



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DE PROTEÍNAS DE BAJO PESO
MOLECULAR A PARTIR DE UN EXTRACTO CRUDO DE
Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* PARA EL
DIAGNÓSTICO DE PARATUBERCULOSIS POR FLUORESCENCIA
POLARIZADA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:
MVZ. RAQUEL TORRES VÉLEZ

TUTOR PRINCIPAL:
DR. en C. JOSÉ FRANCISCO MORALES ÁLVAREZ
(Facultad de Medicina, Veterinaria y Zootecnia, UNAM)

COMITÉ TUTORAL:
M. en C. MARCO ANTONIO SANTILLÁN FLORES
(Facultad de Medicina, Veterinaria y Zootecnia, UNAM)

DR. en C. VICTOR RUBÉN TENORIO GUTIÉRREZ
(Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM)

México, D.F. Enero, 2015



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.

El presente trabajo es parte del proyecto “Obtención y evaluación de proteínas de bajo peso molecular, para el diagnóstico de la tuberculosis y paratuberculosis por medio de la FPA”. Núm. SIGI 12484419581.

DEDICATORIAS

A mis padres. Porque han apoyado y confiado en mis decisiones. Y sobre todo que gracias a las bases que me establecieron, he logrado terminar otra meta.

A mis hermanos: Karina, Anayeli, Oscar, Lucero y Angel; por apoyarme con mi impaciencia y ausencias durante estos dos años. Los quiero hermanos.

A Lalito, Valeria y Matias; por que en los momentos más estresantes; siempre lograron sacarme una sonrisa.

A mis amigos de la maestría: Ana, Paul, Ricardo, Anita, Uriel, Pedro, Laura, Toño y Ari por su compañía, amistad, consejos y risas que compartimos durante estos dos años. Seguiremos siendo colegas y amigos durante un buen rato.

A mis amigos: Coral, Daniela, Alberto, Mari y Nancy; porque a pesar del tiempo y la distancia seguimos y seguiremos siendo amigos.

A Helia, por enseñarme que la vida es para vivirla y ser feliz. Muchas gracias.

A Alan, que a pesar del tiempo y las circunstancias seguimos cada uno por su camino, pero juntos.

A Romina, Pipo, Rita y Roberto; porque en los momentos de ausencia humana, estuvieron conmigo ofreciéndome su cariño.

A las bacterias, por mostrarme que aunque mis ojos no las vea; aprendes mucho de ellas. Ofreciendo otro mundo que un Médico Veterinario puede explorar.

AGRADECIMIENTOS

A la FES CUAUTITLÁN, por enseñarme que un veterinario puede hacer más que solo clínica de perros y gatos.

A la FMVZ y a los profesores que durante este tiempo me enseñaron que cada día descubres y aprendes algo nuevo.

Al CENID MICROBIOLOGÍA ANIMAL y el Laboratorio de Tuberculosis; por una vez más, permitirme que realizar el trabajo experimental y donde pude conocer a personal que ahora son mis amigos.

Al CINVESTAV; A la Dra. Mireya de la Garza y al Dr. Delfino, por su ayuda y aportaciones.

Al Dr. Marco; por su apoyo, paciencia y confianza que tuvo en mí durante la este tiempo. Muchas gracias.

A la Dra. Olga; por ayudarme a siempre hacer las cosas lo mejor posibles, por siempre ver más allá que el día de hoy y sobre todo por confiar en mí. Muchas gracias.

Al Dr. Francisco Morales, Dr. Víctor Tenorio, Dr. Dionicio y Dr. Fernando Díaz Otero; por sus sugerencias y aportaciones durante el desarrollo del trabajo.

A la Dra. Marcela Figueroa, Dra. Gaby Bárcenas, Dr. José Ángel Pabello y Dr. Fernando Díaz; por tomarse el tiempo de leer este trabajo y sus sugerencias para mejorarlo.

A la UNAM. Por permitirme seguir formando parte de su comunidad.
ORGULLOSAMENTE UNAM.

RESUMEN

El objetivo del trabajo fué estandarizar la técnica de fluorescencia polarizada, con proteínas antigénicas menores de 50 kDa de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map). Para la obtención del antígeno, se trabajó con la cepa 3065 de Map, se resembró en medio de cultivo líquido Proskawer & Beck con micobactina, se incubó a 37°C, por 12 semanas. Las células bacterianas se lavaron con PBS, se sonicaron y el material obtenido fué centrifugado y dializado. Se identificó el perfil y la antigenicidad de las fracciones proteicas por medio de Western Blot; usando sueros de bovinos naturalmente infectados con paratuberculosis. Se seleccionaron tres proteínas de aproximadamente 25, 35 y 47 kDa y se purificaron utilizando detergente Zwittergent 3-16. Se tomó 300 µg, 500 µg y 1000 µg de cada proteína y se disolvieron en 0.5 ml de NaOH 0.1 M, se incubaron a 37°C/60 min., se adicionó isotiocianato de fluoresceína (FITC) (30 mg/0.3 ml DMSO). Para la estandarización del ensayo de FPA, se evaluaron diferentes diluciones de los sueros controles positivos y negativos: 1:50, 1:100 y 1:200. Se realizó una primera lectura en el analizador de fluorescencia polarizada de los sueros diluidos, se agregaron 10 µl de la proteína marcada, se incubó por 5 min y se hizo una segunda lectura. El resultado fue expresado en unidades de mili-polarización (UmP). Al evaluar las distintas diluciones tanto de los controles positivos y negativos, con las proteínas marcadas a las concentraciones de 300 µg y 500 µg, el lector de fluorescencia no registro valores de mili-polarización. Al llevar a cabo los ensayos con las proteínas a la concentración de 1000 µg, se observó que con la proteína de 25 kDa en todas las diluciones tanto de los sueros positivos y negativos no existen diferencias en los valores de UmP. Con la proteína de 47 kDa se observan diferencias en los valores de la dilución 1:100 de ± 3 UmP. Con la proteína de 35 kDa con las diluciones de suero 1:100 se observaron resultados constantes y se tiene una diferencia de ± 30 UmP entre los controles positivos y negativos, por lo que esta proteína es el candidato más viable a utilizarse en la prueba de FPA. Para evaluar la especificidad y la sensibilidad se analizaron 50 sueros confirmados positivos y 50 confirmados negativos (PCR y cultivo). Se calculó el punto de corte de 126.0049 UmP, utilizando dos desviaciones estándar y un intervalo de confianza del 95%, que divide a los valores positivos de los negativos. Se evaluarán 603 sueros para establecerse la sensibilidad y especificidad; la cuál fue de 88.50% y 96.3% respectivamente. La FPA posee varias ventajas sobre otras técnicas serológicas, incluyendo la velocidad, simplicidad y adaptación de su uso a campo. Utilizando a la proteína de 35 kDa, marcada con FITC, se demostró que es un candidato viable para el diagnóstico de la paratuberculosis.

Palabras clave: paratuberculosis, fluorescencia polarizada, proteínas de bajo peso molecular, diagnóstico.

ABSTRACT

The objective of this investigation was to standardize the polarized fluorescence technique with antigen proteins under 50 kDa of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. The antigen was obtained using the strain Map 3065, and was cultured in a Proskauer and Beck with mycobactin liquid medium. It was incubated under 37°C for 12 weeks. The bacteria cells were then cleansed with PBS (Phosphate Buffer Solution), and were sonicated. The product was centrifuged and dialyzed. Through the use of Western blot the protein fractions were identified along with their antigenicity using bovine serum samples naturally infected with Paratuberculosis. Three proteins were selected with an approximate atomic weight of 25, 35, and 47 kDa and purified with Zwittergent 3-16 detergent. Samples were taken (300, 500, and 1000 µg) for each protein and dissolved in 0.5 mL of NaOH 0.1 M, and were incubated at 37°C/ 60 min., Fluorescein Isothiocyanate (FITC, 30mg/0.3mL of DMSO) was added. For the standardization of the FP trial different solutions of serum samples, both positive and negative control groups were evaluated (1:50, 1:100, and 1:200). The FPA analyzer took the first reading of the dilute serum samples, 10 µL of marked protein were added and incubated for 5 min., and then a second reading was taken. The result was expressed in units of milli-polarization (UmP). At the time to evaluate the different dilution, in both positive and negative controls, the proteins marked at 300 µg and 500 µg did not register UmP values. For the trials involving the concentrated proteins of 1000 µg, it was observed that the 25 kDa proteins in all dilutions of the serum samples, both positive and negative, showed no difference in UmP values. For the 47 kDa proteins a difference was observed for the values of the dilution 1:100 of +/-3 UmP, meanwhile the 35 kDa showed differences of +/- 30 UmP for the same serum dilution of 1:100, this result was seen in both positive and negative controls. Which make this protein a perfect candidate for a viable FPA trial. To evaluate the specificity and the sensibility, 50 serum samples were analyzed and confirmed positive and 50 confirmed negative (PCR and medium cultures.) The cutoff of 126.0049 UMP was calculated using two standard deviations and confidence interval of 95%, which divides the positive values of the negative. 603 sera were evaluated for sensitivity and specificity established; the which was 88.50 % and 96.3 % respectively. The FPA has several advantages over other serological techniques, including speed, simplicity and adaptation to field use. Using a 35 kDa protein, labeled with FITC, was shown to be a viable candidate for the diagnosis of paratuberculosis.

Keywords: paratuberculosis, polarized fluorescence, low molecular weight proteins, diagnosis.

INDICE

1.0 Introducción.....	1
2.0 Planteamiento del problema	2
3.0 Hipótesis,.....	3
4.0 Objetivo general	4
4.1 Objetivos particulares	5
5.0 REVISIÓN DE LA LITERATURA	
5.1. Etiología	6
5.2. Patogenia	7
5.3. Signos clínicos	9
5.4. Lesiones	11
5.5. Diagnóstico.....	12
5.6. Fluorescencia Polarizada (FPA)	13
5.7. Antígenos micobacterianos	16
5.8. Prevención y control	18
6.0 MATERIALES Y MÉTODOS	
6.1. Localización	20
6.2. Cepas bacterianas	20
6.3. PCR Anidada	20
6.4. Obtención del antígeno	21
6.5. ELISA	22
6.6. Western Blot	23
6.7. Purificación proteica	24
6.7.1. Detergente Zwittergent 3-16	24
6.7.2. Marcaje con Isotiocionato de fluoresceína	25
6.8. Fluorescencia Polarizada (FPA)	25

6.9. Determinación del punto de corte	26
6.10. Determinación de la sensibilidad y especificidad	26
7.0 RESULTADOS	
7.1. Cepas bacterianas	27
7.2. PCR Anidada	27
7.3. Western Blot	28
7.4. Purificación protéica	29
7.4.1. Marcaje con Isotiocionato de fluoresceína	31
7.5. Fluorescencia Polarizada (FPA)	32
7.6. Determinación del punto de corte	35
7.7. Determinación de la sensibilidad y especificidad	38
7.7.1. Determinación de la concordancia (Prueba de Kappa)	39
8.0 DISCUSIÓN	41
9.0 CONCLUSIONES	46
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
11. APÉNDICES	55

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

TABLA 1. Sueros controles positivos y negativos de paratuberculosis utilizados para la estandarización de la prueba de FPA.

TABLA 2. Promedio de valores obtenidos en la prueba de FPA, utilizando como antígeno marcado con FITC, la proteína de 25 kDa (1000 µg) de Map. Los valores son expresados en UmP.

TABLA 3. Promedio de valores obtenidos en la prueba de FPA, utilizando como antígeno marcado con FITC, la proteína de 25 kDa (1000 µg) de Map. Los valores son expresados en UmP.

TABLA 4. Promedio de valores obtenidos en la prueba de FPA, utilizando como antígeno marcado con FITC, la proteína de 47 kDa (1000 µg) de Map. Los valores son expresados en UmP.

TABLA 5. Resultados de índice de concordancia, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo; al comparar FPA, ELISA y PCR.

TABLA 6. Resultados curva de ROC; al comparar FPA, ELISA y PCR.

FIGURA 1. Gel de agarosa al 3% de los productos amplificados de 210 pb de cada cepa de Map que corresponde a la secuencia de inserción IS900. Carril 1: peso molecular, carril 2 cepa K-10, carril 3: blanco, carril 4: cepa 91-204, carril 5: cepa 3065, carril 6: cepa 455.

FIGURA 2. Gel SDS-PAGE al 12% teñido con azul brillante de Coomassie, del antígeno obtenido de la cepa de Map 3065 a diferentes concentraciones: 5, 10, 15, 20, 30, 40 y 50 µg respectivamente.

FIGURA 3. Inmunoblot en membrana PVDF del antígeno de la cepa Map 3065. Se observan 3 bandas antigénicas de: 25 kDa, 35 kDa y 47 kDa aproximadamente.

FIGURA 4. Tinción de plata del gel SDS-PAGE 12% de fracciones proteicas purificadas.

FIGURA 5. Inmunoblot en membrana de nitrocelulosa de fracciones proteicas purificadas a partir del antígeno protoplasmático de la cepa de Map 3065.

FIGURA 6. Marcaje con FITC, de las tres proteínas antigénicas purificadas.

GRAFICA 1. Comparación de los promedios y desviaciones estándar de las diluciones de las tres proteínas purificadas. La proteína de 35 kDa presenta las desviaciones estándar menores de: 16.98 y 19.40 respectivamente.

GRAFICA 2. Comparación de las desviaciones estándar de las diluciones de las tres proteínas purificadas. La proteína de 35 kDa presenta las desviaciones estándar menores de: 16.98 y 19.40 respectivamente.

GRAFICA 3. Valor mínimo y máximo de UmP obtenidos, utilizando dos desviaciones estándar y un intervalo de confianza de 95%. Los animales con valores iguales o mayores a 126.0049 UmP son considerados como positivos y los menores a este valor son considerados como negativos.

GRAFICA 4. Curva de ROC, donde se observa la sensibilidad y especificidad obtenida con los 100 sueros controles (intervalo de confianza del 95%).

GRAFICA 5. Gráfica que muestra el punto de corte de 126.0049 UmP, utilizando dos desviaciones estándar y un intervalo de confianza del 95%, que divide a los valores positivos de los negativos.

GRAFICA 6. Curva de ROC, correspondiente a la comparación de FPA, ELISA y PCR. Siendo: Prueba 1: PCR, Prueba 2: FPA, Prueba 3: ELISA.

1.0 INTRODUCCIÓN

La paratuberculosis tiene su importancia en la ganadería nacional por las pérdidas económicas en la producción pecuaria de pequeños y grandes rumiantes, debidas principalmente a sacrificios, disminución de la producción y trastornos reproductivos (Diacovich, 2010). El agente etiológica es *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) (Blood, 1992; Arsenault, 2014).

A pesar de los progresos realizados en el análisis de los mecanismos de patogenicidad, una prueba de diagnóstico de alta sensibilidad y especificidad para la detección de animales con infección subclínica no se ha desarrollado. El aislamiento por cultivo de Map es considerado como “la prueba de oro”, pero requiere procedimientos especializados que dependen de la cantidad de bacterias presentes en la muestra y de la descontaminación de los especímenes clínicos. Un gran inconveniente es el tiempo para obtener un cultivo positivo: de 6 a 12 semanas. (Diacovich, 2010; Arsenault, 2014).

2.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La paratuberculosis se considera un serio problema que ocasiona pérdidas económicas en la industria pecuaria, por lo que es necesario contar con pruebas diagnósticas rápidas, eficaces y de fácil acceso que permitan detectar a los animales infectados en la etapa subclínica de la enfermedad y de este modo poder establecer las medidas de control necesarias.

3.0 HIPÓTESIS

La obtención y el uso de proteínas de bajo peso molecular a partir de un extracto crudo de una cepa de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*; servirán como antígenos para llevar a cabo el diagnóstico de paratuberculosis en rumiantes, por medio de la prueba de fluorescencia polarizada.

4.0 OBJETIVO GENERAL

Obtener y evaluar proteínas de bajo peso molecular a partir de un extracto crudo de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* que se puedan emplear en el diagnóstico de la paratuberculosis en bovinos.

4.1. OBJETIVOS PARTICULARES

- ♣ Identificar el perfil proteico de las cepas de *M. a. paratuberculosis*.
- ♣ Evaluar la capacidad antigénica de las fracciones proteicas.
- ♣ Purificar las proteínas antigénicas.
- ♣ Realizar el marcado de proteínas con fluorocromo.
- ♣ Estandarizar la prueba de fluorescencia polarizada (FPA).

5.0. REVISIÓN DE LA LITERATURA

La paratuberculosis o enfermedad de Johne es una enfermedad infecto contagiosa, se caracteriza por producir una enteritis granulomatosa de curso crónico que ocasiona un síndrome de mala absorción; el agente etiológica es *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Blood, 1992; Arsenault, 2014). La enfermedad provoca pérdidas económicas en pequeños y grandes rumiantes, debidas a sacrificios, disminución de la producción y trastornos reproductivos (Diacovich, 2010).

La paratuberculosis es una enfermedad de distribución e importancia económica mundial; donde su prevalencia varía de 5 a 25%. (Blood, 1992; Disney, 2005).

5.1. Etiología

El agente causal es *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (Map), bacilo acido-alcohol resistente, anaeróbico facultativo e intracelular. Mide de 1.5 a 2 μm de largo por 0.5 μm de ancho y es inmóvil. Está clasificado dentro del complejo *Mycobacterium avium intracelullare*, en el cuál se encuentran: *M. avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, *M. avium* subsp. *silvativum* y *M. intracelullare*; se diferencian de las otras subespecies del complejo por su dependencia de micobactina para su crecimiento *in vitro* y la estimulación de su crecimiento con piruvato. (Gerrit, 2005; Rebhun, 1995).

Es un microorganismo de crecimiento lento y difícil cultivo ya que necesita medios de cultivo especiales ricos en micobactina y otros compuestos como el ácido oleico, albumina, dextrosa, catalasa (oadc) y extracto de carne, observándose colonias en un periodo mínimo de 8 semanas (Eltholth, 2009).

Las colonias de 1 a 5 mm de diámetro son redondas, pueden ser firmes y suaves, lisas o rugosas con una variación en su color que va del amarillo a naranja (Rodríguez, 2005).

La micobacteria resiste las condiciones ambientales y puede persistir en el excremento y aguas estancadas por un año o más. Es susceptible a desinfectantes como el orto-ferrilfenato de sodio y la creosota (Disney, 2005; Mon, 2012).

5.2. Patogenia

Una vez que la micobacteria es ingerida por el hospedero, en el intestino penetra las células M de las placas de Peyer; se da la interacción de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) del microorganismo con el receptor de la célula fagocítica, como puede ser el receptor de manosa del macrófago (MMR), el receptor tipo Toll 2 (TLR2) y el CD14, entre otros. Después es transportada en vacuolas dentro del macrófago. Las vacuolas muestran características de endosoma temprano, impidiendo su acidificación para evitar que madure a endosoma tardío y fusión lisosomal; específicamente las micobacterias retienen a la GTPasa RAB5 en el endosoma temprano pero excluyen selectivamente a la GTPasa RAB7 la cuál regula el tráfico vesicular y la maduración del fagosoma (Abbas, 2004; Trejo, 2012; Arsenault, 2014).

Además, los ácidos micólicos, el peptidoglicano y el arabinogalactano de la pared celular de la micobacteria evitan la degradación intracelular y permiten su multiplicación dentro del macrófago; se ha reportado que el MMR favorece la secreción de interleucina 10 (IL-10), lo que es una ventaja para la micobacteria ya que se ha demostrado que la presencia de esta interleucina favorece la replicación del bacilo. Una vez que se replican en gran número e infiltran la submucosa intestinal, ocasiona un proceso inflamatorio de tipo crónico lo que origina disminución de la absorción de nutrientes y diarrea crónica (Blood, 1992; Abbas, 2004; Arsenault et al. 2014).

La respuesta inmune humoral, es poco eficaz ya que al ser Map una bacteria intracelular, pasa inadvertido por las inmunoglobulinas. En este caso, la respuesta inmune celular juega un papel importante en la paratuberculosis, los linfocitos T CD4+ (tipo Th1) se activan al reconocer los antígenos proteicos de bajo peso molecular expresados en la superficie de las células presentadoras de antígenos (en este caso los macrófagos). Los linfocitos Th1 actúan en las proteínas asociadas a la membrana y en un rango de citocinas solubles, las cuáles coordinan acciones locales y distantes de la respuesta inmune a patógenos intracelulares, además activan a macrófagos infectados a través de contacto celular y la secreción de interferón gama (IFN γ), lo que origina una serie de respuestas bioquímicas que convierten al macrófago en una célula efectora antimicrobiana potente: el número de moléculas clase II del MHC, moléculas B7, CD40 y receptores TNF sobre la superficie de macrófagos se incrementan (Trejo, 2012; Craven, 2000; Siguroadottir, 2004).

El reclutamiento de células como linfocitos T CD4+, monocitos, neutrófilos, macrófagos y células Natural Killer (NK) en el sitio de infección es modulado por un complejo conjunto de citocinas y quimiocinas producidas por múltiples tipos de células como macrófagos, el reclutamiento de estas células promueve la activación y producción de citocinas y quimiocinas, provocando la formación del granuloma para tratar de contener la infección por micobacterias. (Arsenault et al. 2014).

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) es una citocina que parece ser crítica en el mantenimiento en la estructura del granuloma; los macrófagos son una fuente importante de TNF- α , el cual actúa como una señal de retroalimentación positiva para que los macrófagos infectados secreten más TNF- α y citocinas (Trejo, 2012; Siguroardottir, 2004).

El aislamiento de Map puede ser del feto, útero, placenta y leche; se excreta principalmente por vía fecal en las etapas subclínica y clínica de la infección. La paratuberculosis no es una enfermedad con signología evidente, pero su propagación lenta y su curso crónico originan pérdidas económicas continuas (Abbas, 2004; Trejo, 2012).

5.3. Signos clínicos

En los bovinos, la enfermedad se caracteriza por una enteritis crónica, cuyos síntomas son: diarrea, edema submandibular, pérdida de peso y de la condición corporal que conduce; eventualmente, a la muerte del animal afectado. Se manifiesta a la edad adulta (2 o más años), sobre todo en las proximidades del parto; es menos frecuente a edades menores y muy raramente se presenta alrededor del año de vida. (Speer, 2006; Cirone, 2007).

La signología clínica solo se observa en animales adultos entre 18 y 24 meses de edad. El apetito y la conducta del animal permanecen normales en las etapas tempranas, pero la producción láctea y la condición corporal se deterioran por la pérdida de proteína. A medida que progresa la enfermedad se presenta letargia, depresión, pelo hirsuto, anemia, hipoproteinemia y edema intermandibular (Harris, 2006).

De los animales con infección crónica, algunos desarrollan la enfermedad clínica después de un tiempo de incubación prolongado de 2 a 5 años. Los animales jóvenes adquieren la infección por la ingestión de las bacterias, principalmente a través de la alimentación, el agua y los pezones contaminados con heces (Disney, 2005).

Se considera que los animales que estuvieron en contacto con el bacilo pueden pasar por tres estadios durante el desarrollo de la enfermedad: (Abalos, 2006; Diacovich, 2010).

- ♣ Estadio I: Animales resistentes no infectados; nunca se infectaron o desarrollaron inmunidad activa que resulto en la eliminación completa de la enfermedad.

- ♣ Estadio II: Animales portadores; estos animales desarrollan resistencia rápidamente, controla la infección y se convierte en portador, son aquellos que son detectados por pruebas serológicas o cultivo a partir de heces. Desarrollan inmunidad celular y humoral. También se pueden encontrar animales diseminadores esporádicos; en este grupo la infección no se controla por completo, algunos animales controlaran parcialmente la infección pero eliminarán el microorganismo de forma intermitente, no muestran signos excepto por disminución en la producción.

- ♣ Estadio III: Animales clínicamente enfermos; en este grupo el microorganismo persiste en la mucosa intestinal y los casos clínicos surgen de entre estos animales, se presenta emaciación, edema submandibular, diarrea, son grandes diseminadores, tienen alta tasa de anticuerpos y baja inmunidad celular.

Se considera que Map puede ser el agente etiológico de la enfermedad de Crohn en humanos; ya que ha sido esporádicamente aislado de pacientes con la enfermedad de Crohn. En algunos estudios, se ha encontrado una forma de Map deficiente en el desarrollo de su pared, por lo cuál es denominada protoplasto. En la forma de protoplastos, el Map es difícil de cultivar, además que no se tiñe con la tinción diagnostica Ziehl Neelsen; debido a esto se especula que es difícil detectar su presencia en el tejido de humanos afectados de la enfermedad de Crohn, por lo que continua siendo un tema de controversia (Shanahan, 2005; Cirone, 2007).

5.4. Lesiones

La infección se establece en la lámina propia del intestino, las lesiones macroscópicas por Map se presentan sobre el todo el intestino delgado; invadiendo progresivamente la mucosa de íleon, válvula ileocecal, ciego, colon y nódulos linfáticos mesentéricos. Se presenta hipertrofia difusa de la mucosa del yeyuno e íleon con apariencia rugosa y color pálido de hasta tres o cuatro veces más respecto a su grosor normal (Shanahan, 2005; Willemsen, 2006; Eltholt, 2009; Diacovich, 2010).

Los nódulos linfáticos mesentéricos e ileocecales se encuentran hiperplásicos y edematosos, en ovinos puede haber necrosis, caseificación y calcificación (Disney, 2005; Diacovich, 2010).

En los ovinos las lesiones quedan restringidas a la parte posterior del aparato digestivo y nódulos linfáticos cercanos; afectando la porción terminal del intestino delgado, el ciego y la primera parte del colon en casos avanzados las lesiones se extienden desde el recto hasta el duodeno. Puede observarse una pigmentación amarilla intensa de la pared intestinal y con engrosamiento. Las lesiones de las cabras son semejantes a las de los bovinos. En el caso de los fetos infectados, no se producen lesiones pero el microorganismo puede ser aislado a partir de vísceras, así como de placenta y útero (Disney, 2005; Lei, 2008).

Las lesiones histológicas corresponden a una reacción inflamatoria granulomatosa que se caracterizan por la presencia de una gran cantidad de histiocitos, macrófagos y células epitelioides (Lei, 2008; Hermon, 2000).

Las lesiones granulomatosa se dividen en dos tipos:

- a) Multibacilar (Iepromatoso), se caracteriza por carencia de organización, con una gran cantidad de macrófagos con abundantes bacilos e infiltración desorganizada de linfocitos.

- b) Paucibacilar (tuberculoide), se caracteriza por lesiones nodulares organizadas, rodeadas y delimitadas por tejido conectivo fibroso; en su interior existen abundantes células gigantes multinucleadas, macrófagos y linfocitos y escasas micobacterias.

Los granulomas de tipo multibacilar son característicos de lesiones entéricas que se desarrollan durante una infección con Map, estos granulomas pueden expandir la pared intestinal, provocando la pérdida de la función de la mucosa intestinal (Craven, 2000; Thole, 2002).

5.5. Diagnóstico

Considerando que la paratuberculosis es un problema de rebaño y que conforme pase el tiempo esta se irá incrementando dentro del mismo, el detectar y remover los animales infectados son la clave en el control y erradicación de la enfermedad. Además, debido a la característica crónica de la enfermedad, la paratuberculosis presenta la modalidad “pico del iceberg”, es decir; en el instante que se descubra el primer caso clínico, el número de animales infectados en el rebaño puede ser mayor de lo que se piensa (Disney, 2005; Castellanos, 2010).

Es importante realizar un monitoreo constante de los rebaños empleando una prueba serológica y una prueba que detecte a *M. avium* subsp. *paratuberculosis* en heces, por lo que el uso de la PCR empleando ADN obtenido a partir de heces, se convierte en una alternativa que ofrece tener un diagnóstico rápido y preciso (Diacovich, 2010; Disney, 2005).

A pesar de los progresos realizados en el análisis de los mecanismos de patogenicidad, el aislamiento por cultivo de Map es considerado como “la prueba de oro”, pero requiere procedimientos especializados que dependen de la cantidad de bacterias presentes en la muestra y de la descontaminación de los

especímenes clínicos. Un gran inconveniente es el tiempo para obtener un cultivo positivo (de 6 a 12 semanas) (Hughes, 2008; Tiwari, 2006).

Sin embargo, una prueba en el diagnóstico es la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la que emplean los iniciadores diseñados a partir de la secuencia nucleotídica IS900 la cuál es específica de Map, con la que es posible detectar ADN en leche, excremento, queso, etc. con rapidez y una elevada sensibilidad y especificidad (Cirone, 2007; Hughes, 2008).

El diagnóstico serológico en pequeños rumiantes es recomendable realizarlo mediante la inmunodifusión en agar (IDAG) (Jaimes, 2008). El diagnóstico mediante ELISA se ha utilizado para la detección de animales con paratuberculosis, siendo una buena opción ya que existen varias marcas de paquetes comerciales, que cuenta con una sensibilidad del 50 al 83% y una especificidad del 70 al 89% (Jaimes, 2008; Martínez, 2010).

El análisis de antígenos proteicos de Map, se realiza mediante el Western blot o inmunoblot. Es un sistema rápido y muy sensible para la detección y caracterización de proteínas que se basa en la especificidad de reconocimiento entre antígeno y anticuerpo. Implica la separación por electroforesis por el sistema SDS-PAGE y una transferencia cuantitativa e irreversible a una membrana (Laemlli, 1970; De la Fuente, 2007).

La electroforesis en gel más utilizada es, conocida como SDS-PAGE, hace uso de gel de poliacrilamida y de tampón con dodecilsulfato de sodio (SDS) que es un detergente que le da una carga negativa a las proteínas. En esta técnica las proteínas sufren un tratamiento por agentes reductores que provocan la pérdida de las estructuras secundaria y terciaria y mantiene a los polipéptidos en este estado desnaturalizado (De la Fuente, 2007; Alberts, 2004).

Para que las proteínas sean accesibles a la detección por anticuerpos, se les transfiere desde el gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa o de PVDF (polifluoruro de vinilideno). Esta transferencia puede realizarse por difusión, por vacío o por acción de un campo eléctrico. Las membranas que se emplean en el Western blot se caracterizan por su capacidad de unir proteínas de forma inespecífica, es decir; se adhieren a todas las proteínas con idéntica afinidad. En la detección se comprueba la presencia en la membrana de una determinada proteína. Para ello se emplea un anticuerpo primario o policlonal y un segundo anticuerpo o monoclonal, el cual permite amplificar la reacción antígeno-anticuerpo (Gallagher, 2008).

5.6. Fluorescencia Polarizada (FPA)

La técnica de Fluorescencia Polarizada (FPA), es una técnica sencilla para determinar la interacción antígeno-anticuerpo, puede realizarse en el laboratorio y en otras circunstancias en el campo. Es una prueba homogénea que, al no requerir la separación de los compuestos analizados, es muy rápida de efectuar (Samartino, 1999).

Se tiene un conjunto enorme de moléculas que se mueven y giran libremente en solución, y el resultado que obtengamos va a depender de cuanto ha podido rotar la molécula durante el tiempo de fluorescencia en el estado excitado. Entre más pequeña sea la molécula, más rápidamente rotará, y su polarización de la fluorescencia será menor, o lo que es lo mismo, mayor despolarización de la fluorescencia habrá ocurrido (Nielsen, 2001).

El estado excitado tiene un tiempo de vida determinado antes de que ocurra la emisión de luz. Durante este tiempo la molécula rota aleatoriamente, por lo tanto emitirá luz despolarizada, es decir que el plano de luz emitida difiere de la del plano de excitación. Aquellas moléculas o complejos moleculares que giren lentamente habrán adoptado, al momento de la emisión; una posición aleatoria

pero similar a cuando fueron excitadas. Esto resulta en una alta polarización de la fluorescencia. Aquellas moléculas o complejos moleculares que giren rápidamente, tomarán, antes de que ocurra la emisión de luz, una posición aleatoria, distinta de cuando fueron excitadas. Esto resulta en una baja polarización de la fluorescencia (Surujballi, 2002; Jolley, 2007).

El mecanismo se basa en la rotación aleatoria de las moléculas en solución. El tamaño molecular es el factor principal que influencia la velocidad de rotación. Por ejemplo, una molécula pequeña gira a una velocidad más alta que una molécula grande. Si una molécula se marca con un fluorocromo, se puede determinar el tiempo de rotación a través de un ángulo de 68.5° midiendo la intensidad de la luz polarizada en planos verticales u horizontales. Una molécula grande emite más luz en un único plano (más polarizada) que una pequeña que gira más deprisa y emite luz más despolarizada (Samartino, 1999).

La FPA se puede realizar en tubos de vidrio de borosilicato o en formato de placa de 96 pocillos; el suero sospechoso se diluye en tampón de fosfatos, se mezcla y se realiza una primer lectura en el analizador de fluorescencia polarizada (FPM), posteriormente se agrega la proteína purificada ya marcada con el fluorocromo, se mezcla, se incuba y se hace una segunda lectura con el FPM. La fluorescencia polarizada de una muestra es medida y los resultados son expresados en unidades de milipolarización (UmP). Siempre debe incluirse un suero control positivo, un suero control negativo (Samartino, 1999; Hashemi, 2014).

En la FPA, es importante que el antígeno sea de pequeño peso molecular, inferior a 50 kDa y que emita una intensidad total de fluorescencia de 250 000 a 400 000 UmP. Se añade el suero problema para detectar la presencia de anticuerpo. Si están presentes anticuerpos, la unión con el antígeno marcado provoca un descenso en su velocidad rotacional que puede medirse en UmP (Jolley, 2007).

Esta prueba posee varias ventajas sobre otras técnicas serológicas, incluyendo la relación costo, efectividad, velocidad, simplicidad y adaptación de su uso a campo. (Jolley, 2007; Hashemi, 2014).

La fluorescencia polarizada se utiliza en el diagnóstico de la brucelosis bovina. En este caso, el suero se diluye 1:100 o si se emplea sangre tratada con EDTA a 1:50. Se emplea como antígeno un fragmento de bajo peso molecular (22 kDa) del OPS (O-polysaccharide) de *B. abortus* y se marca con isotiocinato de fluoresceína (FITC). Una lectura superior al umbral predeterminado indica una reacción positiva. La sensibilidad y una especificidad de la prueba es de 100 y 95.5% respectivamente (Manual de la OIE, 2012).

También hay estudios con FPA en tuberculosis bovina, el suero sospechoso se diluye 1:5 en tampón de fosfatos, se mezcla y se realiza la primer lectura en el FPM. Posteriormente se adiciona la proteína antigénica MPB70 purificada de *M. bovis*, se mezcla y se hace la segunda lectura en el FPM. Se maneja que resultados menores a 170 UmP son sueros negativos y ≥ 170 UmP son sueros positivos. La sensibilidad es de 92.9% y la especificidad de 98.3% (Jolley, 2007, Surujballi, 2002).

5.7. Antígenos micobacterianos

Se tienen dos grandes estrategias para identificar y caracterizar antígenos proteicos de micobacterias; la primer estrategia se basa en la selección de bibliotecas de expresión genómica utilizando anticuerpos y las células T como sondas, y este enfoque ha conducido a la identificación de una multitud de antígenos proteicos, un análisis posterior de la secuencia de los genes correspondientes ha permitido la caracterización adicional y el papel funcional en la célula micobacteriana. La segunda estrategia se ha centrado en el uso de métodos bioquímicos para caracterizar antígenos en fracciones subcelulares, con un énfasis particular en los componentes presentes en los filtrados preparados a

partir de cultivos de micobacterias. La determinación de aminoácidos de los componentes aislados de dichas fracciones, complementados con la genética invertida, ha llevado a la identificación de un conjunto adicional de proteínas (Hirschfield, 1990; Cho, 2006; Mon, 2012).

El principal factor de virulencia de las micobacterias es su pared celular rica en lípidos que le permite inhibir la maduración del fagosoma y por lo tanto su acidificación, de manera que sobreviven y se replican dentro de los macrófagos del hospedador (Bannantine, 2010; Souza, 2011).

La pared celular de Map también le confiere resistencia al ambiente y a los quimioterapéuticos, características que pueden exacerbarse cuando forma biopelículas o biofilms, las cuales favorecen la supervivencia de esta micobacteria en condiciones de estrés y por lo tanto, su persistencia como fuente de infección lo que podría contribuir a la diseminación de la enfermedad en los hatos y rebaños. La formación de biopelículas depende de los glicopeptidolípidos (GLP) que son un constituyente mayoritario de la pared celular micobacteriana (Kreeger, 199; Mon, 2012).

Las micobacterias comparten factores de virulencia similares, sin embargo existen antígenos de Map que son importantes y son utilizados en el diagnóstico de la paratuberculosis. Entre los antígenos que se han trabajado destacan:

Los genes de entrada a células mamíferas cuyos productos de expresión génica (las proteínas *mce*) son esenciales para la entrada celular y supervivencia en el interior de los macrófagos. En Map estos genes se encuentran formando ocho operones que están distribuidos a lo largo de todo el genoma y de los cuales, al igual que en *M. smegmatis*, los operones *mce5* y *mce7* están presentes en dos copias. Hasta la fecha no se han descrito cepas pertenecientes a Map que

presenten una delección natural de cualquiera de estos operones *mce* (Hughes, 2008; Kreeger, 1991).

También, las proteínas miembros de la familia PE/PPE: PE (Prolina-ácido glutámico) y PPE (Prolina-prolina-ácido glutámico) localizadas en los dominios conservados y próximos al extremo N terminal. Estas proteínas son específicas de micobacterias y en Map hay un total de seis proteínas PE y 36 proteínas PPE homólogas a las descritas en el genoma de *M. tuberculosis* y las cuáles comprenden tan sólo un 1% de la totalidad del genoma de Map. Algunas de estas proteínas PPE se han visto involucradas en la virulencia de cepas de *M. a. paratuberculosis* en ratones y en el crecimiento intracelular de este microorganismo en el interior de macrófagos (Hughes, 2008; Bannantine, 2010).

Las secuencias únicas y conservadas de los genes PE/PPE en *M. a. paratuberculosis* hacen que el empleo de algunos de ellos como diana para la detección de este microorganismo sea una alternativa para aumentar la especificidad y sensibilidad de las diferentes pruebas diagnósticas (Mikkelsen, 2011; Souza, 2011).

En otro estudio experimental realizado en Map en el que se emplearon anticuerpos policlonales específicos y posteriormente se evidenció mediante inmunofluorescencia, se demostró que dos proteínas PPE (MAP1506 y MAP3420c) también son expresadas en la superficie de microorganismos viables (Hughes, 2008; Mikkelsen, 2011; Kreeger, 1991).

Otro antígeno descrito es la proteína de superficie celular de 35 kDa, a la cuál se la atribuye un posible papel en el proceso de interacción entre Map y las células intestinales del hospedador. Se ha descrito en Map tres operones (*fep*, *mpt* y *sid*), a los cuáles se les asignó un posible papel en el metabolismo del hierro (Cirone, 2007). Otro trabajo demostró la función desempeñada por la proteína

homóloga de unión a la fibronectina (*fibronectin attachment protein homologue*, FAP-P) durante el proceso de invasión de las células M, localizadas en las placas de Peyer (Hermon, 2000).

En otro estudio, en el que se emplearon modelos *in vivo* con ratones, se observó que las cepas mutantes de Map con disrupciones en los genes *fabG2_2*, *gcpE*, *impA*, *kdpC*, *papA2*, *pstA* o *umaA1* presentaban una atenuación en la virulencia en relación a la colonización de tejidos (Kreeger, 1991; Hughes, 2008; Souza, 2011).

Esto demuestra, el papel de estas proteínas en la virulencia y patogénesis de Map y su uso en la elaboración de antígenos para el diagnóstico de la paratuberculosis.

5.8. Prevención y Control

Una de las alternativas para el control de la paratuberculosis en becerros recién nacidos es la separación de la madre, inmediatamente al nacer o en un periodo de 6-12 hrs. Es recomendable reducir la exposición de los recién nacidos a excretas o humedad; manteniéndolos en espacios separados. Así mismo se debe evitar al extremo la contaminación del alimento con excretas utilizando comederos tipo canoa, evitar utilizar el mismo equipo al manejar el alimento y la remoción de las excretas. (Bannantine, 2010).

También se debe evitar la contaminación del agua con excretas. Considerando las necesidades de calostro de los animales recién nacidos, se deben alimentar con calostro proveniente de madres negativas a paratuberculosis; cuando se colecte calostro de madres negativas, limpiar y desinfectar bien la ubre y los pezones para evitar la contaminación con heces (Conigliaro, 2003; Souza, 2011).

6.0 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Localización

El proyecto se inició en abril de 2012, en el laboratorio de Tuberculosis del CENID-Microbiología Animal del Instituto Nacional de Investigación Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Ubicado en el Km 15.5 de la carretera Federal México-Toluca. Cuajimalpa, Distrito Federal.

6.2. Cepas bacterianas

Se trabajó con la cepa de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map): K-10 (ATCC BAA-968/K-10), 3065, 455 y 91-204. Las cepas de Map se trabajaron bajo las siguientes condiciones: K-10 se resembró en 500 ml de caldo Middlebrook 7H9 con OADC y micobactina J (2mg/l), para las cepas 91-204, 455 y 3065 se utilizó 500 ml de medio Proskauer and Beck enriquecido con suero fetal bovino y micobactina J (2mg/l) cada una; los cultivos se incubaron en aerobiosis a 37 °C durante 12 semanas.

6.3. PCR-Anidada

Para la prueba de PCR anidada, se realizó la extracción de ADN a partir de la cepa Map 3065, mediante la técnica descrita por Van Soolingen, D. (1991).

Siguiendo el procedimiento descrito por Jaimes, NG. *et al.* (2008). Se utilizaron los iniciadores descritos por Erume, J. *et al.* (2001). paratb1 (5' TGA TCT GGA CAA TGA CGG TTA CGG A 3') y paratb4 (5' CGC GGC ACG GCT CTT GTT 3') con los que se obtiene un producto de amplificación de 563 pares de bases para la primera reacción y paratb2 (5' GCC GCG CTG CTG GAG TTA A 3') y paratb3 (5' AGC GTC TTT GGC GTC GGT CTT G 3') con los que se obtuvo un producto de 210 pares de bases para la segunda reacción.

En la primera reacción se utilizaron 3 µl (40 ng) de ADN proveniente de la cepa bacteriana, las condiciones para 17 µl de premezcla fueron: 5 µl de amortiguador

de PCR (Reaction Buffer [5x] - Finnzymes), 1 μ l de dNTP (10 mM dNTP Mix PCR Grade – Invitrogen Lot. 783600), 1 μ l paratb 1 (25pMol), 1 μ l paratb 4 (25 pMol), 0.6 μ l de DMSO (F-515 DMSO – Finnzymes Lot. 59), 0.2 μ l (40 ng) de ADN Polimerasa Termoestable (Fynnzymes), 9.4 μ l de agua miliQ y 3 μ l de ADN proveniente de las cepas. la amplificación se realizó en un Termociclador (Thermo ELECTRON CORPORATION) utilizando el programa: Desnaturalización inicial a 98 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos a 98 °C por 30 seg, 65 °C por 30 seg y 72 °C por 30 seg, una extensión final a 72 °C/3 min y 4°C por 3 min.

Para la segunda reacción se tomaron 3 μ l de la primera reacción; las condiciones y cantidades de cada reactivo para 17 μ l de premezcla fueron las mismas como en la primera reacción, solo se sustituyeron los iniciadores paratb2 y paratb3. Se utilizó el mismo programa del termociclador.

Los productos de amplificación fueron visualizados en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (Sigma Chemical Co., Estados Unidos de América). Se corrieron en una cámara de electroforesis (GIBCO BRL Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus) a 100 Volts por 40 min.

6.4. Obtención del antígeno bacteriano

Se usaron cultivos con 12 semanas de incubación; las colonias se colocaron en tubos de ultracentrifugación, cada uno con capacidad para 40 ml. Se utilizó el protocolo establecido por Hernández, COA. (2006).

Las bacterias se concentraron por centrifugación a 900 xg por 10 min. y lavaron con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.2, tres veces se retiró el sobrenadante. La pastilla de los tubos se pasó a uno nuevo y se le adicionó PBS hasta alcanzar un volumen de 45 ml.

Las células se rompieron usando un sonicador ULTRASONIC PROCESOR, dando 20 ciclos de 59 seg cada uno y con un descanso de 59 seg.

Posteriormente el material sonicado se pasó a dos tubos de plástico nuevos y se centrifugaron a 900 xg por 90 min. Se tomó únicamente el sobrenadante y se colocó dentro de una membrana de membrana de celulosa (21 a 33 mm de

diámetro promedio) (Sigma-Aldrich) durante 18 h celulosa, el dializado se realizó en movimiento durante 18 hr a 4°C. El dializado fue congelado a -170 °C durante 2 h, para posteriormente liofilizarlo. La concentración proteica se determinó utilizando el método Bradford. Bradford (1976).

6.5. ELISA

Se colocaron 100 µl de antígeno de Map cepa 3065 por pozo en la placa de 96 pozos, se mantuvieron en incubación a 37°C, durante 24 hrs (Martínez *et al*, 2001), se lavaron cuatro veces con 300 µl de solución de lavado PBS-Tween 20 (0.5%) pH 7.4 y se colocaron 100 µl de solución de bloqueo (Albúmina 1%), la placa se incubó a 37° C durante 1 hr 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 uso.

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 20. Con la finalidad de reducir la reactividad cruzada con otras micobacterias.

Se hizo la dilución 1:160 de los sueros problema 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 (Bech-Nielsen, 1992) (ALLIED MONITOR, INC) a una concentración de 1:160; en cada pozo se colocaron 100 µl de los sueros problema y de los controles negativos y positivos, se incubaron a temperatura ambiente por 30 min y se lavó con 300 µl de PBS-Tween 20, cuatro veces.

Se agregó 100 µl de conjugado Anti-IgG bovino HRP (SIGMA) en una dilución 1:10 000 en cada pozo y 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) (AMPRESO) a cada pozo, se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. La lectura se realizó a 650 nm en un espectrofotómetro de ocho canales (ELx800, BioTek).

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

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

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

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

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

Son considerados como positivos a la prueba de ELISA, los sueros con un valor mayor o igual a 0.22 densidades ópticas (OD).

6.6. Western Blot

Usando membranas PVDF (Amersham Hybond™-P) (tamaño de poro 0.45µm) y de nitrocelulosa (Hybond™ ECL™) (tamaño de poro 0.45µm), se realizó la prueba de Western blot descrito por Laemlli (1970); para determinar la antigenicidad de las fracciones proteicas del antígeno obtenido, se utilizaron sueros policlonales de bovinos naturalmente infectados con paratuberculosis, confirmados por PCR anidada y cultivo.

En la electroforesis en gel de poliacrilamida SDS PAGE 12%, se colocaron 25 µl de muestra por cada pozo; previamente concentradas. Se corrieron dos geles a 80 Volts por 4.5 hrs.

Un gel se tiñó con azul brillante de Coomassie brillante o tinción de plata y con el otro gel se realizó la transferencia a membranas de Fluoruro de polivinilideno (PVDF, tamaño de poro 0,45 m) o membrana de nitrocelulosa a 40 mA por 1 hr.

Posteriormente se realizó el inmunoblot: Se utilizó como primer anticuerpo un suero de bovino confirmado como positivo a paratuberculosis en una dilución 1:100, después se bloqueo con leche al 3%, se incubó por 60 min a temperatura ambiente y en agitación. Posteriormente se hicieron 4 lavados de 5 min con PBS-Tween 20% pH 7.2 y el último lavado con amortiguador de fosfatos pH 7.2.

Como segundo anticuerpo se utilizó un conjugado anti IgG caprina marcado con peroxidasa de rábano (HRP) (SIGMA) a una dilución de 1:1000, incubándose por 30 min a temperatura ambiente.

Se realizaron nuevamente cuatro lavados y se reveló con diaminobenzina (DAB) (AMPRESO); como lo describe De la Fuente (2007).

6.7. Purificación proteica

6.7.1. Detergente Zwittergent 3-16.

Después de la transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa, esta se tiñó con rojo de Ponceau 0.2% para la visualización de las bandas, se identificó la banda de interés y se cortó con un bisturí. El triturado se colocó en tubos eppendorf.

Siguiendo el procedimiento descrito por Reyes, M. (2001); Lui (1996). Se realizó la purificación proteica; incubando a temperatura ambiente los triturados en 200 µl de una solución Tris-HCl 0.2 M pH 8.5 detergente Zwittergent 3-16 0.3 M (San Cruz Biotechnology). Al terminar la incubación, se recuperó el sobrenadante y se colocó en otro tubo eppendorf. Al tubo con el triturado se le adicionó 200 µl de solución Tris-HCl 0.2 M pH 8.5 y se centrifugó a 900 xg/2 min. Se retiró el sobrenadante del triturado y se adicionó al anterior. Se cuantificó la concentración

proteica del purificado mediante el método descrito por Bradford, MM. (1976), las muestras se concentraron por metanol-cloroformo (8:1) Wessel, (1984).

6.7.2. Marcaje con Isotiocionato de fluoresceína (FITC)

Se tomaron 300 µg, 500 µg y 1000 µg de cada proteína, se disolvieron en 0.5 ml de NaOH 0.1 M pH 8.5 respectivamente, se incubaron a 37° C por 60 min. Posteriormente se adicionó isotiocionato de fluoresceína FITC (SIGMA): 30 mg diluidos en 0.3 ml dimetilsulfóxido (DMSO), se incubó a 37°C por 60 min. Cada proteína conjugada se aplicó en una columna de 1x10 cm de DEAE (dietilaminoetil) Sephadex A 25 pre-equilibrada con amortiguador de fosfatos 0.01 M, pH 7.4. La primera fracción es verde fuerte y después se cambió el amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.4 Se eluyeron 10-15 ml de amortiguador de fosfatos seguidos luego de 20-40 ml donde se obtuvo el material verde fluorescente. Este último material, es el antígeno utilizado en la polarización de la fluorescencia. Samartino (1999).

6.8. Fluorescencia polarizada (FPA)

Se evaluaron diferentes diluciones de 3 sueros de bovinos confirmados positivos a paratuberculosis por ELISA y PCR y 3 sueros confirmados como negativos por ELISA y PCR (Tabla 1): 1:50, 1:100 y 1:200 en amortiguador Tris pH 7.2, 0.01 M Se llevó a cabo una primera lectura de los sueros diluidos, en el analizador de FPA. Se colocaron 10 µl del antígeno marcado con la fluoresceína se incubó por 5 min a temperatura ambiente y se realizó la segunda lectura. Surujballi (2002); Jolley (2007). Los resultados fueron expresados en unidades de mili-polarización (UmP), la cual resulta de la diferencia entre ambas lecturas. Se hicieron 10 repeticiones de cada dilución.

Tabla 1. Sueros controles positivos y negativos, utilizados para conocer la dilución del suero problema a la que se trabajaría la estandarización de la prueba FPA.

SUERO	ORIGEN	SEXO /EDAD	CARACTERISTICAS
1	Bovino	Hembra/21 meses	Positivo de campo (ELISA y PCR)
2	Bovino	Hembra/30 meses	Positivo de campo (ELISA y PCR)
3	Bovino		Positivo comercial
4	Bovino	Hembra/24 meses	Negativo de campo (ELISA y PCR)
5	Bovino	Hembra/36 meses	Negativo de campo (ELISA y PCR)
6	Bovino		Negativo comercial

6.9 Determinación del punto de corte

Se trabajaron con 50 sueros de bovinos positivos a paratuberculosis por PCR y ELISA y con 50 sueros negativos. El punto de corte se estableció por intervalos de confianza al 95% y dos desviaciones estándar, utilizando el programa estadístico STATA 7.0.

6.10. Determinación de la sensibilidad y especificidad de la prueba

Se calculó la sensibilidad y especificidad de la prueba utilizando 603 sueros de bovinos que previamente fueron evaluados por ELISA y PCR anidada. Para la FPA se utilizó la dilución del suero en la que se obtuvieron mejores resultados de 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 FPA, ELISA y PCR.

El análisis estadístico se realizó con el programa de Software Intercooled Stata 7.0 y Epidat 3.1.

7.0 RESULTADOS

7.1. Cepas bacterianas

De las cuatro cepas que se sembraron, la cepa K-10 (ATCC BAA-968/K-10) 455 y 91-204 no tuvieron un buen desarrollo bacteriano, observándose las colonias en el medio de cultivo entre la semana 16 y 20 post-resiembra. La cepa 3065, mostró un mejor crecimiento en el medio; teniéndose un buen desarrollo bacteriano que se observó a partir de la semana 12 post-resiembra.

7.2. PCR-Anidada

A las cuatro cepas de Map se les realizó extracción de ADN y se llevó a cabo la PCR anidada, en donde las cuatro muestras amplificaron el producto de 210 pb que corresponde a la secuencia de inserción IS900 que es específica de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Figura 1).

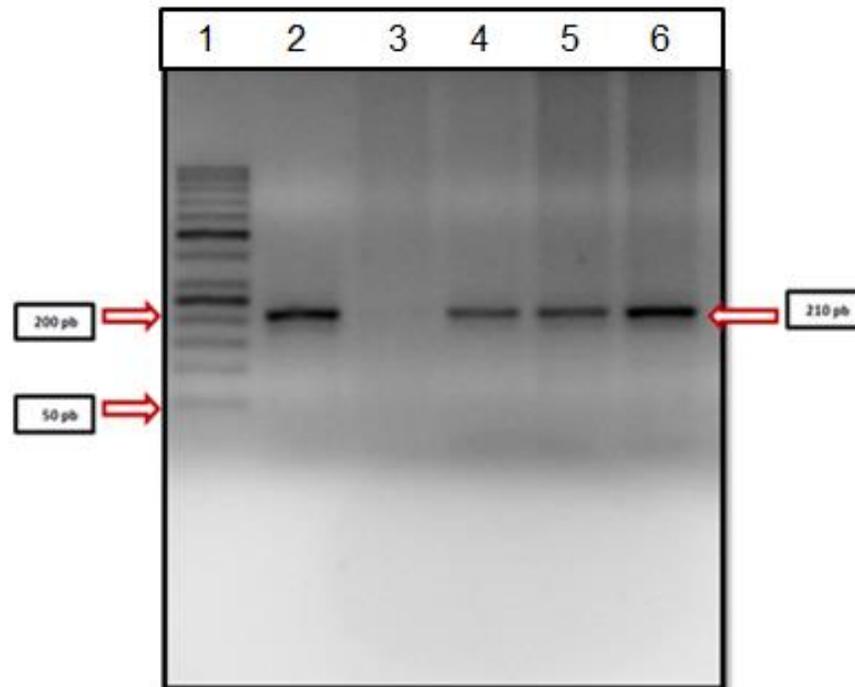


Figura 1. Gel de agarosa al 3% de los productos amplificados de 210 pb de cada cepa de Map que corresponde a la secuencia de inserción IS900. Carril 1: Marcador de peso molecular, carril 2 cepa K-10, carril 3: agua bidestilada, carril 4: cepa 91-204, carril 5: cepa 3065, carril 6: cepa 455.

La cepa Map 3065 mostró un mejor crecimiento en el medio de cultivo en un periodo de tiempo menor en comparación con las otras tres cepas resembradas, por lo que se eligió la cepa de Map 3065 para llevar a cabo la estandarización del Western Blot.

7.3. Western Blot

Después del corrimiento de la electroforesis en gel de poliacrilamida SDS Page 12%, un gel se tiñó con azul brillante de Coomassie, se observó un perfil electroforético de la cepa Map 3065, de proteínas que van de los 25 kDa hasta 170 kDa; la concentración de antígeno en la que se tiene una mejor visualización del perfil electroforético fue la de 15 μg por pozo. (Figura 2).

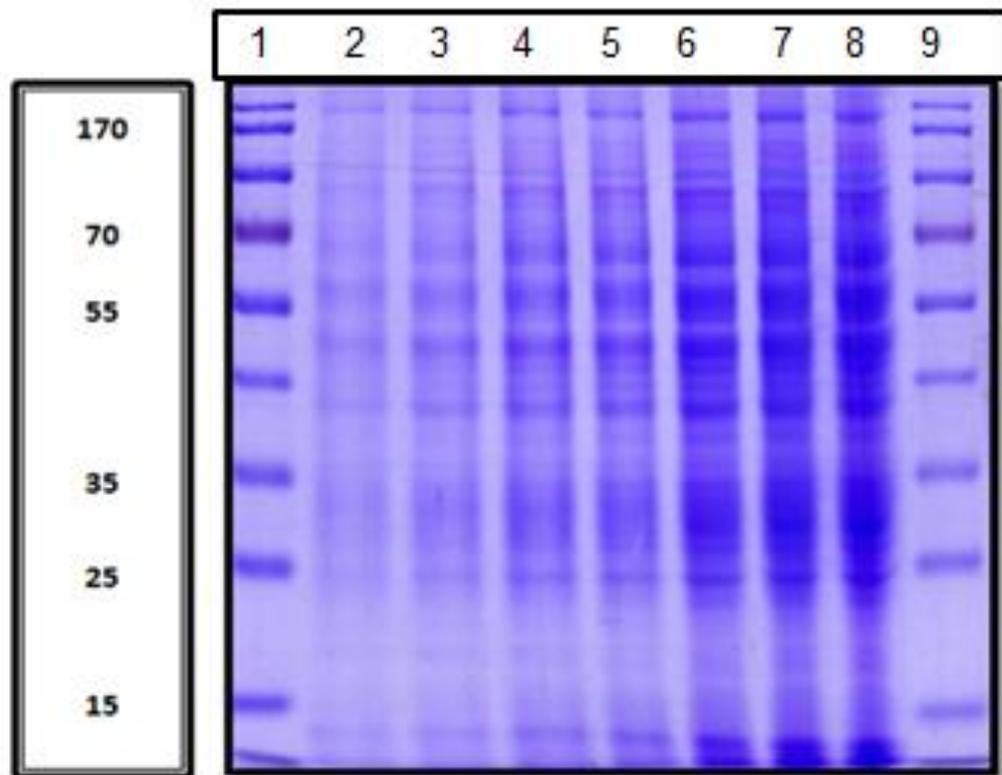


Figura 2. Gel SDS-PAGE al 12% teñido con azul brillante de Coomassie, del antígeno de la cepa Map 3065 a diferentes concentraciones; carril 1 y 9: Marcador de peso molecular, carril 2 al 8: 5, 10, 15, 20, 30, 40 y 50 μg respectivamente.

Una vez establecida la concentración de antígeno que se ocuparía por pozo, se realizó otro gel y se hizo la transferencia de membrana para el inmunoblot; donde se observaron tres bandas antigénicas principalmente; que oscilan entre los 47 kDa, 35 kDa y 25 kDa (Figura 3). El inmunoblot se realizó con tres sueros confirmados como positivos a paratuberculosis por ELISA y PCR anidada.

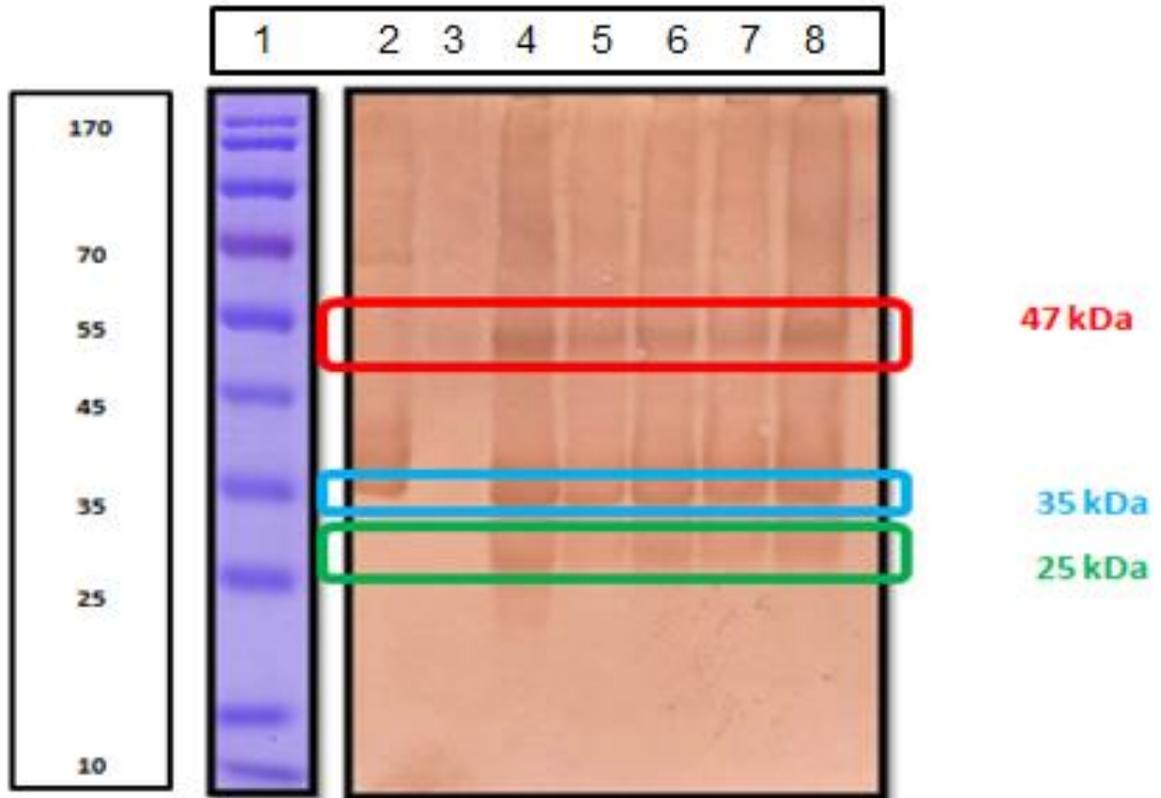


Figura 3. Inmunoblot en membrana PVDF del antígeno de la cepa Map 3065. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2 al 8: antígeno de Map 3065 donde se observan 3 bandas antigénicas de: 25 kDa, 35 kDa y 47 kDa aproximadamente.

7.4. Purificación proteica

Una vez identificadas las proteínas antigénicas, se procedió a purificarlas, empleando el detergente Zwittergent 3-16; se realizó el corrimiento electroforético y se tiñó con plata, en la Figura 4, se observan las tres fracciones proteicas separadas. El inmunoblot de las proteínas purificadas; corroboró que las fracciones aun separadas conservan su capacidad antigénica (Figura 4 Y Figura 5).

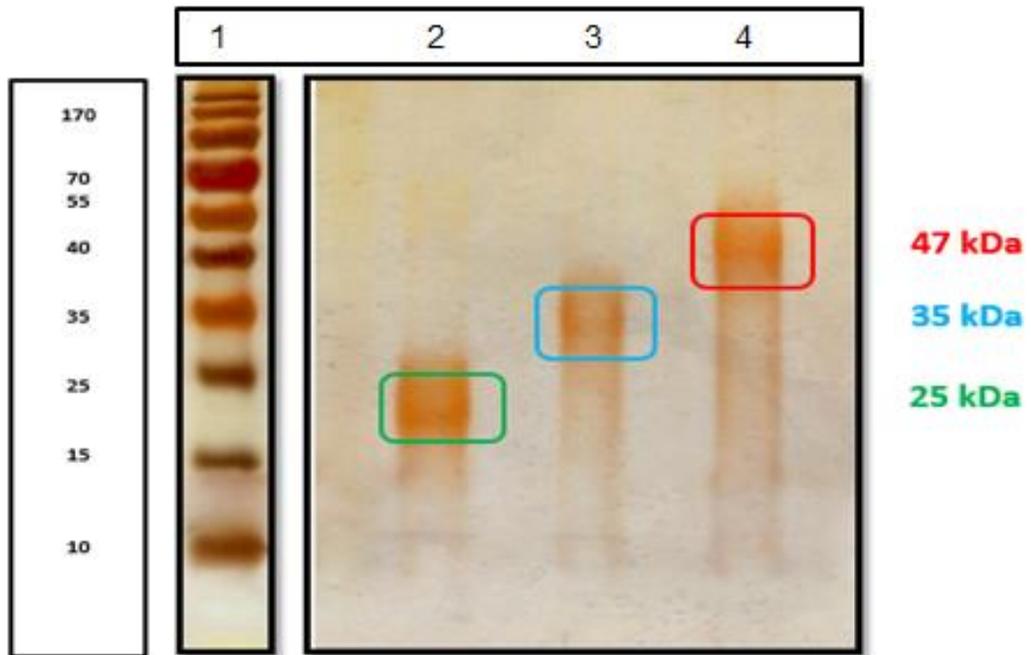


Figura 4. Tinción de plata del gel SDS-PAGE 12% de fracciones proteicas purificadas obtenidas a partir del antígeno protoplasmático de la cepa Map 3065. Carril 1: Marcador de peso molecular, carril 2 a 4: Fracciones proteicas purificadas.

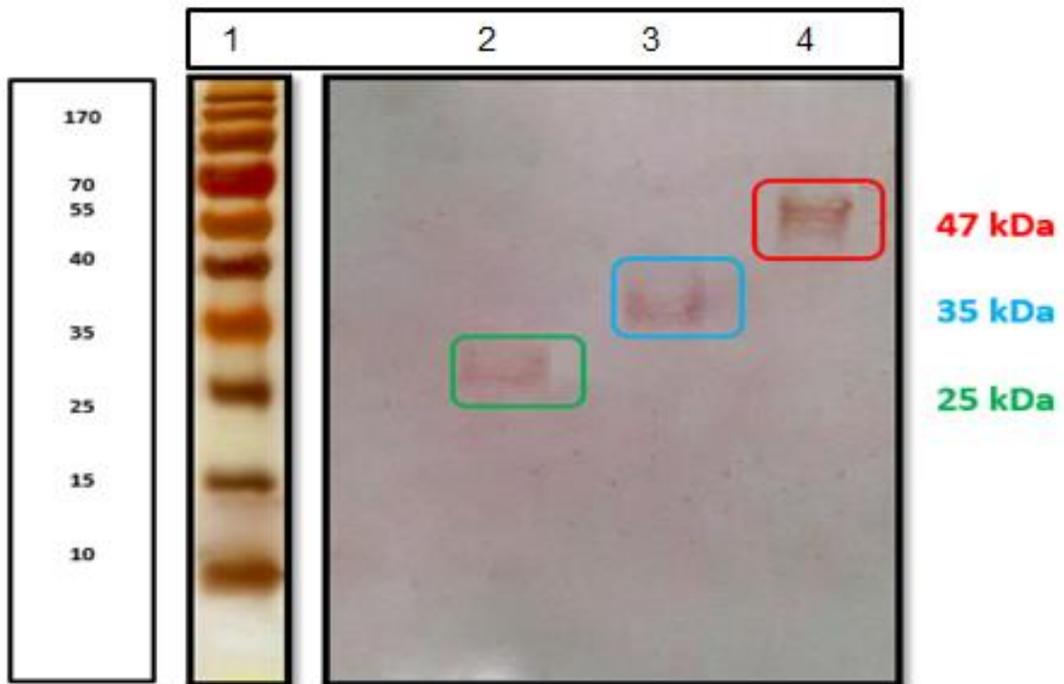


Figura 5. Inmunoblot en membrana de nitrocelulosa de fracciones proteicas purificadas a partir del antígeno protoplasmático de la cepa de Map 3065. Carril 1: Marcador de peso molecular, carril 2 a 4: Fracciones proteicas purificadas.

7.4.1. Marcaje con Isotiocianato de fluoresceína (FITC)

Al llevar a cabo el marcaje de las tres proteínas de 25 kDa, 35 kDa y 47 kDa, a concentraciones de 300, 500 y 1000 μg y al realizar las lecturas en el lector de FPA, los resultados obtenidos a la concentración de 300 μg , 500 μg no se registraron lecturas y a en la concentración de 1000 μg de proteína purificada y marcad se registró una lectura de fluorescencia entre los 256 000 y 295000; que está dentro de rango recomendando para llevar a cabo la prueba de FPA (Figura 6).

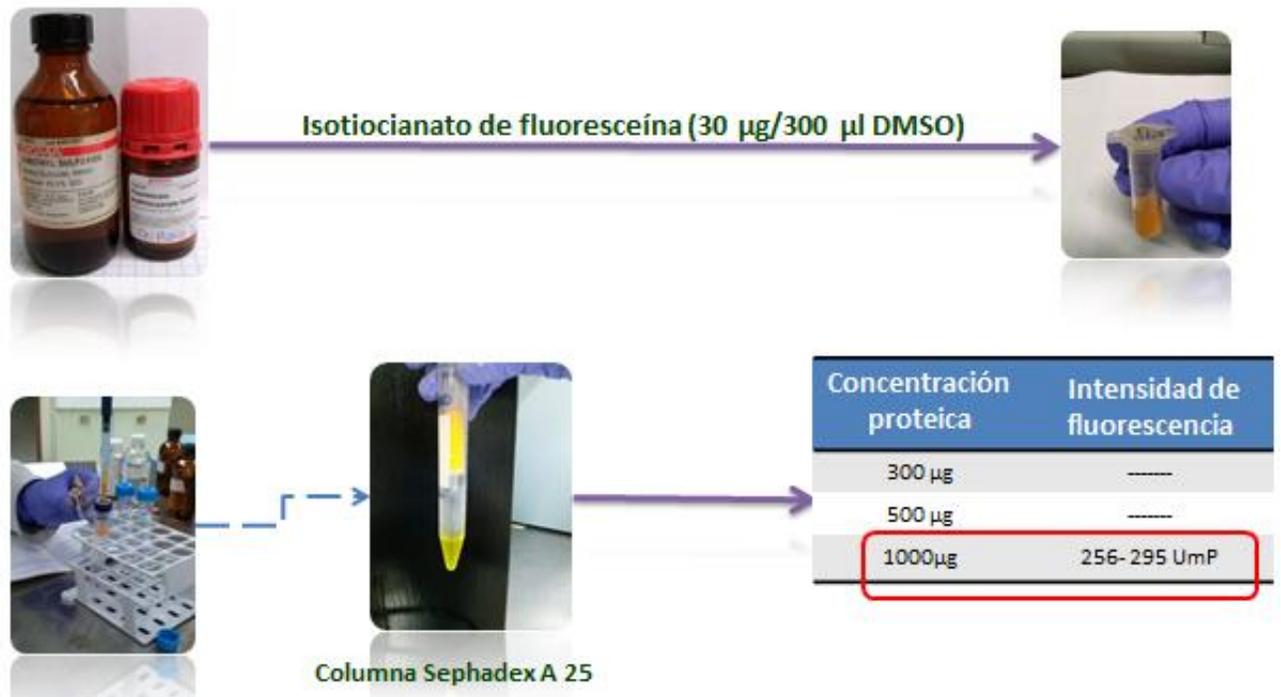


Figura 6. Marcaje con FITC, de las tres proteínas antigénicas purificadas.

7.5. Fluorescencia polarizada (FPA)

Al llevar a cabo los ensayos con las proteínas a la concentración de 1000 µg se observó que con la proteína de 25 kDa en todas las diluciones tanto de los sueros positivos y negativos no existen diferencias en los valores de UmP. Se obtuvo que en los siguientes resultados: en la dilución 1:50 y 1:100 el valor del control negativo es mayor con respecto al valor del control positivo. En el caso de la dilución 1:200 se observa una diferencia entre los valores de ambos controles de 4 UmP (Tabla 2).

Tabla 2. Promedio de valores obtenidos en la prueba de FPA, utilizando tres sueros controles confirmados como negativos y tres sueros controles confirmados como positivos. Se usó como antígeno marcado con FITC, la proteína de 25 kDa (1000 µg). Los valores son expresados en UmP.

Proteína de 25 kDa		
Dilución	Suero negativo	Suero positivo
1:50	269.8758*	265.1633*
1:100	288.9361*	282.9576*
1:200	294.2333*	298.8345*

* UmP

Con la proteína de 35 kDa; en la dilución 1:50 el valor del control positivo es de 251.8991 UmP y del control negativo es de 243.6229 UmP. En la dilución 1:100 se observa una diferencia entre los controles de ±30 UmP y en la dilución 1:200 se tienen valores del control positivo y control negativo de 310.8667 UmP y 304.3256 UmP, respectivamente (Tabla 3).

Tabla 3. Promedio de valores obtenidos en la prueba de FPA, utilizando tres sueros controles confirmados como negativos y tres sueros controles confirmados como positivos. Se usó como antígeno marcado con FITC, la proteína de 25 kDa (1000 µg). Los valores son expresados en UmP.

Proteína de 35 kDa		
Dilución	Suero positivo	Suero negativo
1:50	251.8991*	243.6229*
1:100	302.9223*	268.1333*
1:200	310.8667*	304.3256*

* UmP

En el caso de la proteína de 47 kDa, en la dilución 1:50 y 1:200 se observan diferencias entre los sueros controles de ± 2 UmP, en la dilución 1:100 existe una diferencia de 4 UmP (Tabla 4).

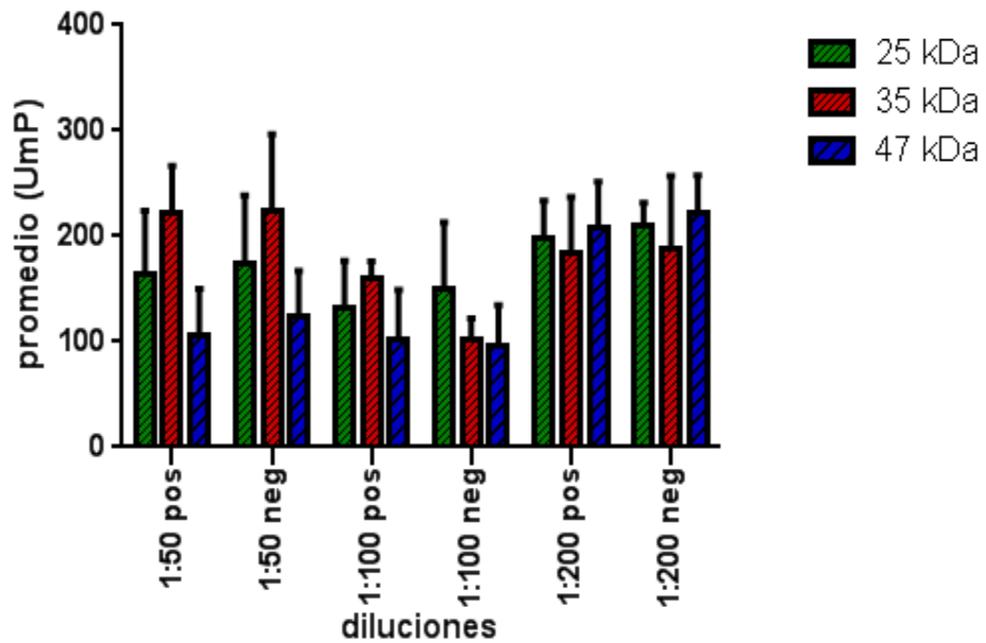
Tabla 4. Promedio de valores obtenidos en la prueba de FPA utilizando tres sueros controles confirmados como negativos y tres sueros controles confirmados como positivos. Se usó como antígeno marcado con FITC, la proteína de 47 kDa (1000 µg). Los valores son expresados en UmP.

Proteína de 47 kDa		
Dilución	Suero positivo	Suero negativo
1:50	275.4666*	273.8963*
1:100	285.1333*	281.1563*
1:200	288.4000*	286.3697*

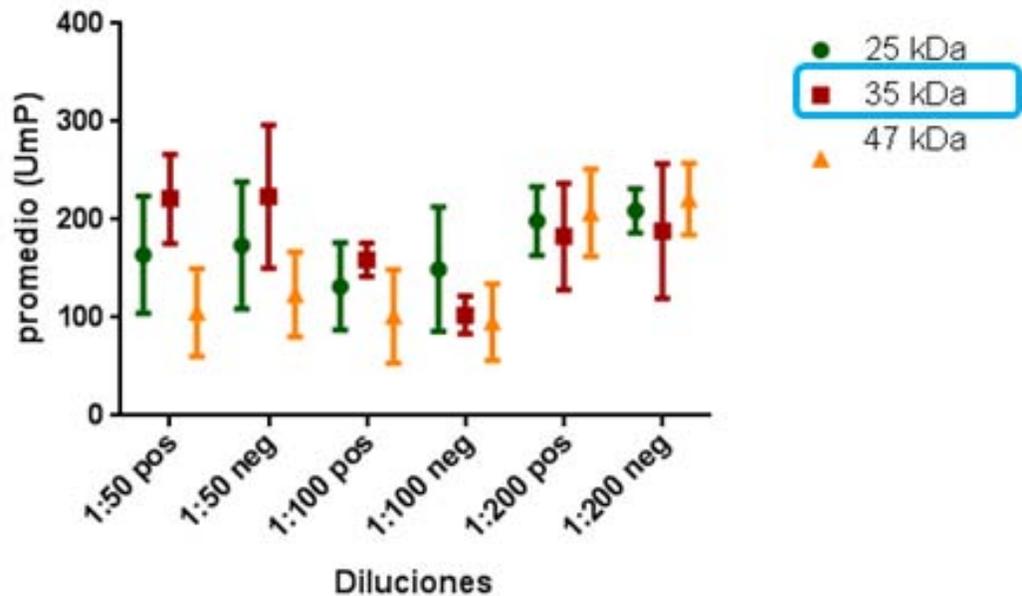
* UmP

Al realizar el análisis estadístico utilizando dos desviaciones estándar y un 95% de confianza de los resultados de las diferentes diluciones de cada una de las

proteínas, se observa que en la dilución 1:100 de la proteína de 35 kDa; los resultados en UmP son más constantes en comparación con las otras diluciones y las otras dos proteínas, por lo que la dilución de suero a utilizar en la estandarización fue la de 1:100 (Gráfica 1 y Gráfica 2).



Gráfica 1. Comparación de los promedios y desviaciones estándar de las diluciones de las tres proteínas purificadas. La proteína de 35 kDa presenta las desviaciones estándar menores de: 16.98 y 19.40 respectivamente.



Gráfica 2. Comparación de las desviaciones estándar de las diluciones de las tres proteínas purificadas. La proteína de 35 kDa presenta las desviaciones estándar menores de: 16.988930 y 19.404790 respectivamente.

7.6. Determinación del punto de corte

Para establecer el punto de corte se utilizaron 50 sueros confirmados como positivos por PCR y ELISA y 50 sueros confirmados como negativos. Se determinó con un intervalo de confianza de 95% (0.95) y dos desviaciones estándar, utilizando la siguiente fórmula, con el promedio de los resultados de los controles (Figura 7).

$$\mu = x \pm Z (0.5 - 0.05/2) (\delta/\sqrt{n})$$

Donde:

n= población (100)

x= promedio de la población (133.7933)

δ = desviación estándar (39.7368)

$\mu = 133.7933 \pm Z (0.5 - 0.025) (39.7368/\sqrt{100})$

$\mu = 133.7933 \pm 1.96 (3.97368)$

$\mu = 133.7933 \pm 7.7884$

$$\mu = 133.7933 - 7.7884 = 126.0049$$

$$\mu = 133.7933 + 1.8874 = 141.5817$$

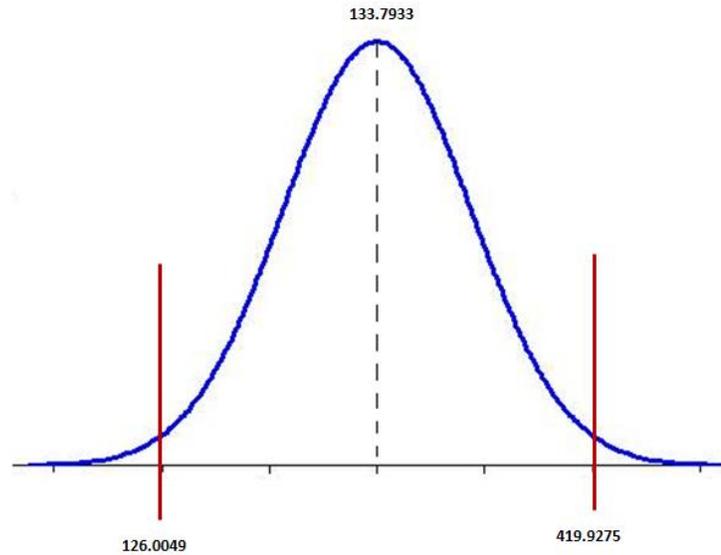
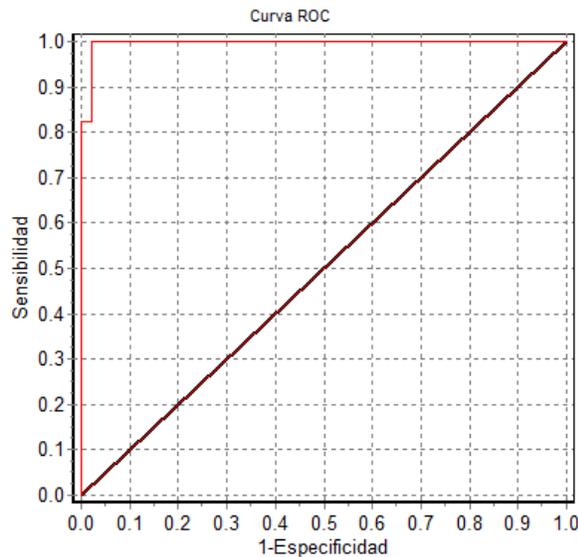


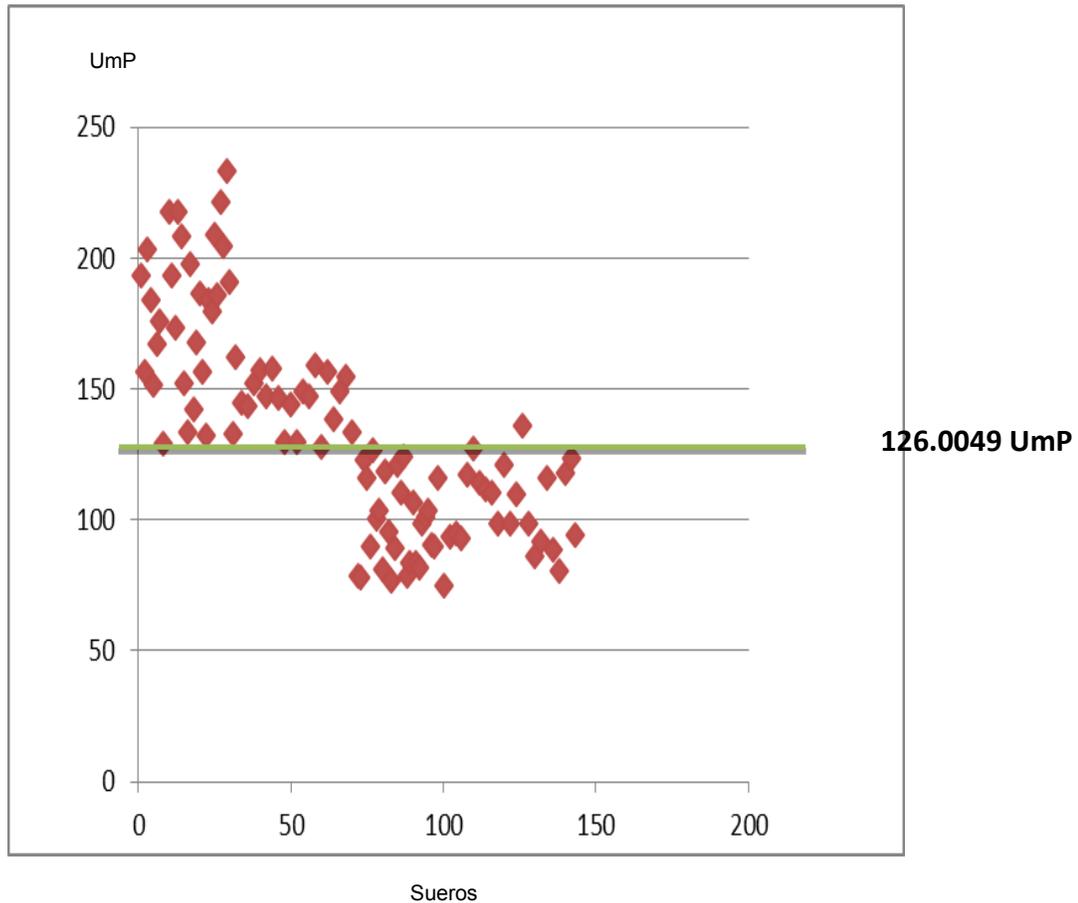
Figura 7. Valor mínimo y máximo de UmP obtenidos, utilizando dos desviaciones estándar y un intervalo de confianza de 95%.

Una vez establecido el punto de corte con los 100 sueros controles; se analizaron los resultados de estos por medio de la curva de ROC; obteniéndose una sensibilidad y especificidad cercana al 100%; (Gráfica 3).



Gráfica 3. Curva de ROC, donde se observa la sensibilidad y especificidad obtenida con los 100 sueros controles (intervalo de confianza del 95%).

Se estableció el punto de corte donde los sueros mayores o iguales a 126.0049 UmP, son considerados como positivos a la prueba, y los sueros con un valor menor a este punto son negativos. Se utilizó dos desviaciones estándar y un intervalo de confianza del 95% (Gráfica 4).



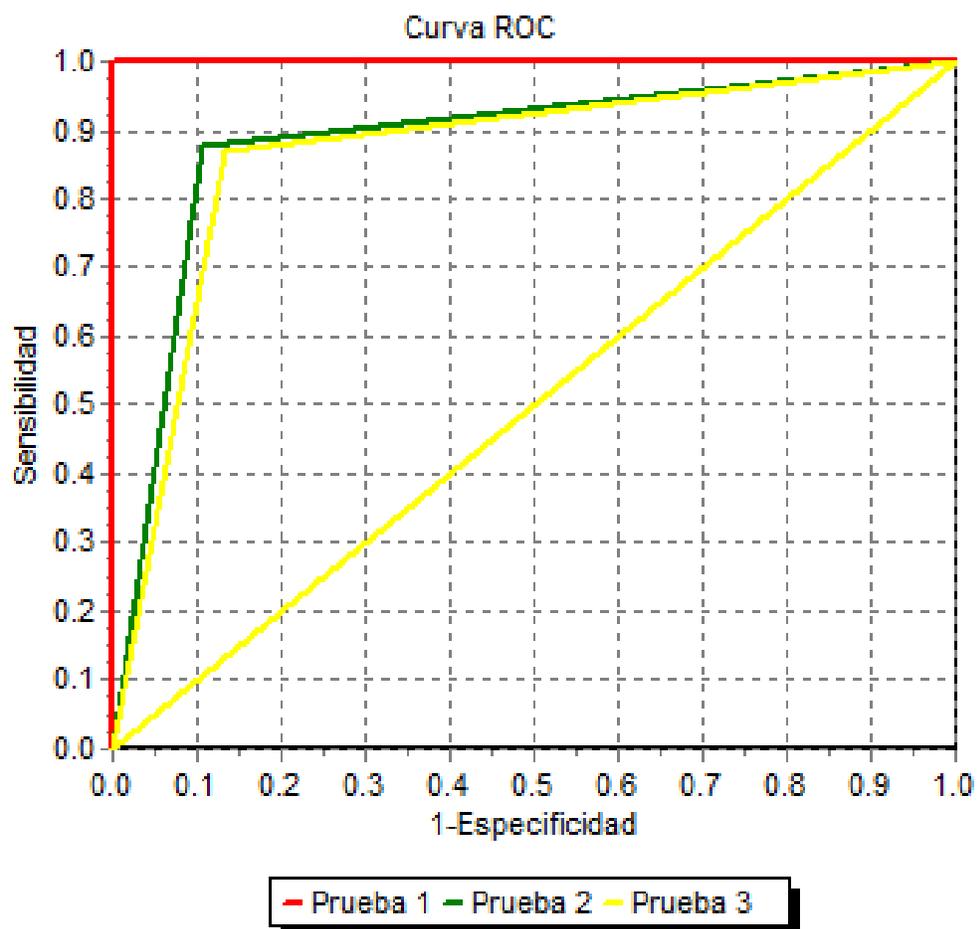
Gráfica 4. Gráfica que muestra el punto de corte de 126.0049 UmP, utilizando dos desviaciones estándar y un intervalo de confianza del 95%, que divide a los valores positivos de los negativos de los 50 sueros controles confirmados como positivos y 50 sueros controles confirmados como negativos.

7.7. Determinación de la sensibilidad y especificidad de la prueba

Para determinar la sensibilidad y especificidad de la FPA, utilizando el punto de corte establecido de 126.0049 UmP, se trabajaron 603 muestras de campo.

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente con el programa Epidat 3.1., con un intervalo de confianza del 95% y dos desviaciones estándar (Gráfica 5). Los resultados de la sensibilidad y especificidad de la prueba se muestran en la tabla 5.

También se comparó la especificidad y sensibilidad de la FPA con la especificidad obtenida por ELISA y PCR anidada (Tabla 5).



Gráfica 5. Curva de ROC, correspondiente a la comparación de FPA, ELISA y PCR. Siendo: Prueba 1: PCR, Prueba 2: FPA, Prueba 3: ELISA. Se estableció la sensibilidad y especificidad con los 603 sueros.

Tabla 5. Resultados curva de ROC de los 603 sueros analizados; al comparar FPA, ELISA y PCR.

PRUEBA	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD	P
FPA	88.50%	91.42%	0.000
ELISA	83.86%	89.87%	0.000
PCR	100%	100%	0.000

7.7.1. Índice de concordancia Kappa

Se comparan con los resultados obtenidos por FPA con ELISA y PCR-Anidada. El análisis estadístico se realizó con el programa de Software Intercooled Stata 7.0 y Epidat 3.1 (Tabla 5 y Tabla 6).

K= Índice de concordancia

VP+ = Valor predictivo positivo

VP- = Valor predictivo negativo

Tabla 5. Resultados del 603 sueros; sueros positivos y sueros negativos con cada una de las pruebas diagnósticas comparadas.

PRUEBA	SUEROS POSITIVOS	SUEROS NEGATIVOS	TOTAL
PCR	162	441	603
FPA	142	461	603
ELISA	141	462	603

Tabla 6. Resultados de índice de concordancia, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y valor estadístico; al comparar FPA, ELISA y PCR.

	K	VP +	VP -	P
FPA vs ELISA	0.6742	75.6%	90.8%	0.000
FPA vs PCR	0.7314	87.7%	89.3%	0.000
ELISA vs PCR	0.5771	87.6%	86.4%	0.000

La concordancia de las pruebas es aceptable, ya que se maneja que resultados ≥ 0.40 son aceptables.

8.0 DISCUSIÓN

En el presente estudio se estandarizó la técnica de FPA utilizando como antígeno una proteína de 35 kDa, obtenida a partir de un extracto crudo de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, con el que se obtuvo una sensibilidad 88.5% y especificidad de 91.42%, la cual concuerda con los trabajos de Surujballi *et al* (2002) quien utilizó la prueba de FPA para el diagnóstico de tuberculosis (proteína MPB70, 16-23 kDa y por Nielsen *et al* (2001) quien llevó a cabo el diagnóstico de brucelosis empleando una proteína del LPS (Lipopolisacárido) de 22 kDa, obteniendo resultados de una alta sensibilidad 92.9% y 99.30%, y especificidad 98.3% y 99.98% respectivamente.

La concordancia entre las pruebas PCR, ELISA y FPA fue considerada como aceptable. Pero su uso de manera complementaria contribuyó a incrementar tanto la sensibilidad como la especificidad de la prueba (Martínez *et al*, 2012).

Para determinar o clasificar las muestras positivas de las negativas de FPA, se recomienda agregar al valor promedio que se emplea como punto de corte dos o tres desviaciones estándar, para incluir en teoría al 95 ó 99 % de la población seronegativa, teniendo como inconveniente que al utilizar dos desviaciones estándar se pueden dar resultados falso positivos, pero al trabajar con tres desviaciones estándar existe la probabilidad de dar resultados falsos negativos, es decir se subestima o sobre estima la población susceptible (Fajardo, 1994).

Al trabajar con los 50 sueros positivos a PCR y ELISA, para estandarizar el ensayo de FPA se obtuvo un punto de corte de 126.0049 UmP. El cual se obtuvo mediante dos desviaciones estándar y un intervalo de confianza del 95 %, esto permitió detectar una mayor cantidad de animales infectados y que fueron también positivos al ELISA y PCR anidado, con esto la sensibilidad y la especificidad de la prueba fue mayor.

Surujballi *et al* (2002); establece un punto de corte de 170 UmP, en comparación de este trabajo donde se estableció un punto de corte de 126.0049 UmP; esto podría explicar el porqué de sus resultados de sensibilidad, especificidad y concordancia fueron más altos a los obtenidos en este trabajo.

Nielsen *et al* (2001) menciona que la prueba de FPA resulta ser más específica que sensible, Jolley *et al* (2006), al evaluar la prueba de FPA con la proteína MPB70 de 22 kDa de una cepa de *M. bovis* para el diagnóstico de tuberculosis bovina obtiene una especificidad del 99.9%, esto se pudo corroborar con los resultados obtenidos en el presente trabajo ya que obtuvo una sensibilidad de 88.50% y una especificidad de 91.42%.

En las pruebas de tamiz y diagnóstico, la probabilidad de que un individuo con una prueba positiva, sea realmente positivo (es decir que este cursando con la enfermedad), se le denomina valor predictivo positivo, mientras que el valor predictivo negativo, se refiere a la proporción de individuos con un resultado negativo a la prueba que no tienen la enfermedad. Es importante remarcar que el valor predictivo, está asociado a la sensibilidad y especificidad de la prueba, así como también que es altamente dependiente de la prevalencia de la enfermedad en la población donde se aplica la prueba (Kokuina, 2006).

En la primera parte del trabajo al estandarizar la FPA se obtuvo un valor predictivo positivo y negativo del 100 %, por haber utilizado sueros provenientes de animales positivos tanto al ELISA y PCR, así como sueros negativos a ambas pruebas, pero al evaluar el ensayo con muestras de campo el valor predictivo positivo y negativo bajaron a 75.9% y 96.3% respectivamente respecto PCR y ELISA , esto se debe a que las muestras trabajadas procedían de diferentes Estados del País, y de distintos hatos donde se han reportado casos de paratuberculosis, y presentan una prevalencia que va del 5 al 25% Limón *et al* (2011) y Córdoba *et al* (2011).

En la actualidad las líneas de investigación en micobacteriosis se están enfocando a evaluar antígenos de bajo peso molecular ya se considera que son específicos y potencialmente útiles para mejorar las técnicas de diagnóstico, ya que al ser empleados en técnicas como el ELISA o la FPA, estas presentan una buena sensibilidad y especificidad (Beck ST, 2005) Los principales antígenos de las micobacterias pueden dividirse en dos grandes grupos: los solubles o citoplasmáticos y los insolubles ligados a la pared celular, por lo que se considera que tanto las proteínas de secreción, así como las proteínas de los extractos celulares de la micobacterias, son los principales antígenos que se generan en las etapas tempranas de la infección, por lo que estos son los candidatos más viables para ser utilizados en las pruebas diagnósticas para detectar animales infectados con micobacteriosis (Franco J, 2005; Beck ST, 2005).

En el presente estudio, se identificaron tres proteínas de 25 kDa, 35 kDa y 47 kDa a partir de los extractos celulares de Map. De las cuales la proteína de 35 kDa, fue con la que se obtuvieron resultados constantes en la estandarización de la técnica de FPA. Hashemi *et al* (2014); reporta cinco proteínas inmunodominantes de: 25, 35, 50, 75 y 150 kDa obtenidas a partir de un antígeno protoplasmático de Map; hace mención que las proteínas de 25 y 35 kDa; son altamente antigénicas, esta característica se pudo comprobar en el presente estudio ya que cuando se realizó el inmunoblot de las tres proteínas ya purificadas, estas conservaron su capacidad antigénica.

Bannantine (2003), describe una proteína de superficie celular de 35 kDa de la cepa Map 1152; la cual se considera que tiene posible papel en el proceso de interacción entre Map y las células intestinales del hospedador, dicha proteína ha sido utilizada como antígeno para llevar a cabo el diagnóstico de paratuberculosis por medio de ELISA, obteniendo resultados aceptables de sensibilidad y especificidad sensibilidad del 100% y una especificidad del 92% (Castrellón, 2014).

Se considera que las proteínas menores a 50 kDa están involucradas en la inducción de la respuesta inmune humoral y celular ante la infección por microorganismos intracelulares, por lo que este tipo de proteínas son los candidatos a utilizarse, como antígenos en la prueba FPA, ya que permiten que el ensayo sea más específico, por lo que se pueden considerar como una alternativa para llevar a cabo el diagnóstico de paratuberculosis.

Los métodos de diagnóstico en paratuberculosis se deben de basar en la capacidad de la prueba para detectar animales infectados, la especificidad y la confiabilidad de las pruebas de serodiagnóstico se determinan por el tipo de antígenos de micobacterias empleados, por lo que la identificación de los componentes antigénicos estructurales bien caracterizados y específicos de cada especie de micobacterias proporcionaría los medios para mejorar la especificidad y sensibilidad de los ensayos de inmunodiagnóstico (Franco J, 2005). Por lo que el uso de proteínas de bajo peso molecular obtenidas a partir de extractos celulares de cepas de Map, se convierte en una alternativa para desarrollar pruebas más específicas.

Utilizando la FPA se obtuvieron 142 animales positivos de las 603 muestras, lo que representa un 23.54%, estos resultados corresponden a los reportes que mencionan que la prevalencia de la paratuberculosis va de un 5 a un 25% y a estudios epidemiológicos transversales realizados en ganado bovino por Limón et al (2011) y Córdoba et al (2011), en los estados de Guanajuato, Aguascalientes y San Luis Potosí, respectivamente; indican que existe una seroprevalencia de paratuberculosis de 10.25%, 13.43% y 31.3% respectivamente.

La paratuberculosis es una enfermedad que ocasiona grandes pérdidas económicas en México y en todo el mundo, la mayoría de los casos clínicos se observan en animales de dos a seis años de edad; mientras que los animales más jóvenes generalmente no muestran signos clínicos y son muy pocas pruebas

diagnósticas capaces de detectar la infección en esta etapa. Por lo tanto es muy importante contar con pruebas diagnósticas que detecten la eliminación del bacilo en la etapa subclínica del animal, con la finalidad de evitar la propagación de la enfermedad y así implementar las medidas necesarias de control y erradicación. La técnica de FPA, es una técnica sencilla para determinar la interacción antígeno-anticuerpo, puede realizarse en el laboratorio y en otras circunstancias en el campo. Es una prueba homogénea que, al no requerir la separación de los compuestos analizados, es muy rápida de efectuar (Samartino, 1999).

La FPA posee varias ventajas sobre otras técnicas serológicas, incluyendo la relación costo-efectividad, velocidad, simplicidad y adaptación de su uso a campo. (Jolley, 2007; Hashemi, 2014).

En México no hay estudios al respecto de la eficacia de la FPA en el diagnóstico de la paratuberculosis bovina, por lo se considera necesario continuar con los estudios sobre el tema, para mejorar el diagnóstico de la paratuberculosis en los hatos nacionales.

9.0 CONCLUSIONES

- ♣ Se identificaron tres fracciones proteicas antigénicas de aproximadamente: 25 kDa, 35 kDa y 47 kDa obtenidas a partir del extracto crudo de Map.
- ♣ Se estandarizó la prueba de fluorescencia polarizada (FPA). Usando como antígeno la proteína de 35 kDa de 1000 µg; a una dilución de suero problema de 1:100.
- ♣ Se estableció un punto de corte de 126.0049 UmP, con un intervalo de confianza del 95% y dos desviaciones estándar.
- ♣ Con la FPA, fue posible desarrollar una prueba que logro detectar la presencia de anticuerpos en bovinos infectados; mostrando una sensibilidad y especificidad aceptable de 88.50% y 96.3%.
- ♣ La FPA posee varias ventajas sobre otras técnicas serológicas, incluyendo la relación costo-efectividad, velocidad, simplicidad y adaptación de su uso a campo.

10.0 REFERENCIAS

- 1 Abalos P. Actualidad en paratuberculosis. Departamento de medicina preventiva animal. 2006. Facultad de ciencias veterinarias y pecuarias, Universidad de Chile.
- 2 Abbas AK, Lichtman AH. Inmunología celular y molecular. Elseiver España S.A. Quinta edición. 2004: 298-316.
- 3 Alberts B, *et al.* Molecular Biology of the Cell, 5th ed., Garland Pub., 2007. [Biología molecular de la célula (4ª Ed.). Omega, 2004 (2002).
- 4 Arsenault RJ, Maattanen P, Daigle J, Potter A, Griebel P, and Napper S. From mouth to macrophage: mechanisms of innate immune subversion by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Veterinary Research* 2014, 45:54
- 5 Bannantine JP. Et al. Immunogenicity and Reactivity of *Novel Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* PPE MAP1152 and Conserved MAP1156 Proteins with Sera from Experimentally and Naturally Infected Animals. 2010. Bacterial Diseases of Livestock Research Unit, USDA ARS. EU.
- 6 Bannantine, J.P., Huntley, J.F., Miltner, E., Stabel, J.R., y Bermudez, L.E. (2003) The *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* 35 kDa protein plays a role in invasion of bovine epithelial cells. *Microbiology* 149: 2061-2069.
- 7 Bech-Nielsen S, Berg JJ, Ahrens P y Feld NC. Diagnostic Accuracy of *Mycobacterium phlei* Absorbed Serum Enzyme-Lynked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Bovine Paratuberculosis in Dairy Cows. *Journal of Clinical Microbiology*, 1992; 30:613-618.
- 8 Beck ST, Leite OM, Arruda RS, Ferreira AW. Humoral response to low molecular weight antigens of *Mycobacterium tuberculosis* by tuberculosis patients and contacts. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2005, 38:587-596.
- 9 Blood DC, Radostitis OM. Medicina Veterinaria. Enfermedades causadas por bacterias. Séptima edición. McGraw-Hill Interamericana. 1992: 777-785.

- 10 Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.
- 11 Castellanos RE. Caracterización molecular de aislados de *Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis*. Mapa epidemiológico en España. 2010. Tesis doctoral. Madrid, España.
- 12 Castrellón AV. Chávez-Gris G. Maldonado C. Verdugo RA. Manucharyan AK. Munguía ZM. Uso de la proteína P35 de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en el diagnóstico de paratuberculosis en borregos. *Memorias del XXXVIII Congreso Nacional de Buiatría 2014.* 586-594.
- 13 Cho and Collins MT. Comparison of the proteosomes and antigenicities of secreted and cellular proteins produced by *Mycobacterium paratuberculosis*. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2006. Vol. 13, no. 10, pp. 1155–1161.
- 14 Cirone K, Morsella M. *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*: presencia en los alimentos y su relación con la enfermedad de Crohn. *Revista Argentina de Microbiología.* 2007: 39:57-68.
- 15 Cocito C, Gilot P, Coene M, De Kesel M, Poupart P, Vannuffel P. *paratuberculosis*. *Clinical Microbiology Reviews*, American Society for Microbiology. 1994: 328-345.
- 16 Conigliaro S. Boletín. Centro Diagnóstico Veterinario. España. 2003. 205-210.
- 17 Córdoba LD, Santillán FMA. Fávila HLC. Urrutia MJ. Gámez VH. Guzmán RCC. Rivera NP. Cabello FE. Paratuberculosis bovina en San Luis Potosí. Reuniones nacionales de investigación e innovación pecuaria, agrícola, forestal y acuícola-pesquera. México. 2011.
- 18 Craven JA, Morgan IR. Epidemiology and Pathogenesis of Paratuberculosis in Cattle. 2000. A Literature Survey Prepared for Animal Health Australia.
- 19 De la Fuente A, Rodríguez J, Fonseca E. análisis de proteínas mediante electroforesis e inmunotransferencia (Western Blot). *CHU Juan Canalejo.* España. 2007; 22 (5): 252-8.

- 20 Diacovich, L. Gorvel J-P. Bacterial manipulation of innate immunity to promote infection. *Nature Reviews, Microbiology*. 2010; 8: 117-128.
- 21 Disney PR, Vallaroel NR. Paratuberculosis: una amenaza emergente para la ganadería tropical. *Manual de Ganadería Doble Propósito*. Maracaibo-Venezuela. Departamento Médico Quirúrgico. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Zulia. 2005: 370-376.
- 22 Eltholth VR. Contamination of food products with *Mycobacterium avium paratuberculosis*: a systematic review. London U.K. Department of Veterinary Clinical Sciences. Royal Veterinary College. 2009.
- 23 Fajardo-Gutiérrez A, Yamamoto-Kimura L, Yañez-Velasco L, Garduño EJ, Martínez GMC. Utilidad de las curvas de sensibilidad y especificidad conjunta en la aplicación de una prueba de diagnóstico. *Salud Pública Mex* 1994;36(3):311-317
- 24 Franco J, Camarena JJ, Noriega JM, Blanquer R, Ruiz MJ, Marin J. Serological response (Western blot) to fractions of *Mycobacterium tuberculosis* sonicate antigen in tuberculosis patients and contacts. *Int J Tuberc lung Dis*,2005,10:958-962
- 25 Gallagher S, Chakavarti D. Immunoblot Analysis. *J Vis Exp*. 2008; (16): 759. Published online 2008 June 20. doi: 10.3791/759
- 26 Gerrit D. Dirksen K. Gründer HD. *Medicina Interna y Cirugía del Bovino*. Buenos Aires. República Argentina: Iner Médica Editorial. 2005: 533-538. Volumen I.
- 27 Harris B, Barletta RG. *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. *Clin Microbiology Rev* 2001; 14: 489–512.
- 28 Hashemi M, Madani RN. Evaluation of Immunodominant Proteins of *Mycobacterium avium paratuberculosis* cell Wall by Western Blot analysis. 2014. 33; 2.
- 29 Hermon-Taylor J, Bull TJ. *Mycobacterium* subespecies *paratuberculosis* in the causation of Crohn's diseases. *World Journal of Gastroenterology*. 2000. Vol.6. No. 5. 630-632.

- 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: FES-UNAM. 2006.
- 31 Hirschfield M, McNeil, and Brennan PJ. Peptidoglycan-associated polypeptides of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology*, vol. 172, no. 2, pp. 1005–1013, 1990.
- 32 Hughes JP, Bannantine S, Denham, et al., Immunogenicity of proteome-determined *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*-specific proteins in sheep with paratuberculosis. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2008. Vol. 15, no. 12, pp. 1824–1833.
- 33 Jacobson RH. Validación de pruebas serológicas para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. *Rev. sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 1998. 17(2), 507-526.
- 34 Jaimes MNG. Aplicación de la PCR-Anidada para el diagnóstico de la paratuberculosis a partir de heces de ovinos (tesis de licenciatura). México: FESC-UNAM. 2006.
- 35 Jaimes NG, Santillán FMA, Hernández COA, Córdova LD, Guzmán RCC, Arellano RB, Díaz AE, Tenorio GVR, Cuéllar OJA. Detección de *Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis*, por medio de PCR-anidada a partir de muestras de heces de ovinos. *Artículo. Veterinaria México* 2008,39 (4), 377-386.
- 36 Jolley ME, Nasir MS, Surujballi OP, Romanowska A, Renteria TB, De la Mora A, Lim A, Bolin SR, Michel AL, Kostovic M, Corrigan EC. Fluorescence polarization assay for the detection of antibodies to *Mycobacterium bovis* in bovine sera. *Vet Microbiol.* 2007; 120(1-2):113-21.
- 37 Khol JL. Kralik P. Slana I. Beran V. Aurich C. Baumgartner W. Pavlik I. consecutive Excretion of *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* in Semen of a Breeding Bull Compared to the Distribution in Faces, Tissue and Blood by IS900 and F57 Quantitative Real-Time PCR and Culture Examinations. *Journal Veterinary Medicine Sci.* 2010; 72(10): 1283-1288.

- 38 Kokuina E, Chico A, Estévez M, Pérez D, Gutiérrez A, Cruz C. Utilización y valor predictivo de la determinación de anticuerpos antinucleares en un Hospital de Referencia Nacional de Salud. *Rev Cubana Med* 2006;45(3):520-530.
- 39 Kreeger JM. Ruminant paratuberculosis a century of progress and frustration. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 1991. 3:373-382.
- 40 Laemlli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. Londres. 1970. 227:680-685.
- 41 Lei L, Brandon LP, Hostetter JM. Live *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* and killed-bacterium vaccine induce distinct subcutaneous granulomas, with unique cellular and cytokine profiles. *Clinical and Vaccine immunology*. 2008; 15 (5): 793-793.
- 42 Limón GMM. Fávila HLC. Herrera LE, Santillán FMA. Lozano DRR. Córdoba LD, Guzmán RCC. Prevalencia de paratuberculosis en bovinos lecheros de Guanajuato y Aguascalientes: Resultados preliminares. Reuniones nacionales de investigación e innovación pecuaria, agrícola, forestal y acuícola-pesquera. México. 2011.
- 43 Lin, M. Sugden, EA, Jolley, ME. Stilwell, K. Modification of the *Mycobacterium bovis* extracellular protein MPB70 with fluorescein for rapid detection of specific serum antibodies by fluorescence polarization. *Clin, Diagn. Lab. Immunol*. 1996. 3, 438-443.
- 44 Lui M, Tempst P and Erdjument BH. Methodical Analysis of Protein-Nitrocellulose Intereactions to Design a Refined Digestion Protocol. *Analytical Biochemistry*. 1996. 241.156-166.
- 45 Manual de la OIE sobre animales terrestres 2012. 7ª edición 2012. ISBN 978-92-9044-884-6.
- 46 Martínez AG, Santillán MA, Guzmán CC. Desarrollo de un inmuno-ensayo enzimático (ELISA) para el diagnóstico de paratuberculosis en bovinos. *Rev Mex Cienc P EecNu B20O1V2; I3N (O1) S:1-18*.

- 47 Metz C.E. basic principles of ROC analysis, semin. Nucl. Me. 8, 283-298.
- 48 Mikkelsen, C. Aagaard, S. S. Nielsen, and G. Jungersen. Review of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* antigen candidates with diagnostic potential. Veterinary Microbiology, vol. 152, no. 1-2, pp. 1–20, 2011.
- 49 Mon ML, Viale M, Baschetti G. Search for *Mycobacterium avium Subspecies paratuberculosis* Antigens for the Diagnosis of Paratuberculosis. Buenos Aires, Argentina. Instituto de Biotecnología. Facultad de Ciencias Veterinarias. 2012: 1-2.
- 50 Mon ML, Viale M. Et al. Search for *Mycobacterium avium subsp paratuberculosis* Antigens for the Diagnosis of Paratuberculosis. Argentina. Instituto de biotecnología. Veterinary Medicine International. 2012; 8 1-9.
- 51 Nielsen K, and Gall D. Fluorescence polarization assay for the diagnosis of brucellosis: A Review. 2001, 22(3), 183-201.
- 52 Rebhun WC. Diseases of Dairy Cattle. USA: Ed. Lippincott Williams and Wilkins, 1995:208-213.
- 53 Reyes, M. Respuesta inmune celular a la proteína de 50 kDa de *Mycobacterim vaccae* (tesis de licenciatura). México: Facultad de Química: UNAM. 2001.
- 54 Rodríguez VRI. Enfermedades de importancia económica en producción animal. México. McGraw-Hill. 2005: 393-401.
- 55 Samartino L, Gregoret R, Gall D, and Nielsen K. Fluorescence polarization assay: Application to the diagnosis of bovine brucellosis in Argentina. J. of Immunassay. 1999. 20 (3), 115-126.
- 56 Samartino, L., Gregoret, R., Gall, D., and Nielsen, K. 1999. Fluorescence polarization assay: Application to the diagnosis of bovine brucellosis in Argentina. J. of Immunassay, 20 (3), 115-126.
- 57 Shanahan F, O'Mahony MD. The Mycobacteria Story in Crohn's Disease. American Journal of Gastroenterology. 2005. 1537-1541.

- 58 Siguroardottir OG, Mette V, Press, C. Establishment of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* infection in the intestine of ruminants. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2004; 56(6): 819-834, II.
- 59 Souza GS, Rodrigues FAB, Gioffré, A. Apa antigen of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* as a target for species-specific immunodetection of the bacteria in infected tissues of cattle with paratuberculosis. *Veterinary Immunopathology* 143 (2011)75-82.
- 60 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* Infection (Johne's Disease) in Cattle. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2006; 13(5): 535-540.
- 61 Stevson, K.; Hughes, VM.; De Juan, L. molecular characterization of pigmented and nonpigmented isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002. 40: 1798-1804.
- 62 Surujballi OP, Romanowska A, Sugden EA, Turcotte C, Jolley ME. A fluorescence polarization assay for the detection of antibodies to *Mycobacterium bovis* in cattle sera. *Vet Microbiol*. 2002 Jun 20; 87(2):149-57.
- 63 Thole J, et al. *Mycobacteria: Molecular Biology and Virulence*. Chapter 18. Blackwell Science.2002: 356-358.
- 64 Tiwari A, VanLeeuwen JA, McKenna SLB. Johne's disease in Canada part I: clinical symptoms, pathophysiology, diagnosis, and prevalence in dairy herds. *The Canadian Veterinary Journal*, 2006. Vol. 47, no. 9. 874-882.
- 65 Trejo MH, Gorocica P. Bases moleculares de la interacción de *Mycobacterium tuberculosis* con los macrófagos: trabajo de revisión. México. 2012. Vol 16 (1): 41-47.
- 66 Van Soolingen D, Hermans PW, de Hass PE, Soll DR, van Enbden JD. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol*. 1991 Nov; 29(11):2578-86.

- 67 Wessel, D. Fluegge U.I. (1984), Anal. Biochem. 138, 141-143
- 68 Willemsen J, Westerveen A, Dinkla D, Bakker FG, Zijderveld V, and Thole JER. Secreted antigens of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* as prominent immune targets. Veterinary Microbiology, 2006. vol. 114, no. 3-4, pp. 337–344.

11.0 APÉNDICES

Apéndice 1. Medios de cultivo

Proskawer & Beck con SFB

L – asparagina	5 g
Fosfato monobásico de potasio	5 g
Sulfato de potasio	5 g
Citrato de magnesio	1.5 g
Glicerina	20 ml
Suero fetal bovino	50 ml
Micobactina	Disuelta en 4 ml de etanol
Agua destilada c.b.p.	1000 ml

Middlebrook 7H9

Middlebrook 7 H9	4.7 g
Glicerol	2 ml
OADC	2ml
Agua destilada c.b.p.	1000 ml

Apéndice 2. Extracción del ADN Bacteriano

Acetato de amonio 7.5 M, 6.3 pH

Acetato de Amonio	7.225 g
Agua destilada	12.5 ml

TE-Triton 1M pH 8

Tris HCL	3.025 ml
EDTA	0.7445 g
Tritón 100x	1.0 ml
Agua destilada c.b.p.	50 ml

Lysozima

Lysozima	10 mg
Agua destilada	100 ml

SDS 10%

Duodecil Sulfato de Sodio (SDS)	10 g
Agua destilada	100 ml

Proteinasa K

Proteinasa K	10 mg
--------------------	-------

Agua destilada 1.0 ml

Proteinasa K/SDS 10%

Proteinasa K 5 μ l
SDS 10 % 70 μ l

NaCl 5M

NaCl 29.2 g
Agua destilada 100 ml

CTAB/NaCl

NaCl 4.1 g
CTAB 10 g
Agua destilada 100 ml

Apéndice 3. Western Blot

- Page SDS 12% -

Resolving 4x ph 8.8 0.4% SDS

Tris base 90.85 g
SDS 2.0 g
Agua destilada 500 ml

Stacking 4x pH 6.8 4% SDS

Tris HCl 19.7 g
SDS 1.0 g
Agua destilada 250 ml

Persulfato de amonio (APS) 10 %

APS 0.10 g
Agua destilada 1.0 ml

Acrilamida Stock

Acrilamida 150 g
N.N-Methylene-bis acrilamida 4.0 g
Agua destilada 500 ml

Buffer de carga

Solución Stacking 12.5 ml
SDS 10 % 5.0 g
EDTA 0.15 g

B- mercaptoetanol	2.5 ml
Glicerol	10 ml

Buffer de corrida 1x

Tris base	3.03 g
Glicina	1.44 g
SDS	1.0 g

Coctel de carga

Azul de bromofenol	12.5 mg
Rojo de tironina	12.5 mg
Agua destilada	1000 ml

Azul brillante de Coomassie

Azul brillante de Coomassie	0.2 g
Metanol	100 ml
Ácido acético	14 ml
Agua destilada c.b.p.	200 ml

Solución destiñidora

Metanol	50 ml
Ácido acético	7 ml
Agua destilada c.b.p.	100 ml

- Transferencia de membrana -

Buffer de transferencia 1x

Tris Base	6.04 g
Glicina	28.8 g
Metanol	200 ml
Agua destilada c.b.p.	2000 ml

Solución Amortiguadora de fosfatos (PBS 1x):

NaCl.....	8 g
KCl.....	0.2 g
Na ₂ PO ₄	1.44 g
NaH ₂ PO ₄	0.24 g
Agua destilada	1000 ml

Solución de lavado PBS-Tween 20 pH 7.4

NaCl	8 g
KCl	0.2 g

Na ₂ PO ₄	1.44 g
NaH ₂ PO ₄	0.24 g
Tween 20	500 µl
Agua destilada	1000 ml

Solución reveladora (Transferencia de membrana)

PBS 1x	20 ml
Peróxido de Hidrógeno	2 µl
Diaminobenzidina (DAB)	10 mg

Apéndice 4. Purificación proteica

Tris 0.2 M pH 8.5/ Detergente Zwittergent 3-16 0.3 M

Tris base	1.261 g
Detergente Zwittergent 3-16	1.175 g
Agua destilada c.b.p.	50 ml