp= especificidad

Pr= Valor de  $X^2$

Cuadro 2. Resultados del análisis de sensibilidad, especificidad e índice de concordancia del ELISA con antígeno protoplasmático de Maptb cepa 3065 en relación con el ELISA comercial.

		ELISA 3065		TOTAL
		+	-	
ELISA COMERCIAL	+	59	24	83
	-	9	399	408
TOTAL		68	423	491

**K= 0.73**

**VP+ = 86%**

**Se= 71%**

**VP- = 94%**

**Esp=97%**

**Pr= 0.000**

Cuadro 3. Resultados del análisis de sensibilidad, especificidad e índice de concordancia del ELISA con antígeno protoplasmático de Maptb cepa 3065 en relación con la PCR anidada.

		ELISA 3065		TOTAL
		+	-	
PCR	+	42	17	59
	-	26	406	432
TOTAL		68	423	491

**K= 0.61**

**VP+ = 61%**

**Se=71%**

**VP- = 95%**

**Esp=93%**

**Pr=0.000**

Cuadro 4. Resultados del análisis de sensibilidad, especificidad e índice de concordancia del ELISA comercial en relación con la PCR anidada.

		ELISA COMERCIAL		TOTAL
		+	-	
PCR	+	53	6	59
	-	30	402	432
TOTAL		83	408	491

**K= 0.63**

**VP+ = 63%**

**Se= 91%**

**VP- = 98%**

**Esp= 93%**

**Pr=0.000**

Cuadro 5. Resultados del análisis de sensibilidad, especificidad e índice de concordancia del ELISA con antígeno protoplasmático de Maptb cepa 3065 en relación con el aislamiento fecal.

		ELISA 3065		TOTAL
		+	-	
AISLAMIENTO	+	26	4	30
	-	42	419	461
TOTAL		68	423	491

**K= 0.47**

**VP+ = 38%**

**Se= 86%**

**VP- = 99%**

**Esp= 90%**

**Pr=0.000**

Cuadro 6. Resultados de la sensibilidad, especificidad e índice de concordancia del ELISA comercial en relación al aislamiento bacteriológico.

		ELISA COMERCIAL		TOTAL
		+	-	
AISLAMIENTO	+	24	6	30
	-	59	402	461
TOTAL		83	408	491

**K= 0.33**

**VP+ = 28%**

**Se= 80%**

**VP- = 98%**

**Esp= 90%**

**Pr=0.000**

Cuadro 7. Resultados de la sensibilidad, especificidad e índice de concordancia de la PCR en relación al aislamiento bacteriológico.

		PCR		TOTAL
		+	-	
AISLAMIENTO	+	30	0	30
	-	29	432	461
TOTAL		59	432	491

**K= 0.66**

**VP+ = 50%**

**Se= 100%**

**VP- = 100%**

**Esp= 93%**

**Pr=0.000**

Los resultados obtenidos mediante la prueba de  $X^2$  de las cuatro pruebas, muestran valores menores a 0.005, lo que nos indica que existe diferencia estadísticamente significativa entre las pruebas comparadas.



## **AISLAMIENTO BACTERIOLÓGICO.**

Se realizó el cultivo bacteriológico de las 491 muestras de heces, obteniendo 30 aislamientos positivos (6.10%). Se observó crecimiento de colonias bacterianas a partir de la octava semana de incubación; únicamente en los medios que fueron adicionados con micobactina y con la tinción de Ziehl-Nielsen se observaron bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) por lo que fueron considerados como Maptb.

## **REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.**

Se probaron las 491 muestras de heces con la prueba de reacción en cadena de la polimerasa anidada (PCR anidada), en total amplificaron 59 muestras (12.01%) obteniendo un producto final de 210 pares de bases que corresponde a la región IS900 que es específica de Maptb. Como control positivo se utilizaron muestras que dieron resultados positivos a aislamiento bacteriológico y a la PCR anidada.

Estudios previos realizaron la PCR anidada para la evaluación de muestras de heces de ovino, las cuales mostraron la misma banda de amplificación que corresponde a 210 pb (25).



Fig 5. Gel de electroforesis en donde se observa los resultados de la PCR anidada, realizada a partir de ADN genómico de heces de bovinos. Se muestra la amplificación de fragmentos de 210 pb, que corresponden a la secuencia de inserción IS900, específica de *Maptb*. Marcador de peso molecular de 123 pb.

## DISCUSION

Diversos estudios han realizado evaluaciones con ELISAs para el diagnóstico de paratuberculosis con diferentes antígenos, teniendo una sensibilidad que va del 30% al 80% y una especificidad del 80% al 90% (15,28), por lo que los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que el ELISA con antígeno de *Maptb* cepa 3065, tiene una sensibilidad y especificidad aceptable de 86% y 90%, respectivamente, mayor que el ELISA comercial, que mostró una sensibilidad de 80% y una especificidad de 90%, al compararla con el aislamiento bacteriológico el cual es considerado como la prueba de oro. Se sabe que en ocasiones, los animales negativos a ELISA pueden resultar positivos a PCR o al aislamiento bacteriológico, debido a que en estos animales la respuesta inmune humoral disminuye cuando la respuesta celular aumenta; esto sucede en la etapa subclínica de la infección. Otra razón por la cual la producción de anticuerpos se puede ver afectada es a causa de la pérdida de respuesta inmune ante la infección; esta actividad supresora es denominada anergia, y se presenta cuando los animales son viejos o la infección está en su etapa final. Sin embargo, se considera que estos animales pueden estar eliminando el bacilo y no son detectados con el diagnóstico serológico (34).

Mediante el uso de la ELISA comercial se lograron obtener 83 animales positivos y utilizando la ELISA con antígeno protoplasmático de *Maptb* 3065 se obtuvieron 68 animales positivos de los 491 animales evaluados, esto corresponde a un 16.90% y 13.84%, respectivamente, lo cual es mayor a los datos que se tienen en relación a la prevalencia de la enfermedad, que en el

2002 se consideraba era del 7% (Chi et al, 2002) En nuestro país esto no está bien documentado (41).

La concordancia entre las ELISAs evaluadas (comercial y antígeno 3065) fue de 0.73, que se considera estadísticamente significativa (36), cabe señalar que los paquetes comerciales de ELISA para el diagnóstico de paratuberculosis, son elaborados con antígeno de una cepa de *Maptb* de origen bovino, en este trabajo se realizó el ELISA con un antígeno obtenido de una cepa de *Maptb* de origen ovino, por lo que el análisis estadístico por medio de  $X^2$ , demostró que se puede utilizar para el diagnóstico de paratuberculosis en bovinos, sin afectar el resultado, ya que se ha observado un alto grado de conservación y homogenicidad genética entre las cepas ovina y bovinas de *Maptb*, por lo que comparten determinantes antigénicos, los cuales fueron reconocidos por los anticuerpos presentes en los sueros que resultaron positivos al ensayo. Se considera que los antígenos protoplasmáticos de *Maptb*, que se utilizan en las pruebas serológicas, son preparaciones groseras (lípidos, carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos) que contienen determinantes antigénicas en común para la mayoría de las cepas de *Maptb* sin importar que sean de origen ovino o bovino. (38, 39,40).

Diversos estudios han realizado pruebas similares, uno de ellos realizado por Park et al. (15), muestra una ELISA con una sensibilidad y especificidad del 62% y 92.5% y un índice de concordancia de 0.322, utilizando una cepa de referencia de origen bovino y con una concentración de proteína de 400 ng/100  $\mu$ l, así como también en un trabajo realizado por Soto et al. (28) en el que se muestran valores de sensibilidad de 32.5%, especificidad 96.7% e índice de concordancia de 0.366. En un estudio llevado a cabo por Speer et al. (20) en

el que obtuvieron un antígeno de origen bovino por medio de sonicación, se muestra una concentración de 3200 ng de proteína por pozo (100  $\mu$ l), dando resultados de 95.2% en el caso de la sensibilidad y de 96.7% en el de la especificidad, sin embargo mencionan la desventaja de que es una prueba costosa y que requiere de entrenamiento para alcanzar resultados confiables y constantes, en todos los trabajos, la sensibilidad y especificidad que se obtuvieron fueron con respecto al aislamiento bacteriológico. La sensibilidad obtenida en el presente trabajo al compararla con el aislamiento bacteriológico fue del 86% y una especificidad del 90%, la cual se obtuvo con una concentración menor de 178 ng de proteína por cada 100  $\mu$ l de buffer de carbonatos en comparación con otros autores (20,23), pero se considera que se puede evaluar una concentración menor de proteína, para determinar si la sensibilidad aumenta, ya que en este trabajo se pudo comprobar que a menor cantidad de antígeno, la diferencia entre los valores de los sueros positivos y negativos aumentaba.

Diversos trabajos establecen el punto de corte de entre 0.23 a 0.25 OD, (20,23), Se sabe que la sensibilidad de la prueba esta relacionada con el punto de corte que se establezca, por lo que el trabajar con puntos de corte mayores a 0.23 OD, se tiene la posibilidad de dar un resultado falso negativo, y dejar animales dentro del hato que posteriormente desarrollarán la enfermedad. El punto de corte que se estableció en este trabajo fue de 0.196 OD y se obtuvo mediante dos desviaciones estándar y un intervalo de confianza del 95%, lo cual permitió detectar una mayor cantidad de animales infectados, con esto la sensibilidad de la prueba fue mayor en animales que comenzaban a presentar los signos clínicos de la enfermedad, ya que la presencia de anticuerpos contra

los antígenos de *Maptb* está directamente relacionada con el número de bacterias presentes y con su eliminación por medio de heces durante la fase clínica de la enfermedad (34). De las 491 muestras trabajadas, 59 fueron positivas a PCR anidada y se lograron aislar 30 cepas de *Maptb*, lo que equivale al 12.01 % y 6.10%, respectivamente. Estos resultados coinciden con lo descrito por *Erume et al* (25), quienes detectaron una mayor cantidad de animales positivos a paratuberculosis a partir de heces, utilizando la PCR anidada y una menor cantidad mediante el aislamiento bacteriológico, el cual aunque es considerado como la prueba de oro para el diagnóstico de paratuberculosis en bovinos, presenta algunas limitantes, pues el procedimiento requiere de ocho a 16 semanas de incubación como mínimo para el aislamiento de *Maptb*. Otra desventaja que presenta el cultivo es la contaminación de las muestras con otros microorganismos, principalmente hongos. La PCR anidada es capaz de detectar bacterias viables y no viables, además tiene la ventaja de que los resultados a partir de esta prueba se pueden obtener en tres días, lo que representa una ventaja de tiempo en comparación con el aislamiento bacteriológico (25, 34). Todos los animales que presentaron una lectura de igual o mayor 0.196 OD en el ELISA, fueron positivos a ambas pruebas.

La paratuberculosis es una enfermedad que causa grandes pérdidas económicas en todo el mundo, por lo cual, se requieren de pruebas diagnósticas sensibles y específicas para lograr su control y erradicación.

Se considera que el ELISA con antígeno protoplasmático de *Maptb* cepa 3065 es fácil de realizar, rápida y requiere de material que generalmente se encuentra en un laboratorio de diagnóstico.

Con la evaluación del ELISA, fue posible desarrollar una prueba con la cual se tienen resultados similares en comparación con una ELISA comercial, ya que la prueba con antígeno de *Maptb* cepa 3065 detectó los sueros positivos obtenidos de animales infectados con paratuberculosis al igual que el ELISA comercial. Por lo que se pudo comprobar la hipótesis de este trabajo. Se requiere continuar haciendo estudios con la ELISA y el antígeno aquí descritos, como una mayor purificación del antígeno, la utilización de una prensa francesa para romper las células del antígeno, evaluar una mayor cantidad de muestras y compararlas con un antígeno de origen bovino, a razón de tener una prueba de mejor calidad que permita dar un diagnóstico adecuado.

## CONCLUSIONES

- Utilizando una concentración de 178 ng de proteína por cada 100 µl de antígeno se pudo detectar como positivos a los sueros provenientes de animales infectados y como negativos a los sueros de los animales libres de la enfermedad.
- La sensibilidad de 86% y especificidad de 90% de la ELISA estandarizada en este trabajo, son satisfactorias ya que son similares a las obtenidas con una prueba comercial.
- El punto de corte establecido en este trabajo, el cual fue de 0.196 OD, permitió detectar una cantidad de animales infectados con paratuberculosis similar a la obtenida con un ELISA comercial.
- Al usar la prueba de  $X^2$  de Pearson se observan diferencias estadísticas de  $P < 0.005$  al comparar los cuatro métodos diagnósticos entre ellos.
- Mediante el ELISA comercial se obtuvieron 83 animales positivos, lo que equivale al 16.90%.
- Utilizando el ELISA con antígeno protoplasmático de *Maptb* cepa 3065 se obtuvieron 68 animales positivos de los 491 animales evaluados, lo que corresponde al 13.84%.
- Con la PCR anidada, en total amplificaron 59 muestras, lo que corresponde al 12.01%.
- Se obtuvieron 30 aislamientos bacteriológicos, lo que corresponde al 6.10%.



## GLOSARIO

### ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.

- **SENSIBILIDAD:** Es la capacidad que tiene la prueba de identificar correctamente a los animales que están o estuvieron infectados.
- **ESPECIFICIDAD:** es la capacidad que tiene una prueba de identificar a los animales no infectados.
- **VALOR PREDICTIVO POSITIVO:** Indica la proporción de los animales positivos a la prueba que están realmente infectados o la probabilidad de que un resultado positivo sea correcto.
- **VALOR PREDICTIVO NEGATIVO:** Es la probabilidad que un animal no esté infectado si tiene un resultado negativo a la prueba (36).
- **Cuadrado de Pearson ( $X^2$ ):** es considerada como una prueba no paramétrica que mide la discrepancia entre una distribución observada y otra teórica. También se utiliza para probar la independencia de dos variables entre sí, mediante la presentación de los datos en tablas de contingencia (37).

**APENDICE.****1. SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS (PBS) 0.15 M ph 7.2****(ELISA)**

Cloruro de sodio (NaCl).....	8.0 g
Cloruro de potasio (KCl).....	0.2 g
Fosfato dibásico de sodio (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ).....	1.44 g
Fosfato monobásico de potasio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ).....	0.24 g
Agua destilada c.b.p.....	1000 ml

**2. SOLUCIÓN DE BLOQUEO 1%**

Albúmina sérica bovina.....	1 g
Agua destilada.....	100 ml

**3. SOLUCIÓN DE LAVADO PBS-Tween 20 pH 7.4**

Cloruro de sodio (NaCl).....	8.0 g
Cloruro de potasio (KCl).....	0.2 g
Fosfato dibásico de sodio (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ).....	1.44 g
Fosfato monobásico de potasio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ).....	0.24 g
Tween 20.....	500 µl
Agua destilada c.b.p.....	1000 ml

**4. BUFFER DE CARBONATOS 50 Mm pH 9.6**

Carbonato de sodio (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ).....	3.5 g
Bicarbonato de sodio (NaHCO <sub>3</sub> ).....	5.6 g
Agua destilada.....	1000 ml

**5. SOLUCION DE PARO 1%**

Dodecil Sulfato de Sodio (SDS).....	1 g
Agua destilada.....	100 ml

**6. SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS (PBS)**

Cloruro de sodio (NaCl).....	8.5 g
Fosfato dibásico de sodio (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ).....	1.1 g
Fosfato monobásico de potasio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ).....	0.32 g

**7. GEL DE AGAROSA 2%**

Agarosa.....	1 g
TAE 1X.....	50 ml

**8. MEDIO DE HERROLD CON YEMA DE HUEVO Y MICOBACTINA**

Peptona.....	9.0 g
Agar noble.....	15.3 g
Cloruro de sodio (NaCl).....	4.5 g
Extracto de carne.....	2.7 g
Glicerina.....	27 ml
Agua destilada.....	870 ml
Micobactina.....	4 ml
Huevos.....	6
Verde de malaquita 2%.....	5.1 ml

**9. MEDIO DE PROSKAUER Y BECK MODIFICADO CON 5% DE SUERO FETAL BOVINO.**

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 fetal bovino (estéril).....	50 ml

**10. CLORURO DE BENZALCONIO (ZEPHIRAN)**

Zephiran 17 %.....	1.8 ml
Agua destilada.....	98.2 ml

**11. CLORURO DE HEXADECILPIRIDINIO (HCP) 7.6%**

HCP.....	7.6 g
Agua destilada.....	1000 ml

**12. ACETATO DE AMONIO 7.5 M 6.3 Ph**

Acetato de amonio.....	0.7225 g
Agua destilada.....	12.5 ml

**13. ISOTIACIONATO DE GUANIDINA**

Isotiocionato de guanidina.....	29.54 g
Agua destilada.....	50 ml

**14. TE Triton 100X**

Tris HCL.....	3.025 ml
EDTA.....	0.7445 g
Triton 100X.....	1 ml
Agua destilada.....	46.9 ml

## REFERENCIAS.

1. Disney PR, Villaroel NR. Paratuberculosis: una amenaza emergente para la ganadería tropical. Manual de Ganadería Doble Propósito. Maracaibo-Venezuela. Departamento Medico Quirúrgico. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Zulia. 2005: 370-376
2. Cocito C, Gilot P, Coene M, De Kesel M, Poupart P, Vannuffel P. Paratuberculosis. Clinical Microbiology Reviews, American Society for Microbiology 1994 ;7 :328-345.
3. Andrews AH, Blowey RW, Boyd H, Eddy RG. Bovine Medicine, Diseases and husbandry of cattle. United Kingdom: Blackwell Publishing, 2004:857-858.
4. Abalos P. Actualidad en Paratuberculosis. TECNOVET 2001 Diciembre; 7 (3). Available from: <http://www.tecnovet.uchile.cl>
5. Gerrit D, Dirksen K, Gründer HD. Medicina Interna y Cirugía del Bovino. Buenos Aires, República Argentina: Iner Médica Editorial, 2005: 533-538, volumen I.
6. Pinedo PJ, Rae DO, Williams JE, Donovan GA, Melendez P, and Buergelt CD. Association among Results of Serum ELISA, Faecal Culture and Nested PCR on Milk, Blood and Faeces for the Detection of paratuberculosis in Dairy Cows. Transboundary and Emerging Diseases. Journal compilation, 2008; 50: 125-133.
7. [www.oie.int/hs2/ci\\_maladie.asp?ord=1](http://www.oie.int/hs2/ci_maladie.asp?ord=1). Consultado el 13 de mayo del 2009.
8. [www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/DOF/2007/ac\\_exoticas\\_200907.pdf](http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/DOF/2007/ac_exoticas_200907.pdf). Consultado el 17 de mayo del 2009.

9. Rodríguez VRI. Enfermedades de importancia económica en producción animal. México: McGraw-Hill, 2005: 393-401.
10. Stevenson K, Hughes VM, de Juan L, Inglis NF, Wright F. Molecular characterization of pigmented and nonpigmented isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Journal of Clinical Microbiology 2002; 40: 1798-1804.
11. Rebhun WC. Diseases of Dairy Cattle. USA: Ed. Lippincott Williams and Wilkins, 1995:208-213.
12. Kreeger JM. Ruminant paratuberculosis a century of progress and frustration. J Vet Diagn Invest 1991; 3: 373-382.
13. Craven JA, Morgan IR. Epidemiology and Pathogenesis of Paratuberculosis in Cattle. A Literature Survey Prepared for Animal Health Australia. 2000.
14. Sung N, Collins MT. Effect of three factors in cheese production (pH, Salt and Heat) on *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* viability. Applied and Environmental Microbiology 2000; 66: 1334-1339.
15. Park KT, Ahn J, Davis WC, Koo HC, Kwon NH, Jung WK, Kim JM, Hong SK, Park YH. Analysis of the seroprevalence of bovine paratuberculosis and the application of modified absorbed ELISA to field sample testing in Korea. Journal of Veterinary Science. 2006; 7(4): 349-354.
16. Abalos P. Actualidad en paratuberculosis. Departamento de medicina preventiva animal. Facultad de ciencias veterinarias y pecuarias, Universidad de Chile. 2006

17. Abbas AK, Lichtman AH. Inmunología celular y molecular. Elsevier España S.A. Quinta edición. 2004: 298-316.
18. Margni RA. Inmunología e Inmunoquímica. Fundamentos. Argentina. Editorial Médica PANAMERICANA. Cuarta edición. 1990: 571-586 y 284-294.
19. Lei L, Plattner BL, Hostetter JM. Live *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and a Killed-Bacterium Vaccine Induce Distinct Subcutaneous Granulomas, with Unique Cellular and Cytokine Profiles. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2008; 15 (5): 783-793.
20. Speer CA, Scott MC, Bannantine JP, Waters WR, Mori Y, Whitlock RH, Eda S. A Novel Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Infections (Johne's Disease) in Cattle. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2006; 13(5): 535-540.
21. Klausen J, Huda A, Ekeröth L, Ahrens P. Evaluation of serum and milk ELISAs for paratuberculosis in Danish dairy cattle. *Preventive Veterinary Medicine*. 2003; 171-178.  
[www.elsevier.com/locate/prevetmed](http://www.elsevier.com/locate/prevetmed).
22. Morilla A, Bautista C. Manual de Inmunología. México: editorial Diana, 1986: 128-144.
23. Eda S, Bannantine JP, Waters WR, Mori Y, Whitlock RH, Scott MC, Speer CA. A Highly Sensitive and Subspecies-Specific Surface Antigen Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Johne's Disease. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2006; 13 (8): 837-844.



24. Yokomizo Y, Yugi H, Merkal RS. A Method for Avoiding False-Positive Reactions in an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the Diagnosis of Bovine Paratuberculosis. Japanese Society of Veterinary Science. 1985; 47(1): 111-119.
25. Erume J, Spargser J, Rosengarten R. Rapid detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis from cattle and zoo animals by Nested PCR. Afr Health Sci 2001; 1: 83-89.
26. Jaimes MNG. Aplicación de la PCR anidada para el diagnóstico de Paratuberculosis a partir de heces de ovinos (tesis de licenciatura). México: FESC -UNAM, 2006.
27. Vargas R, Marassi CD, Oelemann W, Lilenbaum. Interference of intradermal tuberculin tests on the serodiagnosis of paratuberculosis in cattle. Research in Veterinary Science. 2008. Journal homepage: [www.elsevier.com/locate/rvsc](http://www.elsevier.com/locate/rvsc).
28. Soto JP, Kruze J, Leiva S. Comparación de tres métodos de diagnóstico de Paratuberculosis bovina en rebaños lecheros infectados. Instituto de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile. Arch. Med. Vet. XXXIV. 2002; 2; 265-273.
29. Favila HLC. Detección de *Mycobacterium avium* paratuberculosis en leche de vacas y cabras seropositivas del centro de México (Tesis de Maestría). México D.F: FMVZ-UNAM: 2007.
30. Hernández COA. Obtención de un antígeno protoplasmático de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* para el

- diagnóstico de la enfermedad de Johne en ovinos (tesis de Licenciatura). México: FESC-UNAM: 2006.
31. Díaz E, Hernández L, Valero G, Arellano B. Diagnóstico de Brucelosis Animal. SAGARPA, Inifap PRODUCE, 2001: 92-94.
  32. Bech-Nielsen S, Berg JJ, Ahrens P y Feld NC. Diagnostic Accuracy of *Mycobacterium phlei* Absorbed Serum Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Bovine Paratuberculosis in Dairy Cows. *Journal of Clinical Microbiology*, 1992; 30: 613-618.
  33. Payeur JB, Jarnagin JL, Marquardt JG, Schaper LA, Martin BM. Laboratory Methods in Veterinary Microbiology for the Isolation and Identification of Mycobacteria. Iowa, USA: United States Department of Agriculture Animal and plant health inspection service. National Veterinary Service Laboratories, 1993: 39-40.
  34. Jaimes NG, Santillán FMA, Hernández COA, Córdova LD, Guzmán RCC, Arellano RB, Díaz AE, Tenorio GVR, Cuellar OA. Detección de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*, por medio de PCR-anidada a partir de muestras de heces de ovino. *Veterinaria México* 2008; 39 (4): 377-386.
  35. Principios de validación para las pruebas de diagnóstico de enfermedades infecciosas. Manual de la OIE sobre animales terrestres 2004-capítulo actualizado mayo 2006: 21-32
  36. Morilla GA, Gonzales-Vega D. Introducción al diagnóstico inmunológico de las enfermedades de los animales domésticos. INIFAP, Biotecnología industrial, SAGAR. México: 25-35.

37. Dawson-Saunders B, Trapp RG. Bioestadística médica. México D.F.- Santa Fé de Bogotá. Ed. El Manual Moderno S.A. de C.V., 1993: 172-176.
38. Bernardelli A, Cicuta ME, Nicola A, Roibón WR, Boehringer SI, Benítez MC, Barceló MC, Alonso B, Alonso Z, Schneider M, Zumárraga M, Estevés MJ. Paratuberculosis ovina en Corrientes, Argentina. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz; 19 (3): 800-809.
39. Gonzales SRA, Ramirez CIC. Método de adsorción de anticuerpos no específicos y obtención de un antígeno protoplasmático, para el diagnóstico de la paratuberculosis. Técnica Pecuaria en México, 1986; 52: 99-104.
40. Iglesias RBZ, Valentí PJR, Rodríguez PIC, Pomares BEJ, Dovale BA, Rodríguez OT. Histología. Tomo I. Células y Tejidos. Capítulo I. 2007: 6-7.
41. Miranda BMV, Trueta SR, Chávez GG. Importancia económica de la Paratuberculosis bovina: Una revisión bibliográfica de los últimos 10 años. XXVIII Congreso Buiatría 2004. Morelia, Michoacán.